

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área Toxicologia

Modulação da concentração intracelular de NAD⁺ e seu efeito na tumorigênese induzida por benzo[*a*]pireno em células bronquiais epiteliais humanas

Everson Willian Fialho Cordeiro

Tese para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo, 2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área Toxicologia

Modulação da concentração intracelular de NAD⁺ e seu efeito na tumorigênese induzida por benzo[*a*]pireno em células bronquiais epiteliais humanas

Everson Willian Fialho Cordeiro

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
DOUTOR em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo, 2021

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

C794m Cordeiro , Everson Willian Fialho
Modulação da concentração intracelular de NAD⁺ e seu efeito na tumorigênese induzida por benzo[a]pireno em células bronquiais epiteliais humanas / Everson Willian Fialho Cordeiro . - São Paulo, 2020.
275 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Loureiro, Ana Paula de Melo

1. Benzo[a]pireno. 2. câncer de pulmão. 3. nicotinamida ribosídeo. 4. metabolismo energético.
I. T. II. Loureiro, Ana Paula de Melo, orientador.

Everson Willian Fialho Cordeiro

Modulação da concentração intracelular de NAD⁺ e seu efeito na tumorigênese induzida por benzo[*a*]pireno em células bronquiais epiteliais humanas

Banca examinadora para obtenção do título Doutor

Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro
Orientadora/presidente

1° examinador

2° examinador

3° examinador

São Paulo, ____ de abril de 2021.

APOIO FINANCEIRO

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

- Processo 2016/08784-9 – Bolsa de Doutorado Direto
- Processo 2016/20925-7 – Auxílio Regular à Pesquisa

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PRP – Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Em pleno século XXI somos um país com 11,3 milhões de analfabetos. Isso nos mostra que o acesso ao ensino, especialmente ao ensino superior ainda é privilégio para poucos. Que esse título de doutorado, sirva para me lembrar com humildade que o conhecimento transforma e, sobretudo, para me lembrar de onde eu vim e onde quero chegar. Espero que ao longo da minha vida eu possa retribuir para a sociedade brasileira os investimentos em mim realizados. Abro um parêntese para reforçar os meus mais sinceros agradecimentos a todos os professores, que nas diferentes esferas de ensino, contribuíram para minha formação. Espero que um dia o nosso país possa valorizar esses importantes profissionais.

À Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro pelo desafio em me propor ingressar no programa de Doutorado Direto. Obrigado pelo incentivo e espaço no seu grupo de pesquisa.

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (FCF-USP), em especial à Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, Profa. Dra. Tânia Marcourakis, Prof. Dr. Maurício Yonamine e Prof. Dr. Ernani Pinto Junior por me permitir utilizar sem restrições os seus laboratórios. Vocês contribuíram na construção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida e a técnica de laboratório Renata Albuquerque pela disponibilidade e análises com o equipamento multiusuário de citometria de fluxo. Vocês contribuíram para enriquecimento científico deste trabalho.

À Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Eler, Profa. Dra. Ana Campa e Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio por colocar sempre os seus laboratórios, técnicos e alunos a disposição do grupo de pesquisa. Principalmente com as análises de expressão genica.

À Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento pelas conversas, conselhos e frequente disponibilidade. Estendo meus agradecimentos à Profa. Dra. Silvia Cavani Jorge Santos pela amizade, conselhos, ensinamentos, almoços, cafés e pela colaboração com as análises de AUC.

A Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros e ao Prof. Dr. Paolo de Mascio do IQ-USP pela disponibilidade dos equipamentos nos experimentos de espectrometria de massas, que compõem grande parte desse trabalho.

Agradeço também a Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares (IQ-USP) e a sua pós-doc Dra. Andreia Faccio pelo enriquecimento deste trabalho com as análises de PCA. Estendo os agradecimentos ao Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani (IQ-USP) pela disponibilidade com as análises de quimiluminescência.

Ao Prof. Dr. Leonardo Karam Teixeira e sua aluna de doutorado Rafaela Fagundes, por me receberem em seu laboratório (INCA/RJ), e por contribuir com análises de Western blot descritas nesse trabalho.

Aos colegas dos laboratórios do bloco 13B pelas conversas, trocas de ideias, conhecimentos e por toda ajuda com equipamentos. Deixo aqui meus agradecimentos ao Gustavo Rocha, Milena Broering, Vitor Bruno, Lídia Spelta, Gabriela de Oliveira, Maria Luísa e Ana Miguel.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Metabolismo Redox em Toxicologia (MRETOX). Ao Dr. Thiago Franco de Oliveira que deu início os estudos com benzo[*a*]pireno. Agradeço também pelos ensinamentos na etapa inicial do projeto, principalmente com a parte de cultivo das células. Agradeço ao colega Dr. Antônio Anax Falcão de Oliveira pelas conversas e constante disponibilidade.

Dedico um agradecimento especial a minha amiga e Joseana de Oliveira por toda confidencialidade nas nossas conversas, pela ajuda em experimentos e pela construção de conhecimento científico nas nossas discussões. Nossas diferenças só enriqueceram essa amizade. Ao meu amigo João Lopes Moreno pela amizade, conversas científicas e pelos cafés no bloco 20. Aos alunos de iniciação científica, com quem compartilhei um pouco de conhecimento e treinamento técnico, Matheus Relvas dos Santos (biólogo e aluno de mestrado), Thayna Curi (graduanda em química), Giovanna Silva (graduanda em biomedicina) e Lucas Assunção (graduando em farmácia), desejo sucesso e realizações na caminhada profissional.

Agradeço ao corpo técnico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela disponibilidade de ajuda, deixo registrados os mais sinceros cumprimentos às técnicas de laboratório Silene Migliorini, Fabiana Teixeira, Beatriz Paranhos, Stephanie de Oliveira, Fabiane *Dörr*, Felipe *Dörr*, Silvia Romano e Patrícia Amorim. Agradeço também as funcionárias da Secretária do PPG e da Pós-Graduação, Samanta de Sá, Elaine Midori, Edna Batista e Sueli Duarte pelo suporte e disponibilidade de sempre.

Agradeço aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia), que juntos conseguimos organizar e realizar dois importantes eventos de divulgação científica: VIII Simpac e a I Escola de Inverno em Fisiopatologia e Toxicologia (FisioTox).

À Pro-Reitoria de Pós-Graduação que por meio do Programa de Aperfeiçoamento Ensino (PAE) me proporcionou uma importante experiência como monitor em disciplinas do

curso de Farmácia-Bioquímica da FCF/USP. Agradeço aos docentes e aos colegas monitores pela experiência.

Agradeço também ao Professor Dr. Sandro Rogério, e estendo meus agradecimentos aos demais docentes, pela experiência enriquecedora como representante discente junto a CCP.

Aproveito a oportunidade para agradecer aos professores da Universidade Federal do Pampa (Unipampa) que com excelência contribuíram para minha formação. Espero que a Unipampa continue sendo ferramenta de transformação social, econômica e científica para sociedade brasileira.

Agradeço a todos os professores, amigos e colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (LDCQ-Unipampa) onde comecei as atividades científicas. Deixo um agradecimento fraterno ao Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez, um dos responsáveis por me apresentar o mundo científico. Agradeço aos meus queridos orientadores, Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim e Profa. Dra. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia, que com dedicação, incentivo e conhecimento técnico contribuíram para minha formação.

Uruguaiana foi um marco de amadurecimento pessoal e profissional. Agradeço aos amigos Gustavo Santi, José Pedro, Muriel Pando, Marí Castro, Ronaldo Leira e Rafael Reis que fizeram parte desse momento, e permaneceram em contato após o término desse ciclo. Também não poderia deixar de agradecer aos responsáveis por fazer essa trajetória na cidade de São Paulo mais leve, aos meus amigos Cesar Cristóvão, Diego Luiz, Daniel Koller, Henrique Solrac, Jamil Torquato e Gissele Rolemberg.

Agradeço ainda, a Milena Broering e a Maria Cármem, que compartilharam momentos de frustrações e de alegrias desse período de Pós-Graduação. Obrigado pelo companheirismo e pelos bons momentos em que dividimos o apartamento 73.

Finalmente, agradeço a Deus pela vida, e por toda força e proteção durante toda essa caminhada.

Meus sinceros agradecimentos aos amigos, colegas, familiares e professores.

Dedicatória

A minha família, que há 10 anos aprendeu a conviver com a distância.

*Ao meu pai **Geraldo** e a minha mãe **Silvania**. Vocês me ensinaram os princípios mais básicos, e assim foram me lapidando ao longo desses 28 anos. Vocês são minhas referências de honestidade, amor e companheirismo. Gostaria de registrar a minha gratidão e meu amor, obrigado por todo apoio e incentivo nas buscas dos meus sonhos. Hoje esse doutorado só se materializa devido ao esforço e a dedicação contínua de vocês.*

*Aos meus queridos irmãos **Alysson e Erick** que desde os primórdios da minha existência cultivaram o verdadeiro significado da amizade, amo vocês.*

*Deixo uma dedicação especial aos meus queridos avôs **João Sabino e Fizico** (in memória), dois indivíduos que com humildade e sabedoria são exemplos de vida e superação. Deixo uma homenagem especial ao meu avô Fizico, que em 2017 partiu para o mundo espiritual. Você cumpriu com grandiosidade o seu papel como pai e avô. Você fomentou o espírito do rizo em todos que te conheceram, e foi exemplo de superação em meio às tantas adversidades que a vida lhe impôs. Você estará sempre no meu coração e nas minhas memórias.*

*Começamos a entender que o universo que temos como nosso
pode ser considerado como um organismo vivo no qual cada uma
das células trabalha em equilibrada cooperação com todas as outras,
a fim de manter uma coerência de conjunto. Se uma dessas células
falhar e a doença se instalar, esse equilíbrio é posto em questão.
É a totalidade do sistema que está em risco, isso nos sugere que nosso
bem-estar individual está intimamente ligado aos indivíduos
e ao ambiente em que evoluímos.*

Dalai Lama

RESUMO

CORDEIRO, E. W. F. **Modulação da concentração intracelular de NAD⁺ e seu efeito na tumorigênese induzida por benzo[*a*]pireno em células bronquiais epiteliais humanas.** 2020. 275f. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020

A alta incidência, prevalência e mortalidade do câncer de pulmão demonstram a necessidade de se identificar alterações moleculares envolvidas na carcinogênese pulmonar. Nesse contexto, a reprogramação do metabolismo energético é uma marca emergente do câncer. Há evidências de que benzo[*a*]pireno (B[*a*]P), um conhecido carcinógeno humano, induz alterações metabólicas via modificação da função mitocondrial tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Uma vez que as alterações metabólicas não são somente o resultado da transformação celular, mas podem também ter papel na etiologia do câncer ao modular o epigenoma e a expressão de genes, intervir no metabolismo de células em processo de transformação pode contribuir para desvendar mecanismos de carcinogênese e revelar alvos para quimioprevenção. A fim de investigar a relação entre alterações no metabolismo celular, marcas epigenéticas e transformação celular, implementamos um modelo de tumorigênese (avaliada pela formação de colônias em *soft-agar*) induzida por B[*a*]P em células epiteliais bronquiais humanas imortalizadas (linhagem BEAS-2B) crescidas em monocamada (2D). O modelo possibilitou a observação de alterações precoces do metabolismo celular. Levando em consideração que o nucleotídeo NAD⁺ regula as atividades de diversas vias moleculares importantes para a sobrevivência, diferenciação, crescimento e morte celular, e que suas concentrações foram rapidamente diminuídas após exposição a B[*a*]P, decidimos suplementar as células BEAS-2B com nicotinamida ribosídica (NR), um precursor intracelular de NAD⁺, concomitantemente à exposição a B[*a*]P. NR em baixa concentração no meio de cultura (1 μM) induziu estresse energético em células BEAS-2B expostas a B[*a*]P (1 μM) ao longo do período de uma semana de co-incubação, aumentando seletivamente a taxa de apoptose dessas células. Protegeu contra a transformação celular induzida por B[*a*]P e impediu completamente a formação espontânea de colônias das células controle em *soft-agar*. Usamos uma abordagem metabolômica direcionada a alvos específicos (“targeted metabolomics”) desenvolvida no grupo para quantificar metabólitos conhecidamente alterados no câncer. Os dados indicam que NR diminuiu o metabolismo de glutamina nas células expostas a B[*a*]P, o que ocorre em paralelo com a diminuição das concentrações de citrato e aspartato, aumento da razão malato/aspartato, diminuição das razões ATP/AMP e ATP/ADP e aumento das concentrações de adenosina. As alterações se enquadram na hipótese de inibição do *shuttle* malato-aspartato, cuja atividade é necessária para a sobrevivência de células que sofrem o efeito Warburg (alta dependência de NADH citosólico para geração de ATP). NR adicionalmente protegeu as células contra o estresse redox, a hipermetilação do DNA e o aumento da atividade de sirtuína 1 (SIRT1) induzidos por B[*a*]P, além de aumentar a expressão de genes supressores tumorais (E-caderina, PTEN, semaforina 3F, p16(ink4a)) que podem ser reprimidos por CtBP (proteína ligante de NADH que atua como sensor redox e traduz a condição metabólica da célula para o controle da expressão gênica). Foi ainda observada maior atividade de PARP1 nas células expostas a B[*a*]P+NR em comparação aos demais grupos. Os resultados obtidos mostram que NR se contrapõe a ou exacerba alterações bioquímicas induzidas por B[*a*]P, diminuindo a chance de transformação carcinogênica das células BEAS-2B. Estudos em modelos mais complexos,

como micro tecidos *in vitro*, são necessários para a confirmação do efeito quimiopreventivo da NR e alterações bioquímicas subjacentes.

Palavras chave: Benzo[*a*]pireno, câncer de pulmão, nicotinamida ribosídeo, metabolismo energético.

ABSTRACT

CORDEIRO, E. W. F. **Modulation of intracellular concentration of NAD⁺ and its effect on benzo[*a*]pyrene-induced tumorigenesis in human epithelial bronchial cells.** 2020. 275f. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020

The high incidence, prevalence and mortality of lung cancer demonstrates the need to identify molecular changes involved in lung carcinogenesis. In this context, the reprogramming of energy metabolism is an emerging brand of cancer. There is evidence that benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), a known human carcinogen, induces metabolic changes via modification of mitochondrial function both in vitro and in vivo. Since metabolic changes are not only the result of cell transformation, but can also play a role in the etiology of cancer by modulating the epigenome and gene expression, intervening in the metabolism of cells in the process of transformation can contribute to unravel mechanisms of carcinogenesis and reveal targets for chemoprevention. In order to investigate the relationship between changes in cell metabolism, epigenetic marks and cell transformation, we implemented a model of tumorigenesis (assessed by the formation of colonies on soft-agar) induced by B[*a*]P in immortalized human bronchial epithelial cells (BEAS-2B cell line human) grown in monolayer (2D). The model enabled the observation of early changes in cell metabolism. Taking into account that the NAD⁺ nucleotide regulates the activities of several molecular pathways important for cell survival, differentiation, growth and death, and that their concentrations were rapidly decreased after exposure to B[*a*]P, we decided to supplement the BEAS-2B cells with nicotinamide riboside (NR), an intracellular precursor of NAD⁺, concomitantly with exposure to B[*a*]P. NR in low concentration in the culture medium (1 μM) induced energy stress in BEAS-2B cells exposed to B[*a*]P (1 μM) over the period of a week of co-incubation, selectively increasing the apoptosis rate of these cells. It protected against cell transformation induced by B[*a*]P and completely prevented the spontaneous formation of control cell colonies on soft-agar. We use a targeted metabolomics approach developed in the group to quantify metabolites known to be altered in cancer. The data indicate that NR decreases the glutamine metabolism in cells exposed to B[*a*]P, which occurs in parallel with the decrease in citrate and aspartate concentrations, increased malate/aspartate ratio, decreased ATP/AMP and ATP/ADP ratios and increased adenosine concentrations. The changes fit the hypothesis of inhibition of the malate-aspartate shuttle, whose activity is necessary for the survival of cells that suffer the Warburg effect (high dependence on cytosolic NADH for ATP generation). NR additionally protected cells against redox stress, DNA hypermethylation and increased B[*a*]P-induced sirtuin 1 (SIRT1) activity, in addition to increasing the expression of tumor suppressor genes (E-cadherin, PTEN, semaphorin 3F, p16 (ink4a)) that can be suppressed by CtBP (NADH-binding protein that acts as a redox sensor and translates the cell's metabolic condition to control gene expression). Higher PARP1 activity was also observed in cells exposed to B[*a*]P+NR compared to the other groups. The results obtained show that NR is opposed to or exacerbates biochemical changes induced by B[*a*]P, reducing the chance of carcinogenic transformation of BEAS-2B cells.

Studies on more complex models, such as micro tissues in vitro, are necessary to confirm the chemopreventive effect of NR and underlying biochemical changes.

Keywords: benzo[*a*]pyrene, lung cancer, nicotinamide riboside, energetic metabolism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química do B[a]P. B[a]P possui peso molecular de 252,3 g/mol (C₂₀H₁₂). Dentre suas características físico-químicas destaca-se sua coloração amarelada na forma de cristais de agulha, possui alto ponto de bulição (312 °C), alto ponto de fusão (179 °C) e log K_{ow} de 6,35. A baixa solubilidade em água (0,00162 mg/L a 25 °C), exige que este seja solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) para realização de estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo*. Adaptado da monografia da IARC, 2012. 51
- Figura 2.** Principais vias de biotransformação do B[a]P. As reações enzimáticas são catalisadas pelo complexo do citocromo P450 (isoformas CYP1A1 e CYP1B1), peroxidases e alfa-ceto-redutases. Essas reações acabam gerando produtos eletrofílicos reativos (como o BPDE), que interagem com as bases do DNA, dando origem a vários adutos. Além disso, pode haver reações com resíduos de aminoácidos dando origem a diferentes tipos de lesões de proteínas. Também há relatos de lesões em ácido ribonucleico (RNA). Durante o processo de biotransformação, espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser formadas e o desbalanço redox pode acarretar dano oxidativo a várias biomoléculas. Adaptado e traduzido de KLEINOW et al., 1998. 52
- Figura 3.** Mecanismo de ativação do receptor AhR. B[a]P ativa o AhR estimulando a dissociação das proteínas associadas ao AhR. O complexo é constituído pelas proteínas AhR, HSP90 (do inglês *hidrocarbon receptor nuclear translocador*), XAP2 (do inglês *pregnane x receptor*) e p23 (do inglês *protein 23 kDa*). Subsequentemente, o complexo B[a]P-AhR é translocado para o núcleo, onde este se dimeriza com o translocador nuclear de AhR (ARNT). Esse heterodímero se liga a regiões responsivas a xenobióticos (XRE, do inglês *xenobiotic responsive element*, 5'-GCGTGA-3') e altera a expressão de genes relacionados a biotransformação, proliferação e metabolismo energético. Traduzido de DENILSON et al., 2002. 53
- Figura 4.** Processo de peroxidação lipídica. Na fase de iniciação, um radical reativo (exemplo: radical hidroxila) remove hidrogênio do ácido graxo insaturado presente no lipídio de membrana, produzindo um radical lipídico (L•). Este radical, por sua vez, reage com o oxigênio molecular, formando um radical peroxila (LOO•), que abstrai hidrogênio de outro lipídio. Na fase de propagação, forma-se um hidroperóxido lipídico (LOOH) e outro L• que reage com o oxigênio, e assim sucessivamente. Na fase de terminação, dois radicais acabam se combinando e formam um não radical. LOOH pode sofrer outras reações, que na sua maioria são degradativas e acabam 54

produzindo aldeídos e alcanos de diferentes reatividades e massas moleculares. Adaptado de LOUREIRO; Di MASCIO; MEDEIROS, 2002 e AUGUSTO, 2006.

- Figura 5.** Processo de transformação maligna: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é causada por alterações irreversíveis na estrutura do DNA. Nessa etapa vários mecanismos de regulação contribuem para a proteção contra o processo de iniciação do câncer. Os principais pontos de regulação são os mecanismos de detoxificação de xenobióticos, o processo de reparo de lesões de DNA e a eliminação das células que apresentem o DNA modificado. A promoção envolve a dentre outros processos a seleção e expansão das células iniciadas, o que pode levar ao desenvolvimento de um tumor benigno. Durante a promoção existe alterações na expressão de diversos genes que regulam a diferenciação, crescimento e metabolismo celular. Já no estágio final da carcinogênese (fase de progressão do câncer) alterações adicionais na estrutura do DNA, como por exemplo, nos genes supressores de tumor e de proto-oncogenes são as alterações mais proeminentes. Por fim a conversão de tumores benignos para malignos é acompanhada principalmente por perda do controle do crescimento, invasão dos tecidos adjacentes, metástase e instabilidade genética aumentada. Adaptado de LOUREIRO; Di MASCIO; MEDEIROS, 2002; MURATA, 2018. 56
- Figura 6.** Ativação de PARP1 no processo de reparo de lesões de DNA. A PARP1 possui sítio de ligação que reconhece danos ao DNA. Após reconhecer as lesões no DNA inicia-se o processo de homodimerização. Nessa etapa, o NAD^+ é utilizado como substrato para produzir polímeros lineares e ramificados de unidades de ADP-ribose, liberando constantemente NAM. A poli(ADP)ribosilação ocorre na própria PARP1 (automodificação) ou na matriz de proteínas nucleares. Esses sítios de (ADP)ribosilação amplificam o processo de reparo por meio da descondensação da cromatina e da remodelação dos nucleossomos, aumentando a acessibilidade de proteínas de reparo de excisão de bases (BER, do inglês *base excision repair*). O complexo proteico de BER é formado pelas proteínas XRCC1 (do inglês *X-ray repair cross-complementing*), pol β (do inglês *DNA polymerase β*) e pela DNA ligase III no DNA danificado. Traduzido e adaptado de SINGH et al., 2013; TOSS; CORESI, 2013. 58
- Figura 7.** Vias de biossíntese responsáveis pela manutenção das concentrações intracelulares de NAD^+ . A biossíntese de NAD^+ pode ter início com a conversão de triptofano em ácido quinolínico (AQ) pela indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO). O AQ é convertido à ácido nicotínico mononucleotídeo (NAMN) pela quinolinato fosforribosiltransferase (QPRT). NAMN também é sintetizado via ribosídeo de ácido nicotínico (NAR) pela nicotinamida ribosídeo quinase 1 e 2 (NRK1/2) ou indiretamente via ácido 61

nicotínico (AN) pela fosforribosiltransferase de nicotinato (NAPRT). O NAMN é adenilado ao dinucleotídeo de adenina do ácido nicotínico (NAAD) via adenililtransferase de nicotinamida mononucleotídeo 1-3 (NMNATs) antes da síntese de NAD⁺ via NAD sintetase (NADS). O NAD⁺ é reduzido pelas enzimas do ciclo de Krebs (TCA, do inglês *tricarboxylic acid cycle*) para NADH, que atua como principal doador de elétrons para o complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. A produção de NADPH pela via das pentoses (VPP) é crítica para a síntese de nucleotídeos e para os sistemas endógenos que atuam na defesa antioxidante. As sirtuínas e as PARPs consomem NAD⁺ para produzirem ADP ribose, liberando nicotinamida, que pode ser reciclada para NMN pela enzima nicotinamida fosforribosiltransferase (NAMPT), e adenilada para NAD⁺ por (NMNATs). A nicotinamida ribosídeo produz constantemente NAD⁺ por duas vias de metabolização. A produção pode ser via NRK que produz NMN, e subsequentemente, é convertido a NAD⁺. Além disso, NR pode ser metabolizada a NAM via PNP (purina nucleosídeo fosforilase), e logo em seguida sofre reações via NAMPT e NMNAT para formar NAM e NAD⁺ respectivamente. Traduzido e adaptado de DEMAREST et al., 2019.

Figura 8. Atividade de CtBP na tumorigênese e progressão tumoral. A atividade co-repressora transcricional da CtBP é estimulada em ambiente de hipóxia como resultado de concentrações elevadas de NADH. CtBP aumenta a proliferação celular via repressão transcricional dos inibidores do ciclo celular p16Ink4a e p15Ink4b. Além disso, CtBP promove EMT, migração e invasão de células tumorais por reprimir E-caderina, e possivelmente a fosfatase PTEN. CtBP também atua regulando a sobrevivência celular como resultado da repressão dos genes pró-apoptóticos (PERP, Bax e Noxa). Por outro lado, CtBP é regulado negativamente por supressores de tumor (HIPK2, Ink4a/Arf e APC), que promove a degradação como resultado da fosforilação e ubiquitinação. Traduzido e modificado de CLARHAUT et al., 2009. 65

Figura 9. Apresentação resumida da cascata de sinalização da via PI3K/AKT/mTOR e as principais alterações no metabolismo intermediário de células neoplásicas e em transformação. A ativação de PI3K é mediada por estímulos externos, incluindo, por exemplo, a ligação de EGRF a receptores de membrana. PI3K catalisa a fosforilação de diversos substratos e regula positivamente a ativação de diversos fatores de transcrição oncogênico, incluindo MYC. MYC aumenta a expressão da piruvato desidrogenase quinase 1 (PDK1) que modula a atividade de PDH que converte piruvato a acetil-coA, inibindo o fluxo de entrada de piruvato no ciclo de Krebs. MYC também altera a expressão de piruvato quinase M2 (PKM2) que é uma isoformas mais lenta da piruvato quinase, permitindo que intermediários da via glicolítica também possam ser utilizados em outras vias biossintéticas (ex. a síntese de aminoácidos). Nas células neoplásicas ou em transformação o ciclo de Krebs passa a fornecer intermediários para vias biossintéticas. Nesse processo, citrato é transportado para o citoplasma e passa a ser utilizado para a síntese de lipídios. Concomitantemente ao 66

desvio de intermediários do ciclo de Krebs a célula aumenta a captação de glutamina, que passa a ser fonte de carbono para o ciclo de Krebs, por meio da conversão de glutamina a glutamato, e subsequentemente a α -KGT. O α -KGT atua como cofator enzimático para diversas dioxigenases, incluindo PHD1-3 e TETs, que regulam a degradação de HIF e a metilação do DNA, respectivamente.

- Figura 10.** Regulação da atividade do fator de transcrição induzível por hipóxia. O fator de transcrição oncogênico HIF atua de acordo com variações nas tensões de oxigênio. Em condições de normoxia HIF é continuamente produzido, e na presença de Fe^{2+} , oxigênio e α -cetoglutarato é continuamente degradado pelo complexo enzimático VHL (do inglês *Von Hippel Lindau*), ubiquitina e proteassoma. Quando o oxigênio torna-se limitante, a prolil-hidroxilase (PHD) é inibida, e HIF-1 α acumula-se, podendo ser translocado para o núcleo onde se liga a HIF-1 β constitutivo. O fator de transcrição se liga ao elemento de resposta a hipóxia (HRE) que regula positivamente genes como eritropoietina (EPO) lactato desidrogenase (LDH), enolase (ENO), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e GLUT1. Traduzido e adaptado de LaMANNA et al., 2004. 69
- Figura 11.** Maquinaria epigenética no DNA. A regulação epigenética envolve reações reversíveis de metilação e desmetilação do DNA. Esse processo inclui as seguintes reações enzimáticas: (1) a enzima DNMT3 (DNA metiltransferase) transfere o grupo metil para o carbono 5 da citosina originando a 5-mC; (2) a enzima TET inicialmente converte 5-mC a 5-hmC; (3) posteriormente, a enzima TET converte 5-hmC em 5-formil-citosina (5fC). (4) A enzima TET converte ainda 5-fC em 5-carboxi-citosina (5-caC). Timina DNA glicosidase (TDG) quebra a ligação glicolítica de 5-fC (4b) ou 5-caC (5), gerando sítios abásicos. A via de reparo por excisão de base inclui a remoção do sítio abásico e a substituição do nucleotídeo. Traduzido e adaptado de BAYRAKTAR; KREUTZ, 2018. 72
- Figura 12.** Desenho experimental do projeto. Para o crescimento celular (CVC), atividade mitocondrial (MTT), quantificação dos metabólitos intracelulares, taxa de consumo de glicose no meio de cultura, malonaldeído no meio de cultura e verificação do crescimento em meio semissólido soft agar, as células foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 células/poço em placas de cultura de 96 poços. Para as análises do ciclo celular, viabilidade e tipo de morte as células foram plaqueadas na densidade de 3×10^4 células/poço em placas de cultura de 24 poços. Para análise da metilação de DNA as células foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/poço em placas de 6 poços. Para as análises da atividade de SIRT1 as células foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/poço em placas de cultura de 6 poços. Para atividade de PARP1 as células foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/poço em placas de cultura de 6 poços. Para as análises de expressão gênica, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços na densidade de 3×10^6 células/poço para as exposições de 48 h, 3×10^5 células/poço para as exposições de 120 h e 1×10^5 células/poço para as 85

exposições de 168 h. Para as análises de expressão das proteínas (ciclina B1 e E-caderina), as células foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços na densidade de 2×10^5 células/poço em placas de cultura de 6 poços.

- Figura 13.** Estruturas da nicotinamida mononucleotídeo (NMN) e nicotinamida ribosídeo (NR). 116
- Figura 14.** Cromatogramas obtidos por HPLC/DAD. A) separação cromatográfica entre NR e NMN. B) NR obtida após o procedimento purificação. 117
- Figura 15.** Concentração relativa (%) de NR no meio de cultura ao longo de 24 h a 37 °C. 118
- Figura 16.** Sobreposição dos cromatogramas da análise de estabilidade de NR no meio de cultura ao longo de 24 h de incubações a 37 °C. 119
- Figura 17.** Crescimento das células BEAS-2B expostas a diferentes concentrações de NR. As análises foram feitas utilizando o método do CVD. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *t test*. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto à NR e o grupo controle em cada tempo ($p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***). 120
- Figura 18.** Atividade mitocondrial de células BEAS-2B expostas a diferentes concentrações de NR. As análises foram feitas utilizando-se os ensaios do XTT e MTT. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *t test*. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto à NR e o grupo controle em cada tempo ($p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***). 123
- Figura 19.** Curva de crescimento das células BEAS-2B expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. As análises foram feitas em intervalos de 24 h durante 7 dias (168 h). Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way ANOVA* com teste de comparações múltiplas de Bonferroni, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$). 125
- Figura 20.** A. Imagem da morfologia de células BEAS-2B após 144 h de incubações com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle, utilizando placas de 96 poços. B. Representação do perfil de bandas de eletroforese em gel na análise de contaminação por *Mycoplasma* sp., como parte de controle de qualidade de análises laboratoriais. 127
- Figura 21.** Curva de % de redução do MTT/célula das células BEAS-2B expostas ao B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. As análises foram feitas em 128

intervalos de 24 h durante 7 dias (168 h). Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Bonferroni, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$).

- Figura 22.** Viabilidade celular após exposição das células BEAS-2B por 168 h a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. As análises foram feitas pelo método de coloração com azul de tripan. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Bonferroni, em que o asterisco indica a significância da diferença entre o grupo exposto *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *). 130
- Figura 23.** Análise de distribuição das fases do ciclo celular e fragmentação do DNA. Dados obtidos por citometria de fluxo das células BEAS-2B após 24 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *two-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). 132
- Figura 24.** Análise de distribuição das fases do ciclo celular e fragmentação do DNA. Dados obtidos por citometria de fluxo das células BEAS-2B após 72 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão e uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *two-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). 133
- Figura 25.** Análise de distribuição das fases do ciclo celular e fragmentação do DNA. Dados obtidos por citometria de fluxo das células BEAS-2B após 96 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *two-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). 134

- Figura 26.** Análise de distribuição das fases do ciclo celular e fragmentação do DNA. 135
Dados obtidos por citometria de fluxo das células BEAS-2B após 168 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *two-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).
- Figura 27.** Expressão da proteína ciclina B1. A) Imagem representativa das bandas 136
obtidas a partir de extratos proteicos de células BEAS-2B após 168 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. B) Expressão relativa de ciclina B1 após normalização com controle endógeno (GAPDH). Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **).
- Figura 28.** Análise de distribuição das fases do ciclo celular e fragmentação do DNA. 138
Dados obtidos por citometria de fluxo das células BEAS-2B após 48 e 72 h de exposição a 10 μ M de NR. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *teste t de students*, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****).
- Figura 29.** Viabilidade e tipos de morte avaliados por citometria de fluxo de células 140
BEAS-2B células aderidas e em suspensão no meio de cultura, após incubações por 24 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).
- Figura 30.** Viabilidade e tipos de morte avaliados por citometria de fluxo de células 141
BEAS-2B células aderidas e em suspensão no meio de cultura, após incubações por 120 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle

($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).

- Figura 31.** Viabilidade e tipos de morte avaliados por citometria de fluxo de células BEAS-2B células aderidas e em suspensão no meio de cultura, após incubações por 168 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++). 143
- Figura 32.** Razões entre apoptose inicial e apoptose tardia de células BEAS-2B incubadas por 24, 120 e 168 h com B[a]P (1 μ M), B[a]P (1 μ M) + NR (1 μ M), NR (1 μ M) e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++). 145
- Figura 33.** Viabilidade e tipos de morte avaliados por citometria de fluxo de células BEAS-2B que permaneceram aderidas a placa de cultura após incubações por 96 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). 147
- Figura 34.** Viabilidade e tipos de morte avaliados por citometria de fluxo de células BEAS-2B que permaneceram aderidas a placa de cultura após incubações por 120 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das 149

diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

- Figura 35.** Viabilidade e tipos de morte avaliados por citometria de fluxo de células BEAS-2B que permaneceram aderidas a placa de cultura após incubações por 144 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****). 151
- Figura 36.** Viabilidade e tipos de morte avaliada por citometria de fluxo de células BEAS-2B que permaneceram aderidas a placa de cultura após incubações por 168 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++). 153
- Figura 37.** Análise comparativa da porcentagem de células viáveis, porcentagem de células em apoptose (somatória das células em apoptose inicial e tardia) e porcentagem de células em G2/M em 96 e 168 h. 155
- Figura 38.** Análise da formação de colônias em meio semissólido *soft-agar* após 168 h de exposição das células BEAS-2B a B[a]P, B[a]P + NR e NR, e do grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++). 158
- Figura 39.** Imagem microscópica de colônias das células BEAS-2B em *soft-agar* após 168 h de exposição ao B[a]P, B[a]P + NR, NR e grupo controle. As células foram cultivadas por 15 dias em meio semissólido *soft-agar* como descrito em Material e Métodos. 159

- Figura 40.** A) Taxa de formação de colônias em meio semissólido *soft-agar* após 168 h de exposição das células BEAS-2B ao B[a]P, B[a]P+NR, NR, e do grupo controle. A taxa foi calculada a partir do número de colônias formadas em cada grupo dividido pelo número de células viáveis no momento do plaqueamento (quintuplicata por grupo, experimento 2, **Figura 38**). B) Colônias formadas no *soft-agar* a partir do plaqueamento das células aderidas que ficaram livres das exposições por 48 h antes do plaqueamento (triplicata por grupo). Foi feita a marcação com DAPI e contagem das colônias. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++). 161
- Figura 41.** Quantificação de 5-mC e 5-hmC no DNA das células BEAS-2B após 168 h de exposição a B[a]P, B[a]P + NR e NR, e do grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão médio de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++). 162
- Figura 42.** Análise da taxa de consumo de glicose de células BEAS-2B após 24, 96 e 168 horas de incubação com B[a]P, B[a]P + NR, NR e do grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++). 164
- Figura 43.** Visão geral das concentrações das moléculas quantificadas nas células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. São apresentadas as médias ao longo do tempo. As maiores concentrações em cada linha são apresentadas na cor vermelha intensa. 165

- Figura 44.** Concentração de AMP em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). 167
- Figura 45.** Concentração de ADP em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). 168
- Figura 46.** Concentração de ATP em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). 169
- Figura 47.** Razão ATP/AMP em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). 170

- Figura 48.** Razão ATP/ADP em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).
- Figura 49.** Concentração de lactato em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).
- Figura 50.** Concentração de fumarato em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).
- Figura 51.** Concentração de succinato em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).

- Figura 52.** Concentração de malato em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). 175
- Figura 53.** Concentração de glutamina em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). 176
- Figura 54.** Concentração de glutamato em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****). 177
- Figura 55.** Razão glutamina/glutamato em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). 178
- Figura 56.** Concentração de NAD⁺ em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São 179

apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).

Figura 57. Concentração de NADP⁺ em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****).

Figura 58. Vias metabólicas alteradas no câncer. São destacados em vermelho os metabólitos quantificados nas células expostas a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle ao longo das 168 h de incubações. Abreviações: hexoquinase (HK); glicose-6-fosfato (G6P); fosfoglicose-isomerase (PGI); frutose-6-fosfato (F6P); frutose-1,6-bifosfato (FBF); fosfofrutocinase (PFK); 3-fosfoglicerato (3GP); dihidroxi-acetona fosfato (DHAP); triosefosfato isomerase (TPI); 1,3-bifosfoglicerato (BPG); gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH); fosfoglicerato desidrogenase (PHGDH, do inglês *phosphoglycerate dehydrogenase*); fosfogliceratocinase (PGK); 3-fosfoglicerato (3PG); fosfogliceromutase (PGM); 2-fosfoglicerato (2PG); fosfoenolpiruvato (PEP); piruvato cinase M2 (PKM2); lactato desidrogenase (LDH); transportador de piruvato mitocondrial (MPC, do inglês, *mitochondrial pyruvate carrier*); piruvato desidrogenase (PDH); citrato sintase (CS); piruvato carboxilase (PC); piruvato desidrogenase cinase (PDKs); α -cetogluturato (α -kG); α -cetogluturato desidrogenase (α -kGDH); isoformas de isocitrato desidrogenase (IDH1 e IDH3); oxaloacetato (OAA); malato desidrogenase (MDH); ácido graxo sintase (FASN, do inglês *fatty acid synthase*), argininossuccinato liase (ASL); asparagina sintetase (ASNS); argininossuccinato sintetase 1 (ASS1). A figura foi adaptada do estudo de TAN et al., 2013 e 2015, FRENCH, 2015 e SULLIVAN et al., 2016.

Figura 59. Visão geral das concentrações das moléculas quantificadas nas células BEAS-2B expostas por 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. São apresentadas as médias ao longo do tempo. As maiores concentrações em cada linha são apresentadas na cor vermelha intensa.

- Figura 60.** PCA utilizando as concentrações de succinato, piruvato, fumarato, arginina, citrato, lactato, asparagina, aspartato, 2-L-hidroxiglutarato, malato, argininosuccinato, nicotinamida, nicotinamida mononucleotídeo, NAD⁺, NADP⁺, ATP, ADP e AMP das células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. 184
- Figura 61.** Concentração de citrato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média ± erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++). 186
- Figura 62.** Concentração de piruvato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média ± erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++). 187
- Figura 63.** Concentração de lactato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média ± erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que o asterisco indica a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++). 188
- Figura 64.** Correlações entre as moléculas (azul, negativa; vermelha, positiva) das células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. 189

- Figura 65.** Concentração de malato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++). 190
- Figura 66.** Concentração de aspartato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). 191
- Figura 67.** Razão malato/aspartato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##). 192
- Figura 68.** Razão ATP/AMP em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; 193

$p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, #####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++).

Figura 69. Razão ATP/ADP em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, #####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++).

Figura 70. Concentração de arginina em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **), cerquilha indica a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++).

Figura 71. Concentração de asparagina em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##), e estrelas indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,001$, ***).

Figura 72. Concentração de argininosuccinato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os

resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

Figura 73. Concentração de fumarato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 199

96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

Figura 74. Concentração de succinato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 200

96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e estrelas indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,001$, ***; $p < 0,0001$, ****).

Figura 75. Concentração de NAD⁺ em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 201

120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **).

- Figura 76.** Concentração de NADP⁺ em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média ± erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle (p < 0,05, *; p < 0,01, **; p < 0,01, ***; p < 0,0001, ****), e sinal de positivo indica a diferença entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. (p < 0,05, ⁺).
- Figura 77.** Concentração de adenosina em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média ± erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle (p < 0,05, *; p < 0,01, **; p < 0,01, ***; p < 0,0001, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR (p < 0,05, #; p < 0,01, ##), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. (p < 0,05, ⁺; p < 0,01, ⁺⁺; p < 0,001, ⁺⁺⁺; p < 0,0001, ⁺⁺⁺⁺).
- Figura 78.** Concentração de NMN em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média ± erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle (p < 0,05, *; p < 0,01, **), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR (p < 0,05, #; p < 0,01, ##; p < 0,001, ###; p < 0,0001, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. (p < 0,05, ⁺; p < 0,01, ⁺⁺; p < 0,001, ⁺⁺⁺; p < 0,0001, ⁺⁺⁺⁺).
- Figura 79.** Concentração de nicotinamida (NAM) em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média ± erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste

de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilha indica a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

- Figura 80.** Concentração de 2-L-hidroxioglutarato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###), e sinal de positivo indica a diferença entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +).
- Figura 81.** Concentração glutamina/glutamato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++).
- Figura 82.** Destinos metabólicos da glutamina (Figura retirada de ALTMAN et al., 2016).
- Figura 83.** Correlação de Pearson entre concentrações de adenosina e AMP das células BEAS-2B expostas por 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P (pontos vermelhos), B[a]P+ NR (pontos azuis), NR (pontos laranja) e grupo controle (pontos pretos).
- Figura 84.** Correlação de Pearson entre concentrações de nicotinamida e nicotinamida mononucleotídeo (NMN) das células BEAS-2B expostas por 120, 144 e 168 h a B[a]P (pontos vermelhos), B[a]P+NR (pontos azuis), NR (pontos laranja) e grupo controle (pontos pretos).

- Figura 85.** Área cumulativa sob a curva das moléculas quantificadas nas células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle ao longo de 168 h. Após obtenção da $AUC_{(0-168)}$ foi realizada análise estatística entre todos os grupos (controle *versus* B[a]P; controle *versus* B[a]P+NR; controle *versus* NR; B[a]P *versus* B[a]P+NR; B[a]P+NR *versus* NR) utilizando o *t test* pareado. 215
- Figura 86.** Proteínas totais de células BEAS-2B ao longo das 168 h de incubações com B[a]P (1 μ M), B[a]P (1 μ M) + NR (1 μ M), NR (1 μ M) e do grupo controle. As análises foram feitas em intervalos de 24 h durante 7 dias, utilizando o método de Bradford. Os resultados representam a média \pm erro padrão de quintuplicata experimental. 219
- Figura 87.** Concentrações de malonaldeído no meio de crescimento das células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e estrelas indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,001$, ***; $p < 0,0001$, ****). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas. 221
- Figura 88.** $AUC_{(0-120)}$ de MDA nas células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle ao longo de 120 h. Após obtenção da $AUC_{(0-120)}$ foi realizada análise estatística entre todos os grupos (controle *versus* B[a]P; controle *versus* B[a]P+NR; controle *versus* NR; B[a]P *versus* B[a]P+NR; B[a]P+NR *versus* NR) utilizando o *t test*. 222
- Figura 89.** Atividade de PARP1 em células BEAS-2B expostas por 120 e 168 h a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas. 224
- Figura 90.** Visão geral das expressões de genes regulados pelo correpressor transcricional CtBP nas células BEAS-2B expostas por 48, 120 e 168 h a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. São apresentadas as médias ao longo do tempo. As maiores expressões gênicas em cada linha são apresentadas na cor vermelha intensa. 228

- Figura 91.** Expressão gênica de *CDHI* (E-caderina) nas células expostas a B[a]P, 228
B[a]P+NR, NR e grupo controle por 48, 120 e 168 h. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental, onde a expressão relativa de mRNA foi obtida por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene normalizador a β -actina. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas.
- Figura 92.** Expressão gênica da fosfatase PTEN nas células expostas a B[a]P, 229
B[a]P+NR, NR e grupo controle por 48, 120 e 168 h. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental, onde a expressão relativa de mRNA foi obtida por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene normalizador a β -actina. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas.
- Figura 93.** Expressão gênica de *CDKN2A* [p16(ink4a)] nas células expostas a B[a]P, 229
B[a]P+NR, NR e grupo controle por 48, 120 e 168 h. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental, onde a expressão relativa de mRNA foi obtida por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene normalizador a β -actina. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas.
- Figura 94.** Expressão gênica de semaforina 3F nas células expostas a B[a]P, 230
B[a]P+NR, NR e grupo controle por 48, 120 e 168 h. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e ou quintuplicata experimental, onde a expressão relativa de mRNA foi obtida por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene normalizador a β -actina. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus*

B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas.

- Figura 95.** Expressão gênica de NAMPT nas células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle por 48, 120 e 168 h. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental, onde a expressão relativa de mRNA foi obtida por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene normalizador a β -actina. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas. 233
- Figura 96.** Expressão gênica de NMRK1 (NRK1) nas células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle por 48, 120 e 168 h. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata experimental, onde a expressão relativa de mRNA foi obtida por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene normalizador a β -actina. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas. 233
- Figura 97.** Atividade de SIRT1 em células BEAS-2B expostas por 24, 72, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão médio de quadruplicata técnica. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++). 237

Figura 98. Modulação de processos celulares devido ao aumento da razão AMP/ATP 239 e subsequente ativação de AMPK em condições de estresse energético.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Fragmentações e energias utilizadas para análises dos níveis de metilação e hidroximetilação do DNA de células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula; Q1 e Q3: quadro polo 1 e 3).	97
Tabela 2.	Fragmentações e energias que serão utilizadas para quantificação de metabólitos intermediários em células BEAS-2B expostas a B[a]P, B[a]P + NR e NR, e do grupo controle (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula; Q1 e Q3: quadro polo 1 e 3).	100
Tabela 3.	Fragmentações e energias utilizadas para quantificação de metabólitos (Método 2.1) em células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula; Q1 e Q3: quadro polo 1 e 3).	104
Tabela 4.	Fragmentações e energias utilizadas para quantificação de metabólitos (Método 2.2) em células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula; Q1 e Q3: quadro polo 1 e 3).	105
Tabela 5.	Fragmentações e energias utilizadas para quantificação de metabólitos (Método 2.3) em células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).	106
Tabela 6.	Parâmetros dos modelos de PCA.	107
Tabela 7.	Intensidade de absorvância da solução aquosa de NR estocada a -80 °C durante 3 meses.	118

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ADK: adenosina quinase

ADP: adenosina difosfato

AFB1: aflatoxina B1

AGEs: *advanced glycation end-products*

AhR: receptores de hidrocarbonetos aromáticos

AKT: *protein kinase B*

ALEs: *advanced lipoxidation end-products*

AMP: adenosina monofosfato

AMPK: proteína quinase ativada por AMP

ARHs: ADP-ribosil-hidrolases

ArNT: *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*

ARTs: ADP-ribosiltransferases

ATP: adenosina trifosfato

AUC: área cumulativa sob a curva em determinado intervalo de tempo

B[a]P: benzo[a]pireno

BAK: Bcl2 antagonist/killer 1

BAX: *Bcl-2 associated X*

BEAS-2B: células epiteliais bronquiais humanas imortalizadas

BEGM: *Bronchial Epithelial Grow Medium*

BER: *base excision repair*

BPDE: B[a]P-7,8-diol-9,10-epóxido

CDH1: cadherin 1

cDNA: DNA complementar

CEdG: *N*²-(1-carboxietil)-2'-desoxiguanosina

CO₂: dióxido de carbono

CpG: citosina-fosfato-guanina

CS: síndrome de Cockayne

CtBP: *C terminal-binding protein*

CVC: corante cristal violeta

DAD: detector arranjos de fotodiodos

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNMT1: DNA metiltransferase 1

DNPH: dinitrofenolhidrazina

EMT: *epithelial-mesenchymal transition*

ERK: *extracellular signal-regulated kinases*

ERK: *extracellular signal-regulated kinases*

FAD: flavina adenina dinucleoideo

FOXO: fator de transcrição *Forkhead-O-box*

GLS: glutaminase

GLUD: glutamato desidrogenase

GOT2: transaminase glutâmica oxaloacética

GPx: glutationa peroxidase

GSH: glutationa

GST: glutationa-S-transferase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

hEGF: *human epidermal growth factor*

HIF: fator de transcrição induzível por hipóxia

HPAs: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HPLC: *high performance liquid chromatography*

HPLC-ESI-Q-TOF: HPLC acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadupolo-tempo-de-vôo e ionização por electrospray

HPV: *human papillomavirus*

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IDH1: isocitrato desidrogenase 1

KRAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

MDA: malonaldeído

mdG: N^2 -7-bis(1-hidroxi-2-oxopropil)-2'-desoxiguanosina

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

MTP-9: metaloproteinase-9

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)

MYC: myelocytomatosis oncogene

NAD⁺: forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH: forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP⁺: forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH: forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NAM: nicotinamida

NAMPT: nicotinamida fosforribosiltransferase

NMN: nicotinamida mononucleotídeo

NR: nicotinamida ribosídeo

NRK: nicotinamida ribosídeo quinase

NSCLC: *non small cell lung cancer*

O₂^{•-}: ânion radical superóxido

OMS: Organização Mundial da Saúde

p16: inibidor 2A de quinase dependente de ciclina

PARG: poli-ADP-ribose-glico-hidrolase

PARPs: poli(ADP-ribose)polimerases

PBS: *phosphate buffered saline*

PCA: análise de componentes principais

PCR-RT: *polymerase chain reaction real time*

PKD1: piruvato desidrogenase quinase 1

PGC-1 α : coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma

PHD: prolil-hidroxilases

PI: iodeto de propídio

PI: padrão interno

PI3K: *phosphatidylinositol-3-kinase*

PKM2: piruvato quinase M2

PPAR γ : receptor ativado por proliferador de peroxissoma

PTEN: *phosphatase and tensin homolog*

r: *coeficiente de correlação*

RAS: rat sarcoma viral oncogene homolog

RIN: *RNA integrity number*

RIPA: tampão de radio imunoprecipitação

RNA: ácido ribonucleico

ROS: espécies reativas de oxigênio

SAH: S-adenosil-homocisteína

SAH: S-adenosil-homocisteína

SCLC: *small cell lung câncer*

SiNPs: nanopartículas de sílica

SIRT6: siruínas

SOD: superóxido dismutase

TCA: tricarboxylic acid cycle

TET: *ten-eleven-translocation*

XP: síndrome Xeroderma Pigmentosum

XTT: ,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]2H-tetrazólio-5-carboxanilida de sódio

5-hmC: 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina

5-mC: 5-metil-2'-desoxicitidina

8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	47
1.1. Epidemiologia do câncer de pulmão e tabagismo	47
1.2. Fisiopatologia do câncer de pulmão	48
1.3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).....	49
1.4. Benzo[<i>a</i>]pireno (B[<i>a</i>]P)	50
1.5. Lesões de DNA, ativação de PARPs e possíveis alterações no metabolismo celular ..	56
1.7. Manutenção das concentrações intracelulares de NAD ⁺	60
1.8. Metabolismo regulando a sinalização celular no processo de tumorigênese.....	63
1.9. Controle epigenético na carcinogênese.....	71
1.10. Estudos de transformação utilizando as células BEAS-2B e B[<i>a</i>]P	74
1.11. Quimioprevenção e estudos envolvendo B[<i>a</i>]P.....	75
2.JUSTIFICATIVA	77
3. OBJETIVOS.....	78
3.1. OBJETIVO GERAL	78
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	79
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	80
4.1. Reagentes e Insumos.....	80
4.2. Equipamentos básicos.....	81
4.3. Técnicas empregadas neste trabalho	81
4.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	81
4.3.2. HPLC-DAD.....	82
4.3.4. HPLC-ESI-MS/MS	82
4.3.4. Citometria de fluxo.....	83
4.3.5. Western blot	83
4.3.6. PCR-RT.....	84
4.4. Delineamento do modelo experimental	84
4.4.1. Linhagem BEAS-2B	84
4.4.2. Desenho do modelo experimental.....	85
4.4.3. Nicotinamida ribosídeo (NR).....	86
4.4.4. Estabilidade da nicotinamida ribosídeo no meio de cultura.....	86
4.4.5. Ensaio de citotoxicidade	87

4.4.5.1. Análise do crescimento e sobrevivência celular após a exposição a NR	87
4.4.5.2. Análise da atividade mitocondrial após a exposição à NR.....	88
4.4.5.2.1. Ensaio com o XTT	88
4.4.5.2.2. Ensaio com MTT	88
4.6.1. Análise da viabilidade celular pela coloração com azul de tripan	89
4.4.7. Análise do ciclo celular	89
4.4.8. Análise do tipo de morte celular por citometria de fluxo.....	90
4.4.9. Análise do consumo de glicose	92
4.4.10. Formação de colônias em <i>Soft-agar</i>	92
4.4.11. Extração do DNA das células após 168 h de exposição	93
4.4.11.1. Hidrólise do DNA para as análises de 5-mC e 5-hmC	94
4.4.11.2. Quantificação de 5-mC e 5-hmC por HPLC-ESI-MS/MS	95
4.4.12. Quantificação dos metabólitos intracelulares.....	97
4.4.13. Análise de componentes principais	105
4.4.14. Análise da área cumulativa sob a curva	106
4.4.15. Atividade de SIRT1.....	106
4.4.15.1. Extração de proteínas para análise da atividade de SIRT1	107
4.4.15.2. Quantificação da atividade de SIRT1	107
4.4.16. Atividade de PARP1	108
4.4.16.1. Extração de proteínas para análise da atividade de PARP1	108
4.4.16.2. Ensaio para quantificação da atividade de PARP1.....	109
4.4.17. Quantificação de malonaldeído no meio de cultura por HPLC-DAD	109
4.4.17.1. Análise de MDA no meio de cultura	110
4.4.18. Quantificação de proteínas totais	110
4.4.19. Extração de RNA para as análises de expressão gênica.....	111
4.4.19.1. Obtenção de cDNA para as análises de expressão gênica.....	112
4.4.19.2. Reação de PCR em tempo real	113
4.4.20. Ensaio para avaliar a contaminação com <i>Mycoplasma</i> sp da linhagem de células BEAS-2B.....	113
4.4.21. Análise da expressão da proteica ciclina B1	114
4.4.22. Análise estatística.....	115
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	117

5.1. Obtenção da nicotinamida ribosídeo.....	117
5.2. Análise da estabilidade de NR no meio de cultura	119
5.3. Citotoxicidade da NR em células BEAS-2B	120
5.4. Análise da viabilidade celular: coloração com azul de tripan.....	131
5.5. Análise do ciclo celular.....	132
5.6. Análise da viabilidade e tipo de morte celular por citometria de fluxo	140
5.7. Análise da formação de colônias em meio semissólido <i>soft-agar</i>	158
5.8. Quantificação de 5-mC e 5-hmC no DNA de células BEAS-2B após 168 h das exposições	163
5.9. Análise da taxa de consumo de glicose.....	165
5.10. Análises dos metabólitos intracelulares	167
5.11. Quantificação de proteínas totais	219
5.12. Análise do estresse redox.....	220
5.13. Atividade de PARP1	224
5.14. Análises de expressão gênica.....	227
5.15. Análise da atividade de SIRT1	236
6. CONCLUSÃO.....	240
7. PERSPECTIVAS	241
8. REFERÊNCIAS	242
9. ANEXOS	263

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia do câncer de pulmão e tabagismo

O câncer de pulmão é um dos tipos mais comuns e a principal causa mundial de mortes por câncer (18,4% do total de mortes por câncer). A última estimativa mundial (2020) apontou uma incidência de mais de 2,2 milhões de novos casos, sendo que deste total, 68,88% corresponde aos casos em homens e 31,12% em mulheres (SUNG et al., 2021). Além disso, o câncer de pulmão foi responsável por aproximadamente 1,8 milhões de mortes em 2020. Estudos longitudinais demonstram que desde 1985 o câncer de pulmão lidera em número de mortes, e em 2020, pela primeira vez a incidência de números de casos de câncer de mama em mulheres (11,7 %) ultrapassou os casos de câncer de pulmão (11,4 %) (BRAY et al., 2018; BARTA; POWELL; WISNIVESKY, 2019; SUNG et al., 2021).

A incidência e morte por câncer de pulmão estão intimamente ligadas aos padrões de tabagismo, mas exposições a outros carcinógenos ocupacionais e ambientais, tais como asbestos, arsênio, radônio, cromo, cádmio e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, dentre outros, também favorecem seu desenvolvimento (JEMAL et al., 2011; BARTA; POWELL; WISNIVESKY, 2019).

Países industrializados como Estados Unidos e Reino Unido apresentaram redução significativa na incidência e nas taxas de mortalidade de câncer de pulmão nas últimas três décadas. Por outro lado, países como Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul (os denominados BRICS) continuam a ter altas taxas de tabagismo. Esses países apresentam menor incidência de câncer, mas existe uma maior taxa de mortalidade em comparação com países desenvolvidos (BARTA; POWELL; WISNIVESKY, 2019). As razões para esses padrões incluem o acesso desigual aos cuidados de saúde, mas também está associado à dificuldade de diagnóstico precoce e à refratividade dos estágios avançados aos tratamentos convencionais. Dessa forma, importantes avanços no tratamento podem surgir a partir de uma melhor compreensão das origens moleculares da doença e de alterações celulares subjacentes à transformação e à multiplicação das células pré-neoplásicas (DAMIANI et al., 2008; SCRIMA et al., 2012; BARTA; POWELL; WISNIVESKY, 2019).

1.2. Fisiopatologia do câncer de pulmão

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 90% dos casos das neoplasias pulmonares podem ser classificadas em dois tipos histológicos: câncer de pulmão de pequenas células (SCLC, do inglês *small cell lung cancer*) e câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC, do inglês *non small cell lung cancer*). Em números gerais, os casos de SCLC correspondem a 15% dos tumores e os NSCLC apresentam maior incidência, aproximadamente 85% dos casos de câncer de pulmão (INAMURA, 2017).

A classificação histológica leva em consideração as diferenças na localização anatômica, nas manifestações clínicas, na ocorrência de metástases e na eficácia terapêutica (TRAVIS, 2011). Cada um dos tipos histológicos tem origem e história natural distinta, além disso, apresentam respostas diferentes ao tratamento (INAMURA, 2017).

Os NSCLC são subclassificados em carcinoma de células escamosas (SqCC, do inglês *squamous cell carcinoma*), adenocarcinoma e carcinoma de células grandes. Ao longo das últimas décadas, a proporção de SqCC, que costumava ser o subtipo predominante, tem reduzido. Em contrapartida, os casos de adenocarcinoma aumentaram em ambos os sexos. Paralelamente, vem sendo observado que os casos de SCLC estão diminuindo (TRAVIS, 2011; INAMURA, 2017).

Em geral, os NSCLC manifestam-se como pequenos nódulos ou massas pulmonares periféricas, que estão associados frequentemente ao acometimento pleural. Já os SCLC são identificados como massas centrais com crescimento endo brônquico (TRAVIS, 2011; INAMURA, 2017). Outra característica importante da carcinogênese pulmonar é que os sinais e sintomas são muito semelhantes aos de outras enfermidades com menos letalidade, tais como: tosse alérgica, hemoptise, sibilos, estridor, dispneia e perda de peso. Estima-se que apenas 5 a 15 % dos casos de câncer de pulmão são detectados na fase assintomática da doença. Tais características diminuem a chance de diagnóstico precoce, onde ações curativas seriam mais vantajosas em termos de sobrevida (TRAVIS, 2011).

1.3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) representam um grupo de mais de 100 compostos orgânicos. A estrutura molecular é formada por núcleos condensados, constituídos exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio na forma de anéis aromáticos. Os HPAs são provenientes de processos de combustão incompleta ou pirólise da matéria orgânica e são encontrados na natureza como contaminantes no solo, água, ar atmosférico e alimentos. Os HPAs são contaminantes ambientais de interesse toxicológico, por apresentar propriedades carcinogênicas e mutagênicas para homens e animais (CARUSO; ALABURDA, 2008, IARC, 2012).

A formação pirolítica de HPAs é complexa e muito variável, sendo totalmente dependente das condições reacionais. Atualmente, o mecanismo aceito envolve reações de polimerização via radicais livres, em várias etapas até a formação de núcleos aromáticos condensados (CARUSO; ALABURDA, 2008).

Sabe-se que os HPAs são provenientes de fontes antropogênicas como queima de carvão, escapamento de veículos, óleos lubrificantes de motores e outros derivados do petróleo, além da fumaça de cigarro. Também podem ser provenientes de fontes naturais como erupções vulcânicas e queimadas espontâneas. Vale ressaltar que as fontes naturais contribuem em pequena quantidade na liberação de HPAs, diferentemente das fontes antropogênicas, que são as principais responsáveis pela emissão desses poluentes (CARUSO; ALABURDA, 2008, IARC, 2012).

O interesse nos estudos de HPAs reside no fato de muitos deles provocarem câncer em animais e mutações em bactérias. A exposição humana aos HPAs pode ser por diferentes vias, como inalação, pele ou ingestão. A ação tóxica desses compostos é decorrente do processo de biotransformação, formando produtos eletrofílicos altamente reativos. O mecanismo de biotransformação envolve a formação de epóxidos, compostos polihidroxilados, os quais são mais solúveis em água o que facilita sua eliminação na urina. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classifica as substâncias, incluindo os HPAs, de acordo com a evidência potencial de carcinogenicidade em humanos e animais experimentais (CARUSO; ALABURDA, 2008, IARC, 2012).

Os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na carcinogenicidade de uma substância envolvem várias alterações celulares. No entanto, esses mecanismos podem ser agrupados em um número pequeno de categorias. Na reunião da IARC de 2012, ficou estabelecido que uma substância é carcinogênica se apresentar uma ou mais das seguintes características: i. atua diretamente como eletrófilo ou após ativação metabólica; ii. altera a proliferação, morte celular ou o fornecimento de nutrientes; iii. altera o reparo do DNA ou causa instabilidade genômica; iv. modula efeitos mediados por receptor; v. induz alterações epigenéticas; vi. induz estresse oxidativo; vii. induz inflamação crônica; viii. atua como imunossupressor; ix. causa imortalização, e x. apresenta ação genotóxica (SMITH, et al, 2016).

Os dados de estudos mecanísticos em modelos experimentais e evidências de efeitos em humanos são utilizados na classificação pela agência. Segundo a IARC, as substâncias classificadas no grupo 1 possuem evidências suficientes de carcinogenicidade para humanos. As substâncias que pertencem ao grupo 2A apresentam evidências limitadas de carcinogenicidade para humanos, mas há evidências suficientes de carcinogenicidade para animais. No grupo 2B, são alocadas substâncias cujos dados de carcinogenicidade são limitados ou inadequados para humanos e suficientes para animais. No grupo 3 estão as substâncias que não podem ser classificadas quanto à carcinogenicidade, pois os dados de carcinogenicidade em humanos são inadequados, e em animais as informações também são inadequadas ou insuficientes. Por fim, no grupo 4 estão as substâncias que não possuem carcinogenicidade em humanos e animais experimentais (IARC, 2012).

1.4. Benzo[*a*]pireno (B[*a*]P)

B[*a*]P (**Figura 1**) é um HPA classificado como carcinógeno do grupo 1 pela IARC. O B[*a*]P está presente na fumaça do cigarro e amplamente difundido no meio ambiente devido à queima incompleta de matéria orgânica, tais como combustíveis fósseis, carvão, madeira, etc (FERECATU et al., 2010).

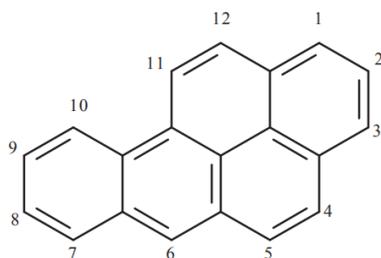


Figura 1. Estrutura química do B[a]P. B[a]P possui peso molecular de 252,31 g/mol ($C_{20}H_{12}$). Dentre suas características físico-químicas destaca-se sua coloração amarelada na forma de cristais de agulha, possui alto ponto de ebulição (312 °C), alto ponto de fusão (179 °C) e log K_{ow} de 6,35. A baixa solubilidade em água (0,00162 mg/L a 25 °C), exige que este seja solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) para realização de estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo*. Adaptado da monografia da IARC, 2012.

A exposição humana ao B[a]P pode ocorrer por ingestão, inalação e contato com a pele. A taxa e a extensão da absorção dependem das características do veículo e da absorção das partículas. A presença do B[a]P no tecido adiposo, sangue, fígado e rins, e a presença dos metabólitos no soro indicam ampla distribuição tecidual. O metabolismo ocorre em todos os tecidos, especialmente no fígado devido a alta capacidade metabólica, em seguida encontra-se a metabolização pelos pulmões, trato gastrointestinal, tecido reprodutor e pele. Produtos de biotransformação estáveis já foram identificados em diversos tecidos, além de serem detectados nas fezes e na urina, e incluem fenóis, quinonas e diidrodióis. Essas classes de metabólitos são tipicamente isoladas de conjugados de glicuronídeos ou ester de sulfatos, mas também incluem conjugados de glutathione (dentre eles as quinonas ou intermediários de éóxidos). A principal via de eliminação é pelas fezes, particularmente após a inalação. Em menor grau, observa-se a presença de metabólitos de B[a]P na urina. De modo geral o B[a]P é eliminado rapidamente, com meia vida biológica de algumas horas. Adutos dos metabólitos ativos de B[a]P com o DNA têm sido utilizados como biomarcadores de exposição em estudos mecanísticos e epidemiológicos (revisado por EPA, 2017).

Desde as primeiras observações na década de 30, diferentes vias de carcinogenicidade foram propostas para o B[a]P. Atualmente, é bem elucidado que o B[a]P é um carcinógeno completo, capaz de iniciar e promover a carcinogênese. A iniciação se deve à sua ativação metabólica para intermediários eletrofílicos reativos (**Figura 2**), tal como B[a]P-7,8-diol-9,10-epóxido (BPDE), que levam a lesões no ácido desoxirribonucleico (DNA), e subsequentemente a mutações. Durante o processo de biotransformação o B[a]P também pode ser biotransformado

a quinonas, criando um ciclo redox capaz de induzir estresse oxidativo (FERECATU et al., 2010)

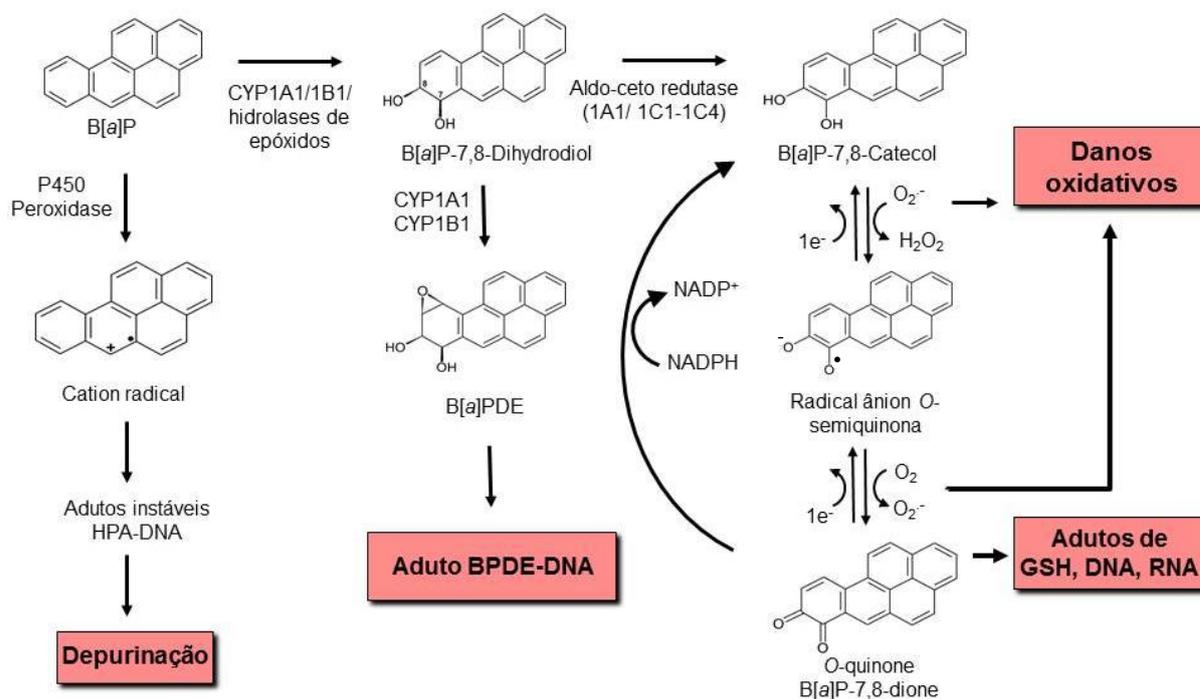


Figura 2. Principais vias de biotransformação do B[a]P. As reações enzimáticas são catalisadas pelo complexo do citocromo P450 (isoformas CYP1A1 e CYP1B1), peroxidases e alfa-ceto-redutases. Essas reações acabam gerando produtos eletrofílicos reativos (como o BPDE), que interagem com as bases do DNA, dando origem a vários adutos. Além disso, pode haver reações com resíduos de aminoácidos dando origem a diferentes tipos de lesões de proteínas. Também há relatos de lesões em ácido ribonucleico (RNA). Durante o processo de biotransformação, espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser formadas e o desbalanço redox pode acarretar dano oxidativo a várias biomoléculas. Adaptado e traduzido de KLEINOW et al., 1998.

A ocorrência de lesões de DNA ativa mecanismos de reparo e os adutos formados podem ser removidos pelo reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês nucleotide excision repair) (BERNARDO et al., 2016). Além disso, os produtos formados durante o metabolismo do B[a]P induzem quebras de dupla fita do DNA, ao mesmo tempo em que induzem o seu reparo. O reparo de quebras é realizado principalmente pela união de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês non-homologous end joining), mas também há indícios de que o reparo ocorra em menor quantidade por recombinação homóloga. No entanto, o processo de reparo não é livre de erros, e falhas no processo podem contribuir com a instabilidade genômica, o que favorece o processo de carcinogênese (TUNG et al., 2014).

A promoção do câncer por B[a]P deve-se, em parte, à geração de ROS durante o processo de biotransformação e à sua ligação a receptores de hidrocarbonetos aromáticos (AhR, do inglês *aryl hydrocarbon receptor*) que se deslocam para o núcleo e se ligam a regiões promotoras de genes alvos, com subsequente alteração da expressão de genes relacionados à biotransformação, proliferação celular e metabolismo energético (FERECATU et al., 2010; BORTOLI et al., 2018). A **Figura 3** demonstra o processo de ativação de AhR, e consequente modulação da expressão gênica.

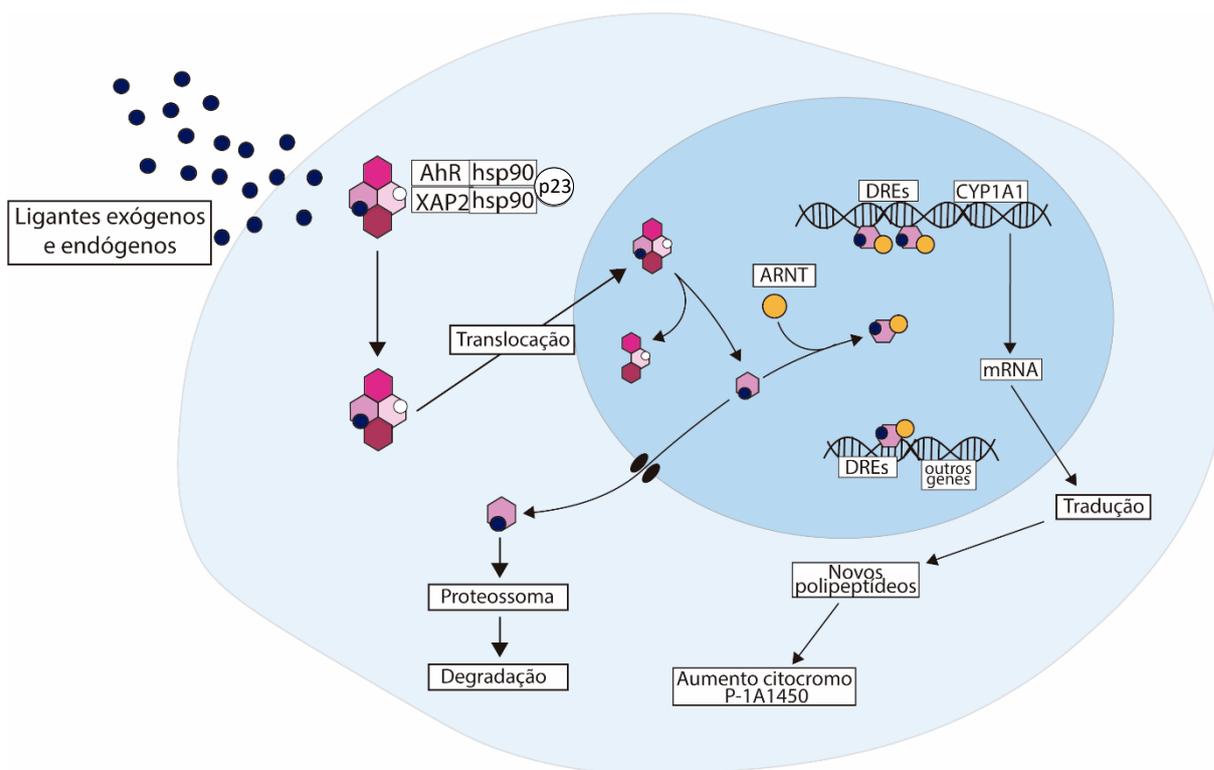


Figura 3. Mecanismo de ativação do receptor AhR. B[a]P ativa o AhR estimulando a dissociação das proteínas associadas ao AhR. O complexo é constituído pelas proteínas AhR, HSP90 (do inglês *heat shock protein 90*), XAP2 (do inglês *pregnane x receptor*) e p23 (do inglês *protein 23 kDa*). Subsequentemente, o complexo B[a]P-AhR é translocado para o núcleo, onde este se dimeriza com o translocador nuclear de AhR (ARNT). Esse heterodímero se liga a regiões responsivas a xenobióticos (XRE, do inglês *xenobiotic responsive element*, 5'-GCGTGA-3') e altera a expressão de genes relacionados a biotransformação, proliferação e metabolismo energético. Traduzido e adaptado de DENILSON et al., 2002 e ROTHHAMMER; QUINTANA, 2019.

A geração de ROS no processo de biotransformação do B[a]P também pode favorecer a ocorrência de lesões no DNA, como a lesão mutagênica 8-oxo-7,8-dihidro-2'-

desoxiguanosina (8-oxodG) largamente utilizada como marcador de estresse oxidativo em estudos epidemiológicos e mecânicos (BIANCHINI et al., 2001; CADET et al., 2008).

Os ácidos graxos poli-insaturados também são importantes alvos para os oxidantes, gerando substâncias genotóxicas como malonaldeído, acetaldeído e acroleína que têm implicações na integridade do DNA (AUGUSTO, 2006). Dentre os adutos de DNA resultantes do processo de peroxidação lipídica encontram-se os 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N²-εdG), 1,N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N⁶-εdA) e o aduto cíclico pirimidopurinona formado com a desoxiguanosina (M1dG) (LOUREIRO; MACIO; MEDEIROS, 2002; MEDEIROS 2009). Um esquema exemplificado do processo de peroxidação lipídica é elucidado na **Figura 4**.

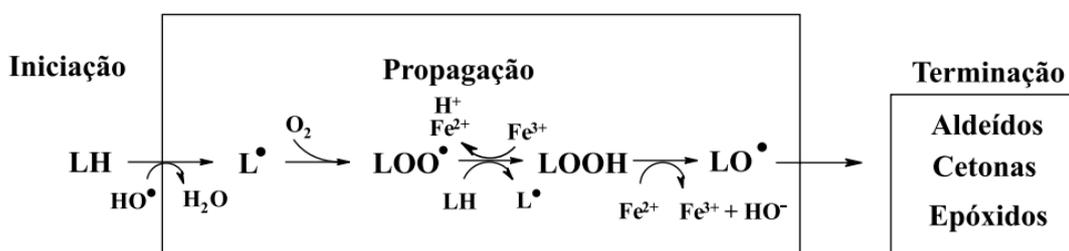


Figura 4. Processo de peroxidação lipídica. Na fase de iniciação, um radical reativo (exemplo: radical hidroxila) remove hidrogênio do ácido graxo insaturado presente no lipídio de membrana, produzindo um radical lipídico (L^\bullet). Este radical, por sua vez, reage com o oxigênio molecular, formando um radical peróxido (LOO^\bullet), que abstrai hidrogênio de outro lipídio. Na fase de propagação, forma-se um hidroperóxido lipídico (LOOH) e outro L^\bullet que reage com o oxigênio, e assim sucessivamente. Na fase de terminação, dois radicais acabam se combinando e formam um não radical. LOOH pode sofrer outras reações, que na sua maioria são degradativas e acabam produzindo aldeídos e alcanos de diferentes reatividades e massas moleculares. Adaptado de LOUREIRO; Di MASCIO; MEDEIROS, 2002 e AUGUSTO, 2006.

Produtos finais de lipoxidação avançada do DNA e proteínas (ALEs, do inglês *advanced lipooxidation end-products*) estão envolvidos no desenvolvimento e progressão de doenças, como câncer, diabetes, aterosclerose e neurodegeneração (PAMPLONA, 2011; VISTOLI et al., 2013). Paralelamente aos ALEs, produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycation end-products*) são gerados por reações de macromoléculas com açúcares ou seus produtos de degradação. Estresse oxidativo tem frequentemente um papel na formação de AGEs, que contribuem ciclicamente para o seu aumento (VISTOLI et al., 2013). N^ε-(carboximetil)lisina, por exemplo, é formada pela reação de proteínas com glioxal originado a partir da oxidação de glicose ou lipídios, sendo biomarcador de AGE ou ALE em tecidos

(TESSIER, 2010; VISTOLI et al., 2013). Nos últimos 30 anos foi evidenciado que o DNA também é um alvo para compostos carbonílicos reativos derivados de açúcares, abrindo a possibilidade de explorar DNA AGEs como possíveis biomarcadores de glicoxidação e em terapia anti-AGEs (AHMAD et al., 2011). Compreender o papel de DNA AGEs nuclear e mitochondrial na fisiopatologia é um foco recente de pesquisa (BIDMON; FRISCHIMANN; PISCHETSRIEDER, 2007; BREYER et al., 2008). Os principais DNA AGEs são N^2 -(1-carboxietil)-2'-desoxiguanosina (CEdG) e o aduto cíclico N^2 -7-bis(1-hidroxi-2-oxopropil)-2'-desoxiguanosina (metilglioxal-dG ou mdG), dentre outros resultantes principalmente da reação de glicose, glicose-6-fosfato, glioxal, ácido ascórbico e 3-desoxiglucosona com o grupo amino exocíclico da guanina (BIDMON; FRISCHIMANN; PISCHETSRIEDER, 2007). O acúmulo de CEdG no DNA pode levar à diminuição da expressão gênica, da atividade de proteínas (BREYER et al., 2008), e ao aumento de mutações (TAMAE et al., 2011), efeitos que são relacionados ao desenvolvimento de doenças.

1.5. Lesões de DNA, ativação de PARPs e possíveis alterações no metabolismo celular

Seguindo a teoria da mutação somática para a carcinogênese química, o câncer se inicia pelo ataque de substâncias endógenas, xenobióticos, ou seus produtos de biotransformação às bases do DNA. Ao longo do processo evolutivo surgiram enzimas capazes de reparar esses danos, sendo que falhas nesse processo antes da próxima divisão celular podem levar a mutações que, ocorrendo em genes supressores de tumor e proto-oncogenes, favorecem o desenvolvimento de tumores. Sabe-se, no entanto, que nem todas as células mutadas originam tumores, sendo necessárias duas etapas adicionais, a promoção e a progressão (**Figura 5**), para que o câncer se desenvolva. Tais etapas envolvem a expansão reversível das células iniciadas, seguida pela indução de alterações adicionais no DNA, instabilidade genética aumentada, perda do controle de crescimento, invasão de tecidos e metástase (KLAUNIG et al., 2011).

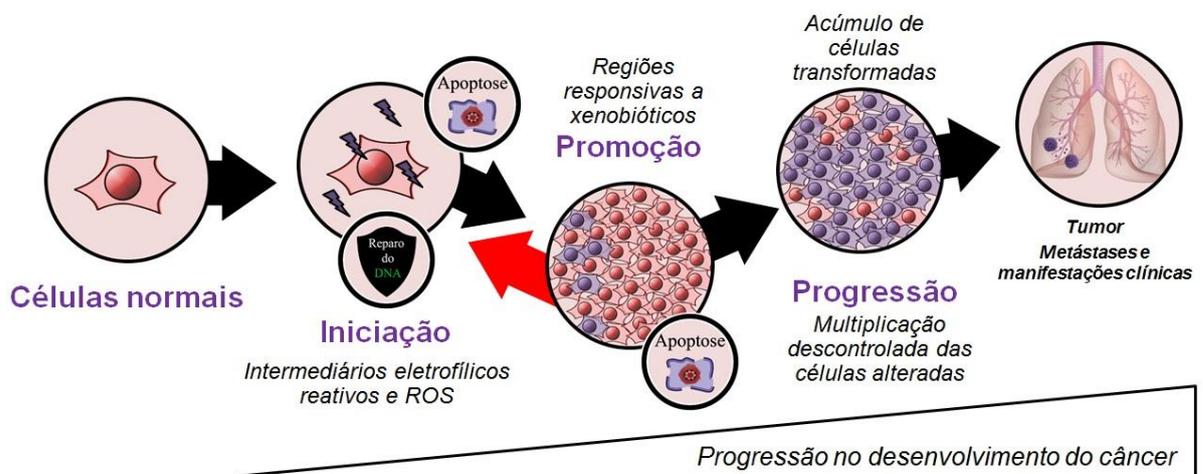


Figura 5. Processo de transformação maligna: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é causada por alterações irreversíveis na estrutura do DNA. Nessa etapa vários mecanismos de regulação contribuem para a proteção contra o processo de iniciação do câncer. Os principais pontos de regulação são os mecanismos de detoxificação de xenobióticos, o processo de reparo de lesões de DNA e a eliminação das células que apresentem o DNA modificado. A promoção envolve a dentre outros processos a seleção e expansão das células iniciadas, o que pode levar ao desenvolvimento de um tumor benigno. Durante a promoção existe alterações na expressão de diversos genes que regulam a diferenciação, crescimento e metabolismo celular. Já no estágio final da carcinogênese (fase de progressão do câncer) alterações adicionais na estrutura do DNA, como por exemplo, nos genes supressores de tumor e de proto-oncogenes são as

alterações mais proeminentes. Por fim a conversão de tumores benignos para malignos é acompanhada principalmente por perda do controle do crescimento, invasão dos tecidos adjacentes, metástase e instabilidade genética aumentada. Adaptado de LOUREIRO; Di MASCIO; MEDEIROS, 2002; MURATA, 2018.

Nessa linha de investigação, a ocorrência de lesões no DNA acarreta a ativação de enzimas ADP-ribosiltransferases ou poli(ADP-ribose)polimerases (ARTs ou PARPs) que se ligam a sítios de quebra do DNA e catalisam reações de mono ou poli(ADP-ribosil)ação pela transferência sucessiva de ADP-ribose da nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD^+) para resíduos de aminoácidos (lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico) das proteínas alvo, liberando nicotinamida (NAM). As enzimas PARP1, PARP2 e PARP3 estão envolvidas em vias de reparo de DNA, e esse processo de reparo pode levar à depleção dos *pools* intracelulares de NAD^+ e, em casos extremos, à morte celular (FOUQUEREL; SOBOL, 2014). A liberação de ADP-ribose das proteínas mono- ou poli-ADP-ribosiladas ocorre pela ação de enzimas ADP-ribosil-hidrolases (ARHs) e poli-ADP-ribose-glico-hidrolase (PARG), permitindo que essa modificação pós-traducional e os efeitos decorrentes sejam reversíveis (KOCH-NOLTE et al., 2011). Uma representação esquemática da formação desses polímeros de ADP-ribose é representada na **Figura 6**.

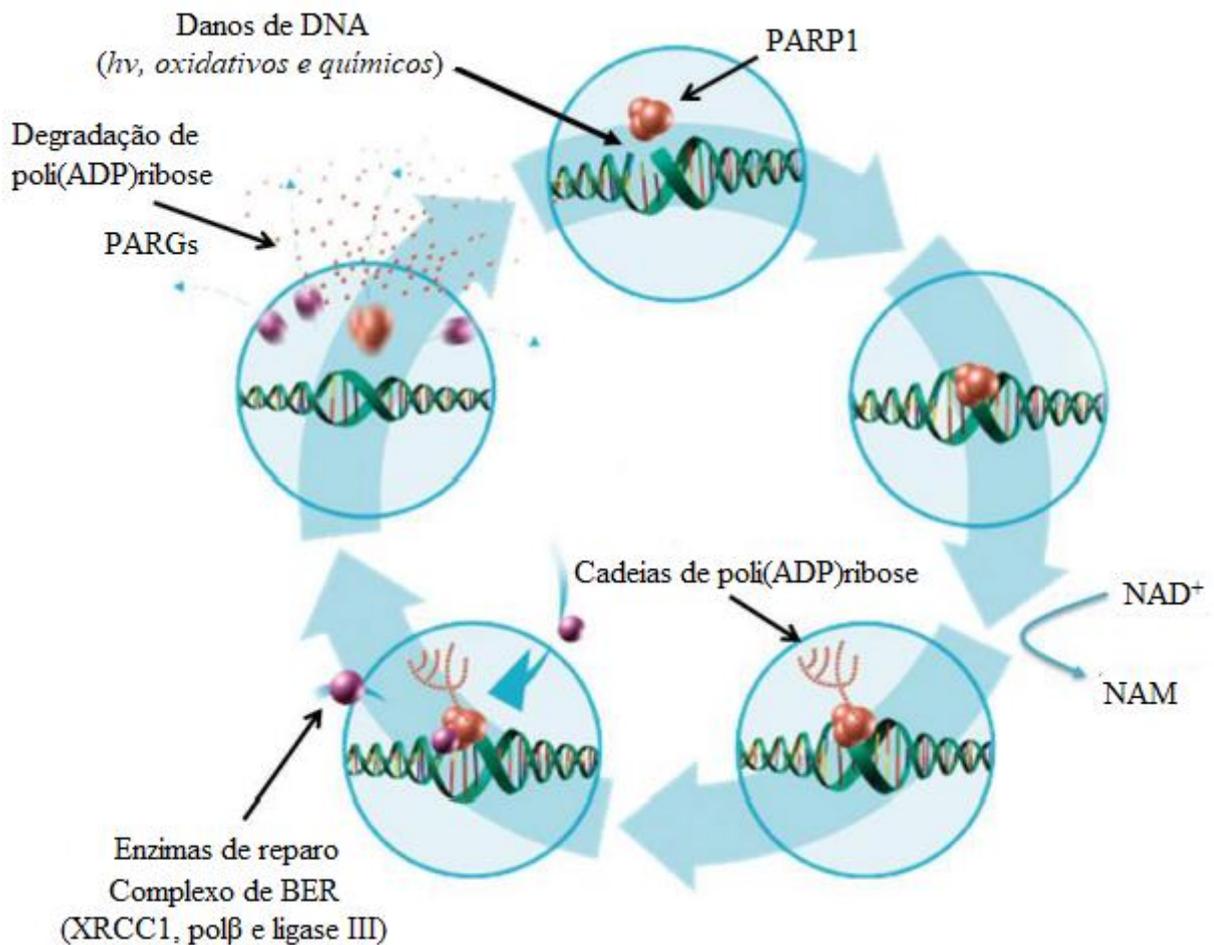


Figura 6. Ativação de PARP1 no processo de reparo de lesões de DNA. A PARP1 possui sítio de ligação que reconhece danos ao DNA. Após reconhecer as lesões no DNA inicia-se o processo de homodimerização. Nessa etapa, o NAD^+ é utilizado como substrato para produzir polímeros lineares e ramificados de unidades de ADP-ribose, liberando constantemente NAM. A poli(ADP)ribosilação ocorre na própria PARP1 (automodificação) ou na matriz de proteínas nucleares. Esses sítios de (ADP)ribosilação amplificam o processo de reparo por meio da descondensação da cromatina e da remodelação dos nucleossomos, aumentando a acessibilidade de proteínas de reparo de excisão de bases (BER, do inglês *base excision repair*). O complexo proteico de BER é formado pelas proteínas XRCC1 (do inglês *X-ray repair cross-complementing*), pol β (do inglês *DNA polymerase β*) e pela DNA ligase III no DNA danificado. Traduzido e adaptado de SINGH et al., 2013; TOSS; CORESI, 2013.

A ativação de PARP1 foi verificada em cultura de células BEAS-2B expostas a B[a]P (5 μ M, 24 h), concomitantemente à indução de ROS, formação de adutos de DNA, parada do ciclo celular em G2/M e apoptose (ZHU et al., 2014). Em outro estudo com células BEAS-2B houve aumento linear de adutos de DNA entre 3 e 48 h de incubação com 2,5 μ M e 5 μ M de B[a]P (POHJOLA et al., 2003). Células de carcinoma hepatocelular humano expostas a B[a]P sofreram necrose via ativação de PARP1 e depleção de NAD⁺ (LIN; YANG, 2008). Dessa forma, observa-se a existência de uma ligação entre a ocorrência de lesões no DNA, o reparo dessas lesões, e alterações no metabolismo intermediário.

As concentrações intracelulares de NAD⁺ e NADH têm papel importante na regulação da atividade da via glicolítica, do ciclo do ácido tricarboxílico e da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (FOUQUEREL; SOBOL, 2014). Além da função essencial como coenzima em reações redox no metabolismo celular, NAD⁺ é um co-substrato para a atividade de ARTs ou PARPs, como apresentado acima, de sirtuínas (SIRTs), e de ADP-ribose cíclico (cADPR) sintases, como CD38 e CD157, sendo continuamente degradado por essas enzimas, liberando nicotinamida (VERDIN, 2015). Assim, NAD⁺ participa de modificações pós-traducionais de proteínas (ADP-ribosilação, desacetilação de resíduos de lisina catalisada por SIRTs) e é precursor de moléculas mensageiras, como ADP-ribose, ADP-ribose cíclico e *O*-acetil-ADP-ribose, envolvidas na mobilização de Ca²⁺ intracelular e consequente sinalização (KOCH-NOLTE et al., 2011). Está, portanto, envolvido no controle epigenético da transcrição gênica via desacetilação de histonas por SIRT1 e SIRT2, bem como na ativação de fatores de transcrição, tais como coativador 1-**alfa** do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α), receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) e *Forkhead-O-box* (FOXO), que são regulados por desacetilação catalisada por SIRT1 (KOCH-NOLTE et al., 2011). As atividades de componentes importantes da cadeia de transporte de elétrons, degradação de ácidos graxos e detoxificação de amônia são também reguladas pelas sirtuínas mitocondriais SIRT3, SIRT4 e SIRT5 (KOCH-NOLTE et al., 2011).

1.6. Manutenção das concentrações intracelulares de NAD⁺

O declínio da atividade metabólica é uma característica do processo de envelhecimento. Neste sentido, o metabolismo central de NAD⁺ está emergindo como uma importante marca do envelhecimento. Além disso, muitos estudos têm associado essas alterações à instabilidade genômica e ao declínio metabólico, que estão por sua vez diretamente relacionadas com o desenvolvimento de doenças como obesidade, diabetes e câncer (DEMAREST et al., 2019).

No câncer, NAD⁺ e seus principais metabólitos participam de múltiplos processos celulares que podem modular o metabolismo, sobrevivência, progressão e a invasão de células tumorais (DEMAREST et al., 2019). Estudos de correlação entre as concentrações de NAD⁺ e malignidade de tumores sólidos demonstraram que o conteúdo de NAD⁺ é inversamente relacionado ao fenótipo maligno (POLJSK, 2016). É relatado que a redução não letal das concentrações de NAD⁺ por redução da expressão da enzima nicotinamida fosforribosiltransferase em células de tumor de mama humano, levou a maior agressividade e metástase. Em contrapartida, o aumento da razão de NAD⁺/NADH utilizando os precursores nicotinamida ou ácido nicotínico inibiu a metástase em modelos de xenotransplante utilizando camundongos (SANTIDRIAN et al., 2013). Esses dados são interessantes, uma vez que a inibição química da nicotinamida fosforribosiltransferase tem sido sugerida como terapia anticâncer (OKUMURA et al., 2012; BOBROVNIKOVA-MARJON; HUROV, 2014).

O metabolismo de NAD⁺ é um ciclo redox dinâmico, que atua no transporte de elétrons na célula, mantendo a homeostase redox e bioenergética (DEMAREST et al., 2019). A manutenção de concentrações estáveis de NAD⁺ nas células é possível devido à existência de vias de salvamento da nicotinamida liberada das reações apresentadas acima, e devido à existência de vias de biossíntese de NAD⁺ a partir de suplementos dietéticos como ácido nicotínico, nicotinamida, triptofano e nicotinamida ribosídeo, como apresentado resumidamente na **Figura 7**.

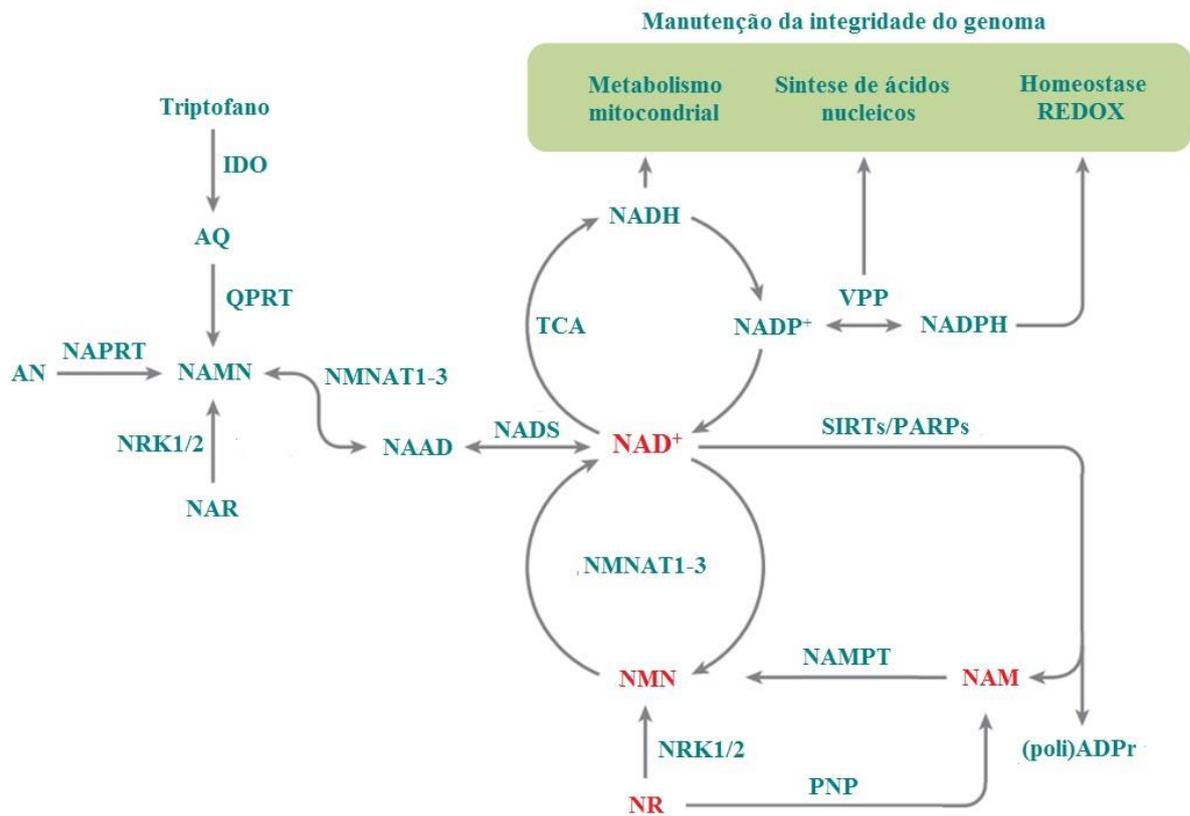


Figura 7. Vias de biossíntese responsáveis pela manutenção das concentrações intracelulares de NAD^+ . A biossíntese de NAD^+ pode ter início com a conversão de triptofano em ácido quinolínico (AQ) pela indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO). O AQ é convertido à ácido nicotínico mononucleotídeo (NAMN) pela quinolinato fosforribosiltransferase (QPRT). NAMN também é sintetizado via ribosídeo de ácido nicotínico (NAR) pela nicotinamida ribosídeo quinase 1 e 2 (NRK1/2) ou indiretamente via ácido nicotínico (AN) pela fosforribosiltransferase de nicotinato (NAPRT). O NAMN é adenilado ao dinucleotídeo de adenina do ácido nicotínico (NAAD) via adenililtransferase de nicotinamida mononucleotídeo 1-3 (NMNATs) antes da síntese de NAD^+ via NAD sintetase (NADS). O NAD^+ é reduzido pelas enzimas do ciclo de Krebs (TCA, do inglês *tricarboxylic acid cycle*) para NADH, que atua como principal doador de elétrons para o complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. A produção de NADPH pela via das pentoses (VPP) é crítica para a síntese de nucleotídeos e para os sistemas endógenos que atuam na defesa antioxidante. As sirtuínas e as PARPs consomem NAD^+ para produzirem ADP ribose, liberando nicotinamida, que pode ser reciclada para NMN pela enzima nicotinamida fosforribosiltransferase (NAMPT), e adenilada para NAD^+ por (NMNATs). A nicotinamida ribosídeo produz constantemente NAD^+ por duas vias de metabolização. A produção pode ser via NRK que produz NMN, e subsequentemente, é convertido a NAD^+ . Além disso, NR pode ser metabolizada a NAM via PNP (purina nucleosídeo fosforilase), e logo em seguida sofre reações via NAMPT e NMNAT para formar NAM e NAD^+ respectivamente. Traduzido e adaptado de DEMAREST et al., 2019.

Estudos avaliando a modulação do *pool* intracelular de NAD⁺ por meio da suplementação com NR têm demonstrado efeitos promissores sobre o metabolismo celular (MARTENS et al., 2018). NR é um potente precursor de NAD⁺ em células de mamíferos, fungos e bactérias (YANG et al., 2007). A suplementação de diferentes linhagens de células como Neuro2a (neuroblastoma), HEK293 (rim de embrião humano) e AB1 (células tronco embrionárias de camundongo) com NR, foi capaz de aumentar em até 2 vezes a concentração intracelular de NAD⁺, sem indução de citotoxicidade, o que possibilita o estudo de respostas celulares a essa modulação (YANG et al., 2007). Também foi verificado um aumento de 2 vezes nas concentrações mitocondriais de NAD⁺ em células HEK293T incubadas com 500 µM de NR por 4 horas, o que é particularmente importante para a atividade mitocondrial (CANTÓ et al., 2012). Estudos clínicos também já foram realizados e demonstram que a suplementação oral com doses entre 250 e 1000 mg/dia é capaz de aumentar de modo dose dependente as concentrações plasmáticas ao longo do tempo, sendo que o aumento pode atingir 2,7 vezes as concentrações iniciais (MARTENS et al., 2018; RAJMAN et al., 2018).

Também é descrito que NR aumenta a atividade das sirtuínas SIRT1 (nuclear) e SIRT3 (mitocondrial) em cultura de células e *in vivo*, via aumento da biodisponibilidade de NAD⁺, o que leva à desacetilação e ativação de alvos, como FOXO1, PGC-1α e SOD2 (MnSOD mitocondrial) (CANTÓ; AUWERX, 2012). FOXO1 e PGC-1α são alvos de SIRT1, enquanto SOD2 é alvo de SIRT3. Dentre os genes com transcrição regulada por FOXO1 estão *Gadd45* (do inglês *growth arrest and DNA damage-inducible 45*), *catalase* e *superóxidos dismutases* (*Sod1* (*CuZn-Sod*) e *Sod2*). Por sua vez, PGC-1α é um regulador transcricional da biogênese mitocondrial (CANTÓ; AUWERX, 2012). Assim, é verificado que a suplementação com NR aumenta o número e atividade das mitocôndrias, além de defesas antioxidantes, nos tecidos capazes de metabolizar NR para NAD⁺. Esse efeito é associado a maior gasto energético e proteção contra dano metabólico (CANTÓ, AUWERX, 2012).

Em modelo de camundongos geneticamente modificados, foi verificado que a expressão da proteína hepática oncogênica URI (do inglês *unconventional prefoldin RBP5 interactor*) levou ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC) devido à inibição da transcrição de enzimas da via de síntese de NAD⁺ (via de catabolismo do L-triptofano) mediada pelo AhR e estrógeno (ER). A suplementação dos animais com NR e consequente normalização das concentrações hepáticas de NAD⁺ foi capaz de prevenir o desenvolvimento e inclusive, de levar à regressão do HCC (TUMMALA et al., 2014).

A suplementação com NAD⁺ aumentou a eficiência do reparo de lesões no DNA, além de melhorar o funcionamento mitocondrial (JANG et al., 2012). Entretanto, a redução da concentração intracelular de NAD⁺ acarretou na evasão de mecanismos apoptóticos, inibição de mecanismos de reparo com concomitante aumento das taxas de mutação, e consequente instabilidade genômica. Por outro lado, a restauração das concentrações induziu a reativação de mecanismos apoptóticos e aumento nos mecanismos de reparo de lesões de DNA (FANG et al., 2017).

O declínio da concentração de NAD⁺, concomitantemente ao acúmulo de NADH pode ser um bom indicativo de disfunção na regeneração de NAD⁺, glicose anaeróbica ou da fosforilação oxidativa, o que resulta em redução da capacidade de gerar ATP. Dessa forma, a quantificação de múltiplos metabólitos de NAD⁺ pode ser uma importante fonte de informações sobre as alterações associadas ao estado redox das células (DEMAREST et al., 2019). Síndromes de envelhecimento prematuro estão frequentemente associadas a mutações em proteínas de reparo de lesões de DNA. Essas alterações induzem aumentos das mutações, e consequente instabilidade genômica. Indivíduos que possuem síndromes como a síndrome de Werner (WRN), Bloom (BLM), Cockayne (CS) e Xeroderma Pigmentosum (XP), possuem altas chances de desenvolvimento de câncer de pele. Em modelos experimentais de CS e XP foi observada diminuição das concentrações de NAD⁺, devido em parte à ativação persistente de PARP1 (DEMAREST et al., 2019). A suplementação com NR e NMN melhorou a qualidade de vida e a longevidade em modelos experimentais de XP (FANG et al., 2016).

Dentre as fontes dietéticas de NAD⁺ e em função dos vários benefícios metabólicos verificados em estudos *in vitro* e *in vivo*, a NR está disponível e passou a ser comercializada em 2013 como suplemento alimentar, sob o nome comercial NIAGEN™ (Chromadex Incorporated, Irvine, California, USA).

1.7. Metabolismo regulando a sinalização celular no processo de tumorigênese

A caracterização das marcas do câncer (*hallmarks of cancer*) permitiu importantes avanços no conhecimento da biologia de tumores. Dentre vários avanços, observa-se uma melhor compreensão dos efeitos da reprogramação metabólica nos processos neoplásicos

(HANAHAN; WEINBERG, 2011). As células neoplásicas apresentam como característica uma proliferação altamente descontrolada, acompanhada de importantes ajustes no metabolismo celular, a fim de suprir suas necessidades bioenergéticas (DeBERARDINIS et al., 2008). Otto Warburg observou que as células tumorais apresentavam uma característica anômala do metabolismo celular quando comparadas às células normais. Ele observou que mesmo na presença de oxigênio as células tumorais oxidavam glicose a lactato, apresentando alto consumo de glicose. Essa adaptação metabólica inclui a regulação de transportadores de glicose. O alto consumo de glicose também está associado à ativação de oncogenes, como KRAS (do inglês *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), MYC (do inglês *myelocytomatosis oncogene*) e HIF (do inglês *hypoxia-inducible fator*), além de mutações em genes supressores de tumor (exemplo: p53). Essas características conferem maior capacidade proliferativa, bloqueio em controles citostáticos e atenuação da apoptose (DeBERARDINIS et al., 2008; HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

Atualmente está bem estabelecido que o balanço NAD^+/NADH em diferentes compartimentos celulares é intrinsecamente relacionado à atividade de proteínas ligantes de NAD^+/NADH que atuam como sensores redox e traduzem a condição metabólica da célula para o controle da expressão gênica (KOCH-NOLTE et al., 2011). Proteínas CtBP (do inglês *C terminal-binding protein*, CtBP1 e CtBP2) são co-repressores transcricionais que contêm um sítio de ligação para NADH que regula sua capacidade de dimerizar. CtBP é um homodímero ou heterodímero de CtBP1 e CtBP2 e pode agregar uma variedade de fatores que regulam a estrutura da cromatina, incluindo desacetilases de histonas (HDAC1, HDAC2), histona acetiltransferases p300 e CBP, e a histona metiltransferase G9a (CHINNADURAI, 2009; DI et al., 2010).

As proteínas CtBP, **Figura 8**, antagonizam a expressão de múltiplos supressores tumorais, tais como E-caderina (codificada por *CDH1*), p16 (inibidor 2A de quinase dependente de ciclina), fosfatase PTEN (do inglês *phosphatase and tensin homolog*), e BRCA1 (em inglês *breast cancer 1*). O aumento da expressão de CtBP está associado à transição epitélio-mesenquimal que contribui para o fenótipo maligno invasivo de células tumorais (CHINNADURAI, 2009; DI et al., 2010). Fatores de transcrição ZEB se associam a proteínas CtBP em sítios E-box de regiões promotoras de genes, fazendo parte do complexo co-repressor de expressão gênica e indutor da transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*). Em células de câncer pulmonar foi demonstrado que os níveis de

ZEB-1 correlacionam-se negativamente com a expressão do supressor tumoral semaforina (SEMA3F), cujo gene contém sítios E-box que ligam ZEB-1 (CLARHAUT et al., 2009). Essas observações evidenciam a necessidade de se compreender como alterações metabólicas podem contribuir para modulação da expressão de genes controlados por CtBP e ZEB no início do processo de tumorigênese.

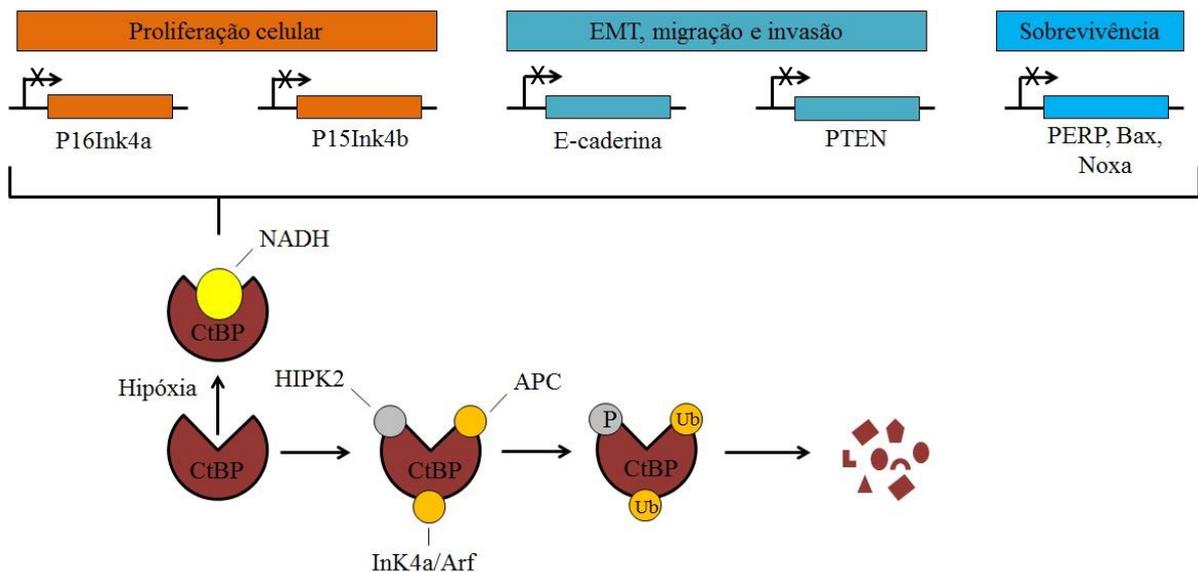


Figura 8. Atividade de CtBP na tumorigênese e progressão tumoral. A atividade co-repressora transcricional da CtBP é estimulada em ambiente de hipóxia como resultado de concentrações elevadas de NADH. CtBP aumenta a proliferação celular via repressão transcricional dos inibidores do ciclo celular p16Ink4a e p15Ink4b. Além disso, CtBP promove EMT, migração e invasão de células tumorais por reprimir E-caderina, e possivelmente a fosfatase PTEN. CtBP também atua regulando a sobrevivência celular como resultado da repressão dos genes pró-apoptóticos (PERP, Bax e Noxa). Por outro lado, CtBP é regulado negativamente por supressores de tumor (HIPK2, Ink4a/Arf e APC), que promove a degradação como resultado da fosforilação e ubiquitinação. Traduzido e modificado de CLARHAUT et al., 2009.

A via PI3K/AKT/mTOR (do inglês *phosphatidylinositol-3-kinase; protein kinase B; mammalian target of rapamycin*) (**Figura 9**) é alterada em diversos tipos de câncer humano e sua ativação aberrante é uma das alterações moleculares mais comuns em câncer de pulmão, desempenhando importante papel na iniciação e na progressão de NSCLC (SCRIMA et al., 2012). De modo geral, a ativação da via PI3K/AKT/mTOR resulta em alterações metabólicas que levam à biossíntese e à replicação celular, sendo que sua ativação pode estar relacionada a mutações ativadoras de KRAS, PIK3CA, AKT1 ou domínio tirosina quinase do receptor do

fator de crescimento epitelial (EGFR), aumento de expressão de PIK3CA, AKT1 ou AKT2, ou perda de PTEN (SCRIMA et al., 2012).

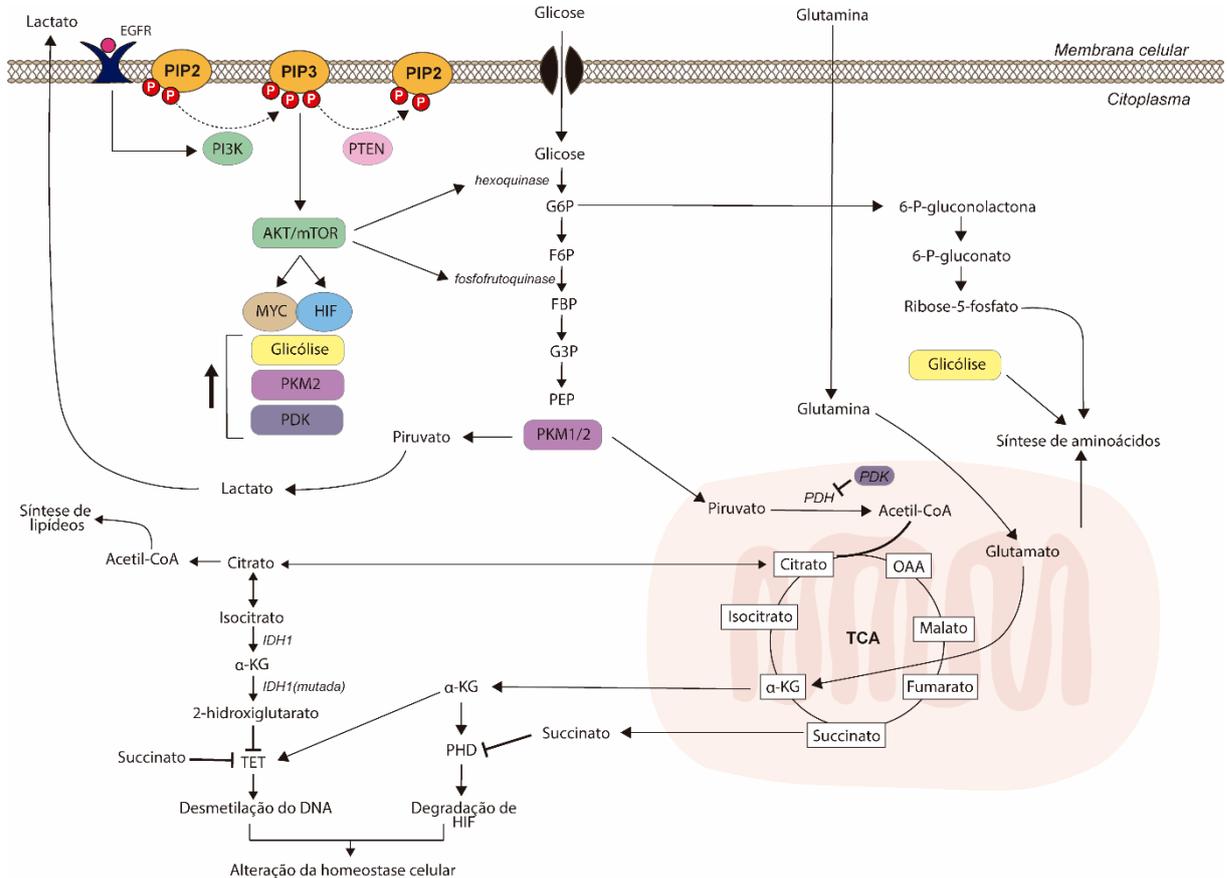


Figura 9. Apresentação resumida da cascata de sinalização da via PI3K/AKT/mTOR e as principais alterações no metabolismo intermediário de células neoplásicas e em transformação. A ativação de PI3K é mediada por estímulos externos, incluindo, por exemplo, a ligação de EGF a receptores de membrana. PI3K catalisa a fosforilação de diversos substratos e regula positivamente a ativação de diversos fatores de transcrição oncogênicos, incluindo MYC. MYC contribui com HIF para aumento de transportadores de glicose. Além disso, MYC aumenta expressão de piruvato desidrogenase quinase 1 (PDK1) que modula a atividade de PDH que converte o piruvato a acetil-coA, inibindo o fluxo de entrada de piruvato no ciclo de Krebs. MYC também altera a expressão de piruvato quinase M2 (PKM2) que é uma isoforma mais lenta da piruvato quinase, permitindo que intermediários da via glicolítica sejam utilizados em outras vias biossintéticas (ex. síntese de aminoácidos). Nas células neoplásicas ou em transformação o ciclo de Krebs passa a fornecer intermediários para vias biossintéticas. Nesse processo, citrato é transportado para o citoplasma e passa a ser utilizado para a síntese de lipídios. Concomitantemente ao desvio de intermediários do ciclo de Krebs a célula aumenta a captação de glutamina, que passa a ser fonte de carbono para o ciclo de Krebs, por meio da conversão de glutamina a glutamato, e subsequentemente a α -KGT. O α -KGT atua como

cofator enzimático para diversas dioxigenases, incluindo as PHD1-3 e TETs, que regulam a degradação de HIF e a metilação do DNA, respectivamente.

Em amostras humanas de NSCLC foi identificada perda de expressão de PTEN, seguida do aumento da expressão da subunidade catalítica p110 α (codificada pelo gene PIK3CA) de PI3K (27/92, 29%) (SCRIMA et al., 2012). Em outro estudo foi verificado que a ativação da via PI3K ocorre nas vias aéreas bronquiais citologicamente normais de fumantes com câncer de pulmão ou com lesões displásicas, sugerindo ser um evento precoce na carcinogênese pulmonar. Nesse estudo foi observada regressão da displasia nos indivíduos fumantes que receberam tratamento com mio-inositol, um inibidor da via PI3K. Nesse caso, análises de mutações e de cópias gênicas não explicaram o aumento da atividade dessa via (GUSTAFSON et al., 2010).

A ativação da via PI3K/AKT/mTOR ativa uma série de fatores de transcrição oncogênicos, dentre eles HIF. A função de HIF é promover a adaptação das células a baixas tensões de oxigênio, induzindo neovascularização e glicólise, dentre outros efeitos relacionados à indução de mais de 50 genes responsivos a hipóxia. Mutações ou alterações metabólicas e epigenéticas que levem à estabilização de HIF na presença de oxigênio fazem com que HIF permaneça ativo, alterando as características metabólicas da célula sob normóxia (SELAKE et al., 2005; CAIRNS et al., 2011).

O fator de transcrição MYC (**Figura 9**), regulado positivamente pela ativação de PI3K, colabora com HIF na ativação de transportadores de glicose e de enzimas da via glicolítica. MYC aumenta a expressão da piruvato desidrogenase quinase 1 (PDK1), que inibe a entrada de piruvato no ciclo do ácido tricarboxílico, e da piruvato quinase M2 (PKM2), permitindo que intermediários da via glicolítica sejam utilizados em vias biossintéticas e para geração de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) (CAIRNS et al., 2011; SCRIMA et al., 2012).

Como descrito anteriormente, as células do câncer apresentam o metabolismo alterado, estando aumentada a oxidação da glicose para lactato mesmo na presença de altas tensões de oxigênio (efeito Warburg) (KROEMER; POUYSSEGUR, 2008; HEIDEN et al., 2009).

O TCA (**Figura 9**), por sua vez, adquire nas células tumorais e proliferantes a função de fornecer intermediários (cataplerose) para a síntese de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, passando a contribuir para vias biossintéticas que consomem adenosina trifosfato (ATP), além da via oxidativa que gera ATP. Dessa forma, passa a haver um fluxo de citrato da mitocôndria

para o citosol, impactando todo o ciclo. Nesse caso, glutamina, devido à sua abundância e facilidade de conversão para intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, passa a ser fonte de α -cetogluturato para o ciclo, em adição à entrada de piruvato a partir da glicólise (DeBERARDINIS et al., 2008; HITCHLER; DOMANN, 2009; CAIRNS et al., 2011). É reportado que tanto o efeito Warburg quanto o consumo de glutamina estão aumentados nos estágios avançados do câncer (HITCHLER; DOMANN, 2009).

Com relação às enzimas do ciclo de Krebs, foi observado que B[a]P administrado intraperitonealmente a camundongos fêmeas *Swiss* (100 mg/kg, 3 vezes por semana, 20 semanas) levou à diminuição das atividades da succinato desidrogenase, aconitase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase e α -cetogluturato desidrogenase no pulmão e fígado, provavelmente devido à geração de ROS. Câncer pulmonar foi observado nos animais (PRIYA et al., 2011).

Estudos apontam que intermediários do ciclo de Krebs participam da regulação da atividade de enzimas chave envolvidas no controle do metabolismo celular.

O metabólito α -cetogluturato é co-substrato de uma família de dioxigenases que utilizam oxigênio molecular para hidroxilar seus substratos, sendo oxidado e descarboxilado diretamente para succinato (**Figura 9 e Figura 10**). Dentre as enzimas dependentes de α -cetogluturato estão as prolil-hidroxilases (PHD1-3) do fator de transcrição induzível por hipóxia (HIF- α) (**Figura 10**), as quais dependem também de oxigênio, Fe(II) e ascorbato para ser ativas e são consideradas importantes sensores de oxigênio nas células. Tais enzimas catalisam a hidroxilação de dois resíduos de prolina no domínio de degradação dependente de oxigênio (ODDD) de HIF- α . Tal hidroxilação facilita a ligação da proteína pVHL (von Hippel-Lindau), que é parte de um complexo E3 ubiquitina ligase, ao domínio ODDD de HIF- α , levando à sua degradação via proteassomo (SELAK *et al.*, 2005).

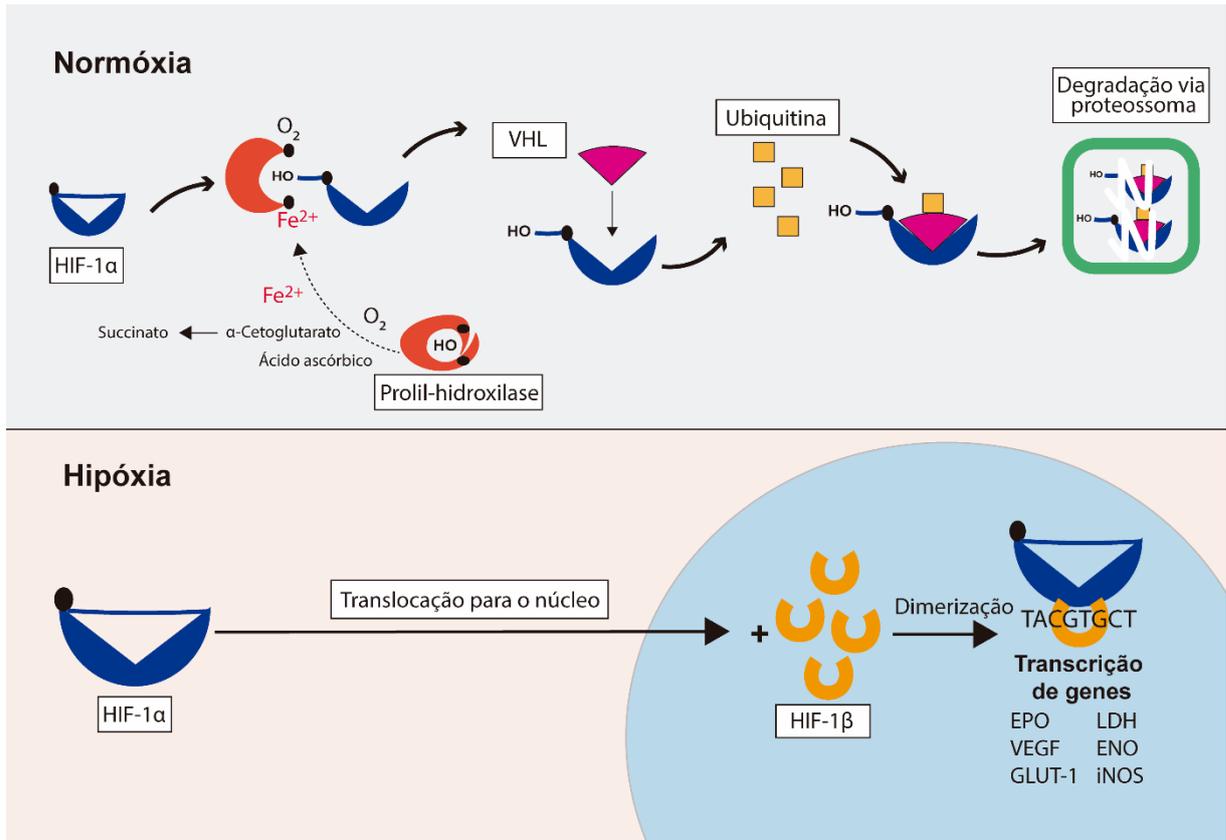


Figura 10. Regulação da atividade do fator de transcrição induzível por hipóxia. O fator de transcrição oncogênico HIF atua de acordo com variações nas tensões de oxigênio. Em condições de normoxia HIF é continuamente produzido, e na presença de Fe²⁺, oxigênio e α -cetoglutarato é continuamente degradado pelo complexo enzimático VHL (do inglês *Von Hippel Lindau*), ubiquitina e proteossoma. Quando o oxigênio torna-se limitante, a prolil-hidroxilase (PHD) é inibida, e HIF-1 α acumula-se, podendo ser translocado para o núcleo onde se liga a HIF-1 β constitutivo. O fator de transcrição se liga ao elemento de resposta a hipóxia (HRE) que regula positivamente genes como eritropoietina (EPO) lactato desidrogenase (LDH), enolase (ENO), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e GLUT1. Traduzido e adaptado de LaMANNNA et al., 2004.

Succinato, fumarato e oxaloacetato são intermediários do TCA capazes de inibir oxigenases dependentes de α -cetoglutarato, dentre as quais PHD1-3. Sendo assim, participam da modulação da atividade de HIF em resposta a disfunções do ciclo de Krebs (SELAK et al., 2005; KOIVUNEN et al., 2007). É descrito que mutações que levam à inibição das enzimas succinato desidrogenase e fumarato hidratase estão relacionadas a um risco aumentado de desenvolvimento de tumores, tais como carcinoma renal, carcinoma gástrico, carcinoma do cólon e câncer da tireóide, havendo níveis aumentados de HIF-1 α e indução de genes responsivos a hipóxia nos tumores contendo essas mutações (SELAK et al., 2005). Da mesma

forma, mutações nas enzimas isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) citosólica e IDH2 mitocondrial fazem com que as mesmas passem a converter α -cetogluturato em 2-hidroxiogluturato, com consumo de NADPH. Além de o balanço redox celular ser afetado pelo consumo de NADPH, o metabólito 2-hidroxiogluturato inibe competitivamente oxigenases dependentes de α -cetogluturato, dentre elas as enzimas PHD1-3, com consequente estabilização de HIF. Gliomas com mutações em IDH1 acumulam 2-hidroxiogluturato em concentrações no intervalo de 5 – 35 mM, sendo que altas concentrações também são encontradas em células leucêmicas e soro de pacientes com leucemia mielóide aguda (CAIRNS et al., 2011; CYR; DOMANN, 2011; CHIA et al., 2011).

A produção elevada de ROS está também envolvida em alterações epigenéticas observadas em células do câncer. Nesse sentido, algumas enzimas do TCA são inibidas por ROS (exemplo: peróxido de hidrogênio, H_2O_2), hidroperóxidos orgânicos e aldeídos resultantes do processo de peroxidação lipídica. As enzimas mais sensíveis à inibição por estresse oxidativo são aconitase, α -cetogluturato desidrogenase e piruvato desidrogenase. Assim, como resultado de uma maior geração de ROS, ocorrem alterações no TCA que podem levar a aumento dos níveis de metabólitos que contribuem para a estabilização de HIF- α (FEDOTCHEVA; SOKOLOV; KONDRASHOVA, 2006; BROOKES et al., 2006).

O aumento na expressão da proteína HIF, assim como de proteínas reguladas por essa via, foram detectados em 33 de 73 amostras de NSCLC humano. Ao mesmo tempo, foram detectados níveis aumentados de PHDs nessas amostras (GIATROMANOLAKI et al., 2008). Um estudo subsequente com 62 amostras de NSCLC mostrou aumento da expressão gênica de PHDs, sendo que a expressão aumentada de PHD3 foi associada a estágio inicial do câncer (CHEN et al., 2011).

Outro estudo mostrou aumento da expressão gênica e das proteínas PHDs em células de NSCLC (335 amostras analisadas), sendo que esse aumento de expressão foi associado a prognóstico ruim de sobrevivência (23% de taxa de sobrevida após 5 anos contra 80% no caso de não ser encontrado aumento da expressão de PHDs) (ANDERSEN et al., 2011). Nos últimos estudos não foi determinada a expressão de HIF. Entretanto, HIF regula a expressão gênica de PHDs, o que pode explicar os níveis aumentados detectados em células de NSCLC. Apesar da expressão aumentada, PHDs podem ter suas atividades reduzidas devido à hipóxia e à presença dos inibidores no microambiente tumoral. Uma vez que PHDs são apontadas como potenciais alvos para estratégias terapêuticas do câncer, é importante compreender adequadamente seu

papel no desenvolvimento tumoral. Além de PHD1-3, existem outras dioxigenases, tais como JmjC histona lisina demetilases e TET metilcitosina hidroxilases, que fazem parte da maquinaria epigenética de regulação da transcrição gênica e são dependentes de α -cetogluturato e Fe(II) (CYR; DOMANN, 2011).

Nesse contexto, torna-se evidente a necessidade de se compreender como alterações no metabolismo celular podem modular os controles epigenéticos, favorecendo a proliferação descontrolada de células e a consequente formação de tumores.

1.8. Controle epigenético na carcinogênese

Um controle fino da expressão da informação contida no DNA é exercido por marcas epigenéticas no genoma, que incluem a metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas, e RNAs não codificantes, sem alterações na sequência primária de nucleotídeos do DNA. A marca epigenética melhor caracterizada é a metilação do DNA, que quando associada a modificações nas histonas e outras proteínas desempenha papel regulatório na manutenção da estrutura da cromatina. De 2 a 5% do total de citosinas do DNA humano estão na forma metilada (5-metil-2'-desoxicitidina (5-mC)) em sequências dinucleotídicas específicas (citosina-guanina-fosfato ou ilhas CpG) (ROBERTSON; WOLFFE, 2000; BENDER, 2004; MAGAÑA et al., 2007, JIM; LIM, 2018).

A distribuição de 5-mC varia em diferentes tecidos e a sua frequência é alterada de acordo com o estágio de desenvolvimento das células, bem como das suas condições fisiopatológicas e de respostas às condições ambientais. Mudanças no padrão de metilação são responsáveis pela reprogramação celular de acordo com as necessidades celulares. Portanto, ao contrário da sequência de bases no DNA, o padrão de citosinas metiladas é flexível, e sensível às condições ambientais, e pode sofrer mudanças dramáticas ao longo da vida útil de uma célula (KOUIDOU; KOVATSI; IOANNOU, 2010; JIM; LIM, 2018).

A oxidação de 5-mC para 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5-hmC), **Figura 11**, é catalisada por uma família de dioxigenases dependentes de α -cetogluturato e Fe(II), denominadas proteínas *Ten-Eleven-Translocation* (TET) (ITO et al., 2010; WILLIANS et al.,

2011). É hipotetizado que a oxidação de 5-mC para 5-hmC via proteínas TET representa o primeiro passo para a completa reação de desmetilação do DNA (DAI; HE, 2011; NABEL; KOHLI, 2011).

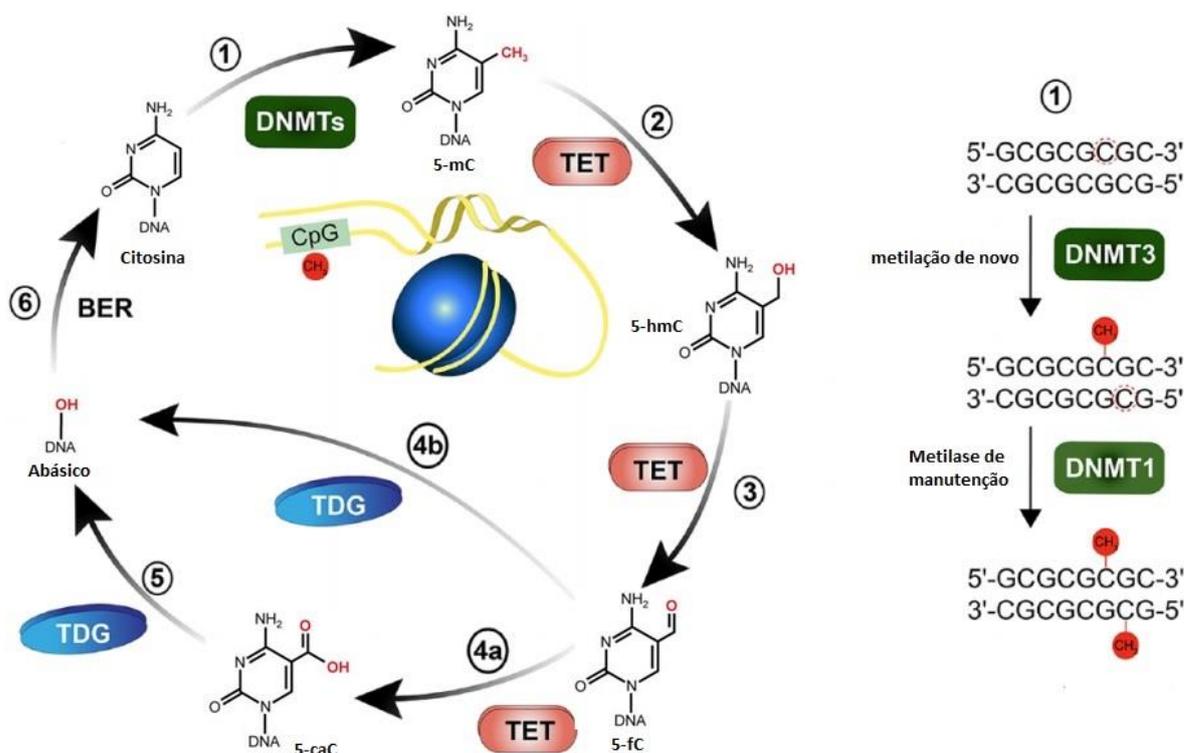


Figura 11. Maquinaria epigenética no DNA. A regulação epigenética envolve reações reversíveis de metilação e desmetilação do DNA. Esse processo inclui as seguintes reações enzimáticas: (1) a enzima DNMT3 (DNA metiltransferase) transfere o grupo metil para o carbono 5 da citosina originando a 5-mC; (2) a enzima TET inicialmente converte 5-mC a 5-hmC; (3) posteriormente, a enzima TET converte 5-hmC em 5-formil-citosina (5fC). (4) A enzima TET converte ainda 5-fC em 5-carboxi-citosina (5-caC). Timina DNA glicosidase (TDG) quebra a ligação glicolítica de 5-fC (4b) ou 5-caC (5), gerando sítios abásicos. A via de reparo por excisão de base inclui a remoção do sítio abásico e a substituição do nucleotídeo. Vale ressaltar que a formação do sítio abásico não é uma etapa obrigatória, pode haver a descarboxilação de 5-caC diretamente a citosina pela TDG (etapa não apresentada na figura). Traduzido e adaptado de BAYRAKTAR; KREUTZ, 2017; RAVICHANDRAN; JURKOWSKA; JURKOWSKI, 2017.

É sugerido que a perda de função das proteínas TET pode levar à hipermetilação de regiões promotoras de genes, com consequente desregulação da transcrição e diferenciação celular (WILLIAMS et al., 2011). Uma vez que as proteínas TET (**Figura 9**) são dependentes de α -cetoglutarato, a relação entre alterações no ciclo do ácido tricarboxílico e nos níveis de 5-mC e 5-hmC no DNA precisa ser investigada (CHIA et al., 2011). De fato, foi verificado que o

acúmulo de fumarato e succinato em células mutadas para fumarato hidratase e succinato desidrogenase leva à inibição da hidroxilação de 5-mC no DNA (XIAO et al., 2012).

Dentre muitas de suas aplicações, a distribuição alterada de 5-mC é atualmente usada como marcador de câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, envelhecimento e uma diversidade de outras patologias. A modulação da metilação gene específica e da metilação global tem demonstrado importante associação com o processo de carcinogênese (XIAO et al., 2012).

Células tumorais apresentam caracteristicamente uma perda da metilação global do DNA (hipometilação), acompanhada por hipermetilações focais, o que pode levar a instabilidade genômica (hipometilação) e silenciamento transcricional de genes supressores de tumor (hipermetilação de regiões promotoras) (DOI et al., 2009; DAHL et al., 2011). Além disso, estudos de transformação celular sugerem que o silenciamento epigenético de genes ocorra em estágios iniciais da carcinogênese (BELINSKY, 2004). Faltam, no entanto, estudos que avaliem como carcinógenos induzem a alterações metabólicas, transcricionais e epigenéticas.

Um estudo foi conduzido com o intuito de compreender alterações moleculares durante a transformação de células epiteliais pulmonares expostas a baixas concentrações dos carcinógenos metil-nitrosouréia e BPDE. Nesse estudo, níveis aumentados de DNA metiltransferase 1 (DNMT1) foram observados nas células expostas aos carcinógenos, com hipermetilação de regiões promotoras de 5 a 10 genes em cada linhagem transformada, dentre os quais membros da família das caderinas (E-caderina e H-caderina), também encontrados hipermetilados em tumores pulmonares humanos. A transformação celular e o silenciamento dos genes foram revertidos pela diminuição da expressão de DNMT1 (DAMIANI et al., 2008). Em outro estudo, células epiteliais bronquiais humanas (BEAS-2B) foram expostas a baixas concentrações de condensado de fumaça de cigarro por 1 mês e foram observados transição epitélio-mesenquimal e o silenciamento epigenético de 130 genes, incluindo E-caderina (VELJKOVIC et al., 2011).

1.9. Estudos de transformação utilizando as células BEAS-2B e B[a]P

A alta taxa de mortalidade do câncer de pulmão despertou por anos o interesse por estudos mecanísticos envolvendo a carcinogênese pulmonar. Neste contexto, começou-se a observar que uma característica clínica de grande parte dos casos de câncer de pulmão é sua localização anatômica nas células epiteliais da árvore brônquica. Adicionalmente, estudos envolvendo o surgimento de tumores em células epiteliais bronquiais eram limitados até o final da década de 80. O fator limitante em tais estudos era a necessidade de se ter culturas de células que se mantivessem em cultivo por longos períodos, sem perder as suas características fenotípicas (REDDEL et al., 1988).

Em 1988, um grupo de pesquisadores do *National Cancer Institute* (Bethesda, EUA) desenvolveu a linhagem BEAS-2B a partir de tecido obtido de uma autópsia de indivíduo saudável. O desenvolvimento da linhagem BEAS-2B permitiu importantes avanços no conhecimento sobre a biologia das células epiteliais bronquiais normais em estudos *in vitro*. Além disso, o fenótipo não tumorigênico dessa linhagem obtida a partir da transfecção com o adenovírus SV40 (SV) permitiu o desenvolvimento de estudos de controle de crescimento e diferenciação, estudos de carcinogênese em múltiplos estágios, bem como estudos mecanísticos envolvendo o reparo de lesões de DNA (REDDEL et al., 1988). As células BEAS-2B também são utilizadas para estudos de diferenciação de células escamosas e de respostas a agentes químicos e biológicos (SHUKLA et al., 2016).

O SV codifica proteínas ligantes e inativadoras de proteínas reguladoras de crescimento, como p53 e produto do gene do retinoblastoma. Essa modulação altera a senescência, crescimento das células e confere maior sensibilidade a diversos carcinógenos, o que facilita sua utilização em estudos mecanísticos de transformação maligna (REDDEL et al., 1988). Além disso, não foi observada a formação de tumores em modelos de xenotransplante, após a injeção das células BEAS-2B em camundongos *nude* (CACHON et al., 2014, SHUKLA et al., 2016).

Como descrito anteriormente, B[a]P é utilizado em muitos estudos como indutor de transformação maligna em células BEAS-2B. As células BEAS-2B são sensíveis à transformação induzida por carcinógenos *in vitro* (XU et al., 2012). São células que expressam CYP1A1 e CYP1B1 quando induzidas por B[a]P, ativando-o, portanto, para intermediários eletrofílicos reativos. Também existem estudos demonstrando uma correlação linear entre

concentração de B[a]P e concentrações de adutos de DNA nessas células (POHJOLA et al., 2003).

As concentrações de B[a]P na fumaça do cigarro variam de acordo com os estudos, podendo estar entre 1 e 95 ng de B[a]P/cigarro. No entanto, vários fatores influenciam a exposição humana, incluindo a qualidade do cigarro, o número de inalações da fumaça por cigarro, bem como a forma de utilização. As concentrações de B[a]P na fumaça de cigarro também varia entre a corrente primária e secundária. As concentrações de B[a]P no ar atmosférico também é foco de estudos. No monitoramento do ar atmosférico na região da Lombardia, Itália, durante três anos foram observadas variações sazonais na concentração de B[a]P, sendo que as concentrações desse carcinógeno ficaram na faixa de 10^{-2} a 10^1 ng/m³ no ar atmosférico (GIANELLE et al., 2013). Atualmente, no Brasil, a legislação determina que os aromatizantes e/ou aromas de fumaça em alimentos não podem fornecer mais de 0,03 µg/kg de B[a]P no produto final e também estabelece um limite máximo de 0,7 µg/L de B[a]P para água potável (ANVISA, 2005 e 2007).

1.10. Quimioprevenção e estudos envolvendo B[a]P

Um consenso dentro da OMS é que a melhor forma de eliminar os impactos econômicos e sociais do câncer em humanos é a prevenção. Atualmente, existem várias estratégias para atingir este objetivo, e incluem o monitoramento de biomarcadores da doença, mudanças nos hábitos de vida e adoção de procedimentos de quimioprevenção (MARTÍNEZ et al., 2008; LEO, ALTAMIRANO, CAMPOS, 2018).

A associação entre certos padrões alimentares, sociais, bem como comportamentais e o risco de surgimento de câncer, ganhou reconhecimento a partir da década de 1960. Mais tarde, estudos envolvendo o uso de substâncias químicas, sintéticas e não sintéticas, para prevenir o surgimento do câncer, foi denominado como quimioprevenção. Desde então o termo é amplamente utilizado e numerosos compostos foram estudados na tentativa de prevenção. Entretanto, pouquíssimos agentes demonstraram ser eficazes em testes em humanos e, em se tratando da carcinogênese pulmonar, não existem procedimentos de quimioprevenção que tenham a efetividade comprovada (YANG et al, 2017).

Atualmente, poucos são os procedimentos de quimioprevenção bem-sucedidos. Os reflexos desses procedimentos são monitorados em estudos epidemiológicos ao longo do tempo. Nesses estudos espera-se que os procedimentos de quimioprevenção tenham reflexos na redução do número de casos de câncer, após o início da implementação (MARTÍNEZ et al., 2008; YANG et al, 2017).

A vacinação contra o vírus da hepatite B e do HPV (do inglês *human papillomavirus*) são consideradas dois grandes sucessos de prevenção do câncer hepatocelular e do câncer do colo do útero, respectivamente (TSAY, 2015). A vacina do HPV previne lesões genitais pré-cancerosas de colo de útero, vulva e vagina, além do desenvolvimento de câncer de colo do útero em mulheres. As vacinas também previnem o surgimento de verrugas genitais em mulheres e homens, relacionados aos subtipos 6, 11, 16 e 18 (INCA, 2021). Adicionalmente, alguns grupos de pesquisa também avaliam o potencial da vacina em prevenir o câncer de anogenital e de orofaringe HPV-relacionado (GUO et al, 2016).

O uso de 100 mg *chlorophyllin* (derivado semissintético da clorofila) tem sido empregado para prevenir a carcinogênese hepática induzida por aflatoxina B1 (AFB1) em países como China e Índia. A análise de marcadores de biotransformação de AFB1 e das concentrações de adutos de AFB1-DNA (AFB1- N^7 -Gua) na urina de indivíduos saudáveis, sabidamente expostos a AFB1, apresentam-se reduzidos. O mecanismo envolvido na proteção neste modelo envolve a formação de um complexo no trato gastrointestinal (AFB1-*chlorophyllin*) que impede a absorção e facilita a excreção sem que ocorra a biotransformação hepática necessária para a formação de intermediários reativos associados ao processo carcinogênico (BAYLEI et al, 2008, JUBERT et al. 2009, KUMAR et al, 2018).

O uso de vários compostos como resveratrol, vitamina E, curcumina e diversos extratos vegetais na quimioprevenção do câncer de pulmão também são encontrados na literatura (BERGE et al, 2004; ZHU et al., 2014; HE et al., 2018). São estudos *in vitro* e *in vivo* em fase inicial e que requerem mais informações a respeito das vias envolvidas na prevenção, bem como de estudos clínicos.

2. JUSTIFICATIVA

O B[a]P é utilizado em estudos do grupo como indutor de transformação maligna em células BEAS-2B. No modelo caracterizado no grupo (dados não publicados do pós-doutorado do Dr. Tiago Franco de Oliveira) observou-se que as células BEAS-2B expostas a baixas concentrações de B[a]P (0,1, 0,5 e 1 μ M ou 5, 25 e 50 ng/poço respectivamente) sofreram alterações no metabolismo intermediário logo na primeira hora de exposição, com queda inicial das concentrações de NAD⁺, NADH, NADPH, ATP, ADP, piruvato e intermediários do ciclo de Krebs, seguida pelo aumento significativo das concentrações dessas moléculas ao longo de 7 dias de incubação. Além disso, foram observadas alterações das concentrações de 5-mC e 5-hmC no DNA das células e aumento do crescimento de colônias em *soft-agar*, sem aumento da taxa de mutação no gene da hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (gene *HPRT*) (Oliveira, 2017).

Considerando, portanto, que B[a]P modula a concentração de NAD⁺ nas células BEAS-2B, e que NAD⁺ e NADH têm importância crucial na regulação da atividade de enzimas do metabolismo intermediário, na atividade de fatores de transcrição e de expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no controle do crescimento celular, observou-se a necessidade de verificar como a modulação das concentrações de NAD⁺ afeta o metabolismo e a transformação celular induzidos pelo carcinógeno.

Como descrito anteriormente, NR é um precursor da biossíntese de NAD⁺ em células de mamíferos, fungos e bactérias. Estudos clínicos em andamento têm mostrado que a suplementação com NR aumenta a concentração de NAD⁺ no sangue. Uma variedade de efeitos benéficos da NR é descrita em modelos experimentais, mas não há estudos que avaliem seu efeito em modelos de indução de tumorigênese química.

Assim, pretende-se que o desenvolvimento deste trabalho contribua para avanços na compreensão do papel de alterações metabólicas para a tumorigênese e sua prevenção.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se a suplementação com NR nas células BEAS-2B expostas a baixa concentração de B[a]P (1 μ M) afeta a formação de colônias em meio semissólido *soft-agar* e contrabalança as alterações metabólicas, epigenéticas e de expressão de alguns genes controlados pelo co-repressor transcricional CtBP sensível ao balanço redox NAD^+/NADH , além da expressão e atividade de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e na proliferação de células tumorais.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obtenção e purificação de NR a partir da hidrólise de NMN;
- ✓ Definir as concentrações de NR a serem empregadas no modelo de transformação, com base nos estudos de citotoxicidade utilizando as células BEAS-2B;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade de B[a]P na presença e ausência de NR com a finalidade de caracterizar o modelo experimental;
- ✓ Avaliar o ciclo celular ao longo de 168 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle.
- ✓ Avaliar a transformação celular por meio do crescimento independente de ancoragem (ensaio do *soft agar*);
- ✓ Avaliar alterações da metilação e hidroximetilação global do DNA (5-mC e 5-hmC) das células BEAS-2B após 168 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle.
- ✓ Avaliar alterações metabólicas ao longo de 168 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle.
- ✓ Avaliar a expressão de genes modulados pelo co-repressor transcricional CTBP;
- ✓ Avaliar a atividade de enzimas NAD⁺ dependentes (PARP1 e sirtuína 1);
- ✓ Avaliar a lipoperoxidação por meio da quantificação de malonaldeído (MDA) ao longo de 120 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle;
- ✓ Avaliar o conjunto de dados para elucidar possíveis vias de regulação envolvidas na transformação induzida por B[a]P, na ausência e na presença de NR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes e Insumos

Foram adquiridos reagentes e insumos de alto grau de pureza para o desenvolvimento deste trabalho. O meio BEGM (do inglês *Bronchial Epithelial Grow Medium*[®]) e o conjunto de cofatores do kit (extrato de pituitária bovina, insulina, hidrocortisona, HEGF, epinefrina, transferrina, ácido retinóico, triiodotironina, gentamicina e anfotericina) foi adquirido da Lonza. O kit (Amicon Ultra[®], 2k) utilizado para esterilização de NR foi adquirido da Merck Millipore (Carrigtwohill, Irlanda). A solução de lise e a solução de precipitação de proteínas empregadas para extração de DNA, bem como, o kit de extração de RNA foram adquiridos da Quiagen (Hilden, Alemanha). O Kit utilizado na síntese do cDNA e o TaqMan[®] *Universal Master Mix II* foi adquirido da Applied Biosystems (Foster City, EUA). O coquetel de inibidores de fosfatase e proteases foi obtido da Thermo Scientific (Waltham, EUA). O reagente de Bradford utilizado na quantificação das proteínas foi obtido da BioRad (Hercules, EUA). O Kit para análise da atividade de sirtuína-1 (Fluor de Lys[®]) foi fornecido pela Enzo Life Sciences (Farmingdale, EUA) e o Kit para análise da atividade de PARP1 (HT PARP *in vivo* Pharmacodynamic Assay II[®]) foi fornecido pela Triagen (Farmingdale, EUA). O Kit para análise do tipo de morte (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I) foi fornecido pela BD Pharmingen[™]. Os solventes utilizados em processos de extração de DNA e RNA, bem como os padrões de metabólitos intracelulares e demais solventes empregados nas análises cromatográficas, foram obtidos da Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA). A água utilizada no preparo das soluções foi deionizada em um sistema modelo Direct-Q[®] 5UV Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha).

4.2. Equipamentos básicos

O desenvolvimento deste trabalho contou com a colaboração de vários professores que gentilmente permitiram a utilização de equipamentos em seus respectivos laboratórios. Os seguintes equipamentos foram utilizados para realização dos procedimentos experimentais: autoclave 415 Fasnem (Brasil), agitador magnético 78HW-1 (Biomixer, Brasil), banho maria modelo 245 (Cientec, Brasil), balança analítica modelo AT261-DeltaRange (Mettler, EUA), balança semi-analítica modelo FA210N (Bioprecisa, Japão), incubadora modelo Galax 170S (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha); Microcentrífuga modelo Mikro 120 (Hettich, Tuttlingen, Alemanha); Centrífugas modelos 5702R e 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha); Agitador de Tubos modelo AP56 (Phoenix, Araraquara, Brasil), Potenciômetro digital modelo W3B (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil); Concentrador de amostras modelo miVac (Genevac, Ipswich, Reino Unido). Citômetro de fluxo modelo BD Facs Canto 2 (BD, Biosciences, EUA).

4.3. Técnicas empregadas neste trabalho

4.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*, HPLC) é uma técnica de separação na qual os componentes de uma mistura são separados em função do grau de afinidade entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária sólida. A fase estacionária contida em uma coluna cilíndrica pode apresentar diferentes graus de polaridade de acordo com o tipo de preenchimento. A eficiência e os mecanismos de separação variam de acordo com a escolha da coluna e fase móvel (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.3.2. HPLC-DAD

As análises e purificações com o HPLC-DAD foram conduzidos em equipamento da Shimadzu Corporation (kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos (PDA-20AV), um auto injetor (proeminence-SIL-20Ac) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação (CBM-20A). Os dados obtidos foram processados empregando o *software* LC solution 1.21 (Shimadzu, kyoto, Japão). As condições cromatográficas empregadas nas análises são descritas ao longo deste trabalho. Este equipamento está alocado no Laboratório da Professora Ana Paula de Melo Loureiro.

4.3.4. HPLC-ESI-MS/MS

A espectrometria de massas (EM) permite a detecção de moléculas ionizadas. Cada molécula é identificada por meio da sua razão massa/carga (m/z), padrões de fragmentação e tempo de eluição cromatográfica. A EM é utilizada para identificação de moléculas desconhecidas, quantificação de moléculas conhecidas e obtenção de informações estruturais de moléculas (SCIEX, 2010).

O sistema analítico empregado neste trabalho é constituído por um sistema de HPLC da Agilent série 1200 (Wilmington, EUA), equipado com uma bomba binária (Agilent 1200 G1310A), um forno para coluna (Agilent 1200 G1316B), um detector de arranjo de diodos (Agilent 1200 DAD G1315C) e um auto injetor (Agilent 1200 G1367C) controlado por um módulo de comunicação. O sistema de HPLC é acoplado ao espectrômetro de massas Linear Quadrupolo Ion Trap (modelo API 4000 QTRAP) da empresa Applied Biosystems /MDS Sciex Instruments (Foster City, EUA). Os dados foram processados utilizando o *software* Analyst 1.6 (Applied Biosystems, EUA). O equipamento foi disponibilizado pelo laboratório do Professor Paolo Di Mascio do IQ-USP.

4.3.4. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica de alto desempenho, que permite a análise simultânea de vários parâmetros celulares ou de partículas em suspensão. O princípio básico reside na incidência de uma fonte de luz *laser* que intercepta as partículas unidirecionadas por um líquido. A dispersão da luz fornece dados relativos a tamanho e granularidade. Nesse sentido, moléculas ou estruturas de interesse biológico (proteínas, peptídeos, lipídeos, antígenos etc) podem ser monitoradas por marcação com fluorocromos e/ou anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos. A combinação de diferentes marcadores possibilita uma análise multiparamétrica que atualmente é aplicada nas mais variadas áreas de conhecimento (SANTOS et al., 2018).

A citometria de fluxo foi empregada neste trabalho com a finalidade de avaliar o ciclo celular, viabilidade e tipo de morte celular nas diferentes exposições. Essas análises foram realizadas utilizando o citômetro de fluxo modelo BD FACS Canto 2 (BD, Biosciences, EUA) disponibilizado pelo laboratório multiusuário da FCF-USP, coordenado pelo Professor Sandro Rogério de Almeida.

4.3.5. Western blot

A técnica de western blot permite detectar proteínas de interesse numa amostra de homogenato de células ou de tecidos. A técnica utiliza eletroforese em gel para separar as proteínas de acordo com o tamanho. Em seguida, as proteínas são transferidas para uma membrana, e após a transferência, anticorpos específicos são empregados para detecção e quantificação das proteínas de interesse (LODISH et al., 2011).

Utilizamos essa técnica para avaliar a expressão de ciclina B1 nos extratos de células BEAS-2B após as diferentes incubações. As análises foram realizadas em colaboração com o Professor Leonardo Augusto Karam Teixeira do INCA-RJ.

4.3.6. PCR-RT

O PCR-RT (do inglês: *polymerase chain reaction real time*) tem como princípio a reação em cadeia da DNA polimerase. Um equipamento qPCR e uma sonda fluorescente (Taqman) são utilizados para multiplicar os ácidos nucleicos e quantificar o DNA obtido na reação. O substrato inicial da reação de PCR é o RNA, que é convertido ao cDNA pela enzima transcriptase reversa para ser utilizado na reação (LODISH et al., 2011).

Utilizamos a técnica de PCR-RT para quantificar a expressão de genes regulados pelo correpressor transcricional CtBP. A integridade do RNA foi monitorada usando o sistema Bioanalyzer, serviço fornecido pelo ICB-USP. A síntese do cDNA foi realizada em colaboração com o laboratório da Professora Ana Campa utilizando o equipamento StepOnePlus-RT-PCR (Applied Biosystems®, USA). A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o método de Taqman® (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Essas análises foram realizadas no laboratório do Prof. Jorge Sampaio da FCF-USP utilizando o equipamento StepOnePlus-RT-PCR (Applied Biosystems®, USA).

4.4. Delineamento do modelo experimental

4.4.1. Linhagem BEAS-2B

A linhagem BEAS-2B, células de epitélio brônquico humano, com baixo número de passagens (menor que 10), foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Fekadu Kassie (Masonic Cancer Center, Universidade de Minnesota, Minneapolis, Estados Unidos). As células BEAS-2B foram mantidas em garrafas contendo meio BEGM suplementado com cofatores do KIT e incubadas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂). A autenticação da linhagem BEAS-2B foi realizada pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), RJ, Brasil. Os dados obtidos utilizando o ensaio STR (do inglês *short tandem repeat*) demonstraram

conformidade com o descrito no acervo disponibilizado pela *American Type Culture Collection* (ATCC).

4.4.2. Desenho do modelo experimental

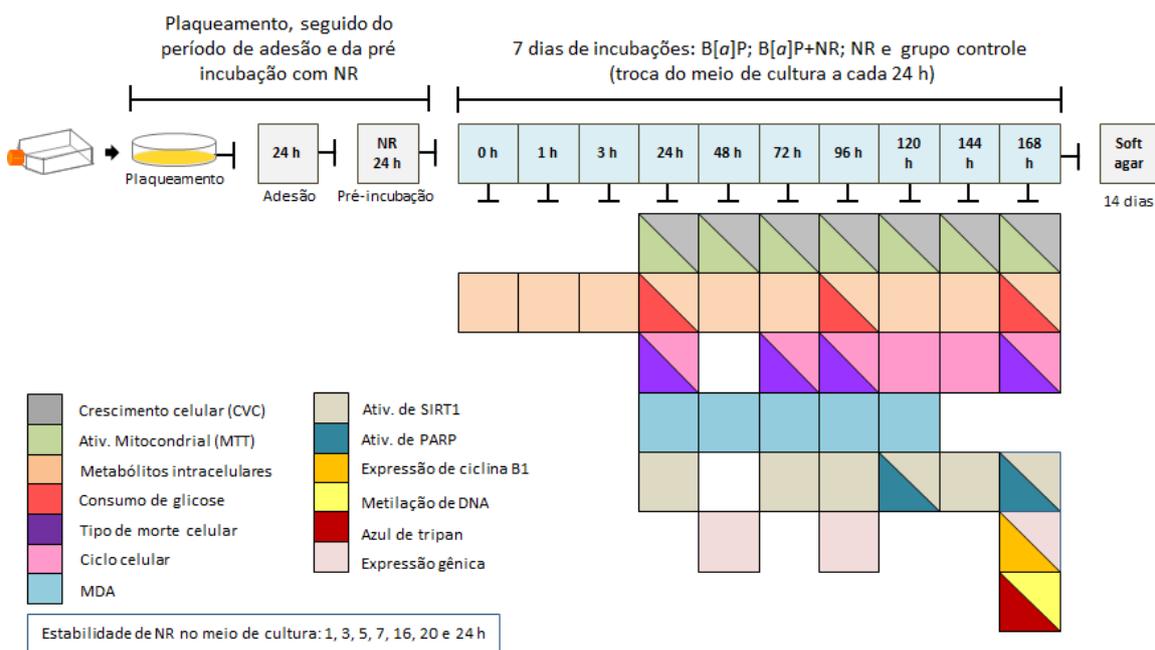


Figura 12. Desenho experimental do projeto. Nas incubações com B[a]P e/ou NR foram utilizadas as concentrações de 1 μ M de B[a]P e 1 μ M de NR. Nos ensaios de citotoxicidade da NR foram utilizadas concentrações entre 1 e 50 μ M de NR. Em resumo, as seguintes quantidades de células foram utilizadas no início de cada experimento: para o crescimento celular (CVC), atividade mitocondrial (MTT), quantificação dos metabólitos intracelulares, taxa de consumo de glicose no meio de cultura, malonaldeído no meio de cultura e verificação do crescimento em meio semissólido soft agar, as células foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 células/poço em placas de cultura de 96 poços. Para as análises do ciclo celular, viabilidade e tipo de morte as células foram plaqueadas na densidade de 3×10^4 células/poço em placas de cultura de 24 poços. Para análise da metilação de DNA as células foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/poço em placas de 6 poços. Para as análises da atividade de SIRT1 as células foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/poço em placas de cultura de 6 poços. Para atividade de PARP1 as células foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/poço em placas de cultura de 6 poços. Para as análises de expressão gênica, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços na densidade de 3×10^6 células/poço para as exposições de 48 h, 3×10^5 células/poço para as exposições de 120 h e 1×10^5 células/poço para as exposições de 168 h. Para as análises de expressão das proteínas (ciclina

B1 e E-caderina), as células foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços na densidade de 2×10^5 células/poço em placas de cultura de 6 poços.

4.4.3. Nicotinamida ribosídeo (NR)

Para obter a nicotinamida ribosídeo foi realizada uma hidrólise da nicotinamida mononucleotídeo (NMN) da Sigma, como descrito por BIEGANOWSKI E BRENNER (2004). NMN (15 mg) foi incubado com 90 unidades de fosfatase alcalina por 3 h a 37 °C em 3 mL de tampão (100 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 8,0). A eficiência da hidrólise, bem como o isolamento da NR foi realizada por HPLC/DAD e a esterilização foi realizada utilizando kit de filtração (Ultracel, 3k). Por fim, a concentração da NR foi calculada por meio da determinação da absorbância em água ultrapura, utilizando o respectivo coeficiente de extinção molar (ϵ): NR, $\epsilon = 5700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 266 nm. As amostras foram mantidas a - 80 °C.

O método de HPLC/DAD (Shimadzu®) utilizado no isolamento e para avaliar a eficiência da purificação foi o mesmo. A condição cromatográfica consiste de uma coluna Shim-pack VP-ODS (250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm , 100A Shimadzu) eluída em gradiente por uma solução constituída de água ultrapura (Solução A) e metanol (Solução B), a 30 °C, com fluxo de 1 mL/min (5 – 20 min, 0 – 50 % de B). A válvula foi configurada para coletar o pico correspondente a NR durante o intervalo de 4,0 a 6,0 min.

4.4.4. Estabilidade da nicotinamida ribosídeo no meio de cultura

A verificação da estabilidade da NR no meio de cultura foi feita ao longo de 24 h de incubação a 37 °C. As amostras foram coletadas em 1, 3, 5, 7, 16, 20 e 24 h e NR foi quantificada por HPLC/DAD (Shimadzu®). A condição cromatográfica utilizada para avaliar a estabilidade consiste de uma coluna Shim-pack VP-ODS (250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm , 100A, Shimadzu) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1 % em água (solução A) e metanol (solução B), a 30 °C, com fluxo de 1 mL/min (0 – 5 min, 0 % solução B; 5 – 10 min, 0 a 100 % solução B; 10-20 min,

100 a 0 % solução B). Alíquotas de 20 µL das amostras foram injetadas no sistema cromatográfico, sendo que as análises foram realizadas em quadruplicata para cada tempo de coleta. Curva de calibração com concentrações de 10 a 50 µM de NR foi preparada para as quantificações.

4.4.5. Ensaios de citotoxicidade

A citotoxicidade da NR foi avaliada pelos ensaios de morte celular utilizando o corante cristal violeta (CVD), e pela atividade da cadeia respiratória mitocondrial, por meio de ensaio com o MTT. Para realização dos ensaios, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/poço, quintuplicata por grupo) com o meio de cultura BEGM. Após o período de adesão celular (24 h), as células BEAS-2B foram expostas a diferentes concentrações de NR (50, 10, 5 e 1 µM), por 1 a 192 h, com renovação do meio de cultura contendo NR a cada 24 h. Incubações controle também foram utilizadas nos ensaios.

Após definida a concentração de NR a ser utilizada no modelo experimental, investigou-se, na sequência os efeitos das incubações com o B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle por 24, 48, 72, 96, 120 e 168 h (inicialmente, 4×10^4 células; quadruplicada por grupo). Vale ressaltar que neste modelo experimental as células foram pré-incubadas com a NR por 24 h, e subsequentemente, iniciou as exposições com o B[a]P, por períodos de 0 a 168 h.

4.4.5.1. Análise do crescimento e sobrevivência celular após a exposição a NR

Como as células mortas não aderem às placas de cultura é possível avaliar o crescimento e a sobrevivência por meio da coloração das células aderidas com o corante cristal violeta (CVD). Após os diferentes períodos de exposição, o meio de cultura foi removido e a camada celular foi cuidadosamente lavada, por duas vezes, com solução salina fosfato tamponada (PBS) pH 7,0. Em seguida a solução de PBS foi removida dos poços e foi adicionado metanol (100 µL) como agente fixador, o mesmo foi aspirado após 40 segundos de contato. As células foram coradas com 50 µL/poço da solução de CVD (1% CVD em metanol 20%), por 10 min à

temperatura ambiente. Após o término da incubação, o corante foi cuidadosamente removido e cada poço foi lavado 4 vezes com 200 μL de PBS. O corante aderido às células foi dissolvido pela adição de 200 μL de uma solução de ácido acético 30% (v:v). Para construção de curvas padrão foram plaqueadas de $0,5 \times 10^4$ a 20×10^4 células/poço e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro com leitor de microplaca (SpectraMAX[®]), disponibilizado pelo laboratório da Profa. Sandra H. P. Farsky (FCF USP). Os dados foram obtidos a partir da leitura no comprimento de onda de 570 nm, subtraindo a leitura da placa em 690 nm (leitura de referência). Os resultados foram expressos em número de células.

4.4.5.2. Análise da atividade mitocondrial após a exposição à NR

Os ensaios com sais de tetrazólio 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]2H-tetrazólio-5-carboxanilida de sódio (XTT) e brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) são úteis para verificar a atividade de oxidorredutases. Quando o sal tetrazólio é convertido a formazam por clivagem redutiva do anel tetrazólio, formam-se cristais solúveis (XTT) ou insolúveis (MTT) que podem ser quantificados espectrofotometricamente. A quantidade de formazam produzida é proporcional à atividade de oxidorredutases e, portanto, pode refletir a quantidade de células vivas (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015). Entretanto, não é recomendável a utilização única dessa técnica para avaliar a viabilidade celular, uma vez que efeitos na atividade enzimática podem resultar da ação da substância de interesse e mascarar a perda de viabilidade celular.

4.4.5.2.1. Ensaio com o MTT

Após o término da exposição à NR, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS. Em seguida, uma solução pré-formulada de meio de cultura e solução de MTT (75 μL da solução 5 mg/mL em PBS) foi adicionada às células, as quais foram incubadas por 2 horas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após o período de incubação, retirou-

se cuidadosamente o meio de cultura e o precipitado azul formado foi ressuspenso com 100 μ L de DMSO. Os valores da absorbância foram mensurados fazendo-se a leitura no comprimento de onda de 595 nm, com leitura de referência no comprimento de onda de 690 nm, em espectrofotômetro com leitor de microplaca (SpectraMAX[®]), disponibilizado pelo laboratório da Profa. Sandra H. P. Farsky (FCF USP). Os resultados foram expressos em porcentagem relativa ao grupo controle.

4.6.1. Análise da viabilidade celular pela coloração com azul de tripan

O método se baseia no princípio de que células que apresentam membrana íntegra não adquirem a coloração azul. Entretanto, as células que apresentam danos à membrana adquirem a coloração (BUROW *et al.*, 1998). Com o objetivo de avaliar se o procedimento de tripsinização afeta a viabilidade celular após 168 h de incubações, foi realizado o ensaio com o azul de tripan. Após as 168 h de incubação, as células (inicialmente 2×10^4 células, N=5) foram lavadas com PBS e tripsinizadas (75 μ L de tripsina/EDTA por poço). Após 40 segundos de contato, a tripsina foi removida e as células foram incubadas por 5 minutos em estufa de CO₂, a 37°C. Concluída a incubação, foram adicionados 100 μ L de meio de cultura suplementado com 2% de SFB. As células foram cuidadosamente homogeneizadas e 100 μ L de azul de tripan foram adicionados. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade (% de viabilidade), onde o número total de células viáveis (não coradas) foi dividido pelo total de células (coradas e não coradas) e o resultado multiplicado por 100.

4.4.7. Análise do ciclo celular

Para a análise do ciclo celular, as células BEAS-2B expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle por 24, 72, 96 e 168 h (inicialmente, 4×10^4 células; quadruplicada por grupo) foram coletadas. Também foram realizadas análises em 48 e 72 h de exposição a NR (10 μ M) e controle. Após o período de exposição as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas (250

μL de uma solução de tripsina/EDTA por poço). Após 1 minuto de contato, a tripsina foi removida e as células foram incubadas por 5 minutos em estufa de CO_2 , a 37°C . Após a incubação foram adicionados $1000 \mu\text{L}$ de meio de cultura DMEM livre de fenol vermelho suplementado com 2% SFB. As células foram homogeneizadas, transferidas para tubos de citometria e centrifugadas a $500 g$ por 10 min a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados a cada tubo $5 \mu\text{L}$ de uma solução contendo a enzima RNase A (15 mg/mL) e $150 \mu\text{L}$ do tampão hipotônico fluorescente (PBS, 2% SFB, 0,05 % Triton- X100, 0,1% de citrato de sódio, $25 \mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio). As amostras foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente e as análises foram realizadas no sistema de citometria de fluxo. Foi avaliada a intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, monitorados no canal PerCP-Cy 5.5 ($\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi.}} = 695 \text{ nm}$). As análises foram realizadas com o auxílio da técnica de laboratório, a farmacêutica Renata Chaves Albuquerque no laboratório multiusuário da FCF-USP e para as análises dos dados foi utilizado o *software* Flowjo (Flowjo LCC, Oregon, EUA).

4.4.8. Análise do tipo de morte celular por citometria de fluxo

Também foram empregados ensaios de viabilidade celular por citometria de fluxo, utilizando a marcação com anexina V (FITC) e iodeto de propídio. Dois experimentos independentes foram realizados para análise do tipo de morte envolvida na citotoxicidade da B[a]P e/ou NR. O primeiro experimento foi realizado utilizando tanto as células aderidas quanto as células que se desprenderam da placa e estavam no meio de cultura. No segundo experimento, foi avaliada somente a morte das células que permaneceram aderidas às placas de cultura. Em ambas as análises foram utilizados controles positivos de marcação, por meio de incubações das células com DMSO (5%, em meio de cultura) por 24 h. Os procedimentos realizados nos ensaios são descritos a seguir.

Experimento 1: As células foram expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle por 96, 120, 144 e 168 h (inicialmente, 4×10^4 /poço, em placas de 24 poços, quintuplicada de amostras por grupo). Após o período de exposição, o meio de cultura foi coletado e as células foram lavadas

com PBS por 2 vezes. Nessa etapa, tanto o meio de cultura quanto o PBS foram coletados para tubos *falcon* de 15 mL. Em seguida, adicionou-se 100 µL de tripsina por poço, e então incubou-se as células por 5 minutos em estufa a 37°C. Posteriormente à incubação, foi adicionado 1 mL de solução de bloqueio (PBS : soro fetal bovino, 80:10 v/v). As células foram cuidadosamente homogeneizadas e transferidas para os tubos que continham o meio de cultura e o PBS que foram previamente coletados. Logo, as amostras foram centrifugadas a 300 g por 5 min. O *pellet* de células foi lavado com 2 mL de PBS gelado, e novamente centrifugadas a 300 g por 5 min. A marcação com Anexina FITC V e iodeto de propídio foi realizada conforme instruções do fabricante (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen™). As células foram ressuspensas com uma mistura de 36 µL de tampão de ensaio (10X Annexin V Binding Buffer) previamente diluído em água destilada (1:10), 2 µL Anexina FITC V e 2 µL de iodeto de propídio. As amostras foram incubadas por 20 min ao abrigo da luz, e posteriormente adicionou-se 160 µL de tampão de ensaio pré-diluído. As análises foram realizadas em sistema de citometria de fluxo, sendo que a intensidade de fluorescência foi monitorada para 10.000 eventos. As análises foram realizadas com auxílio da especialista do equipamento, a farmacêutica Renata Chaves Albuquerque, no laboratório multiusuário da FCF-USP e para análise de dados utilizou-se o software Flowjo (Flowjo LCC, Oregon, EUA).

Experimento 2: As células foram expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle por 96, 120, 144 e 168 h (inicialmente, 4 x 10⁴/poço, em placas de 24 poços, quintuplicada de amostras por grupo). Após o período de exposição, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com PBS por 2 vezes. Em seguida, adicionou-se 100 µL de tripsina por poço, e então incubou-se as células por 5 minutos em estufa a 37°C. Posteriormente à incubação, foi adicionado 1 mL de solução de bloqueio (PBS : soro fetal bovino, 80:10 v/v). As células foram cuidadosamente homogeneizadas, transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 300 g por 5 min. O *pellet* de células foi lavado com 2 mL de PBS gelado, e novamente centrifugadas a 300 g por 5 min. A marcação com Anexina FITC V e iodeto de propídeo foi realizada conforme instruções do fabricante (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen™). As células foram ressuspensas com uma mistura de 36 µL de tampão de ensaio (10X Annexin V Binding Buffer) previamente diluído em água destilada (1:10), 2 µL Anexina FITC V e 2 µL de iodeto de propídeo. As amostras foram incubadas por 20 min ao abrigo da luz, e posteriormente adicionou-se 160 µL de tampão de ensaio pré-diluído. As análises foram

realizadas em sistema de citometria de fluxo, sendo que a intensidade de fluorescência foi monitorada para 10.000 eventos. As análises foram realizadas com o auxílio da especialista do equipamento, a farmacêutica Renata Chaves Albuquerque, no laboratório multiusuário da FCF-USP e para análise de dados utilizou-se o software Flowjo (Flowjo LCC, Oregon, EUA).

4.4.9. Análise do consumo de glicose

A taxa de consumo de glicose pelas células BEAS-2B (inicialmente 2×10^4 células, quintuplicata por grupo) expostas por 24, 96 e 168 h ao B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle foi verificada pelo *kit* Glicose Liquiform® (Labtest, Brasil). O ensaio se baseia no sistema enzimático glicose oxidase/peroxidase com posterior leitura espectrofotométrica ($\lambda = 540$ nm). Essas análises foram realizadas no meio de cultivo das células pelo técnico Maurício dos Santos no Laboratório de prestação de serviços vinculado à FCF USP.

4.4.10. Formação de colônias em *Soft-agar*

O ensaio de formação de colônias em meio semissólido *soft agar* é um método bem estabelecido para verificar o crescimento celular independente de ancoragem em modelos experimentais *in vitro* (BOROWICZ et al, 2014). Dois tipos de experimento foram realizados conforme descrito a seguir.

Experimento 1: O ensaio foi realizado conforme o descrito em Borowicz *et al.*, 2014. Após 168 h de exposição ao B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle, as células BEAS-2B foram tripsinizadas e em seguida foram plaqueadas nas densidades de 15.000 por poço em meio de cultura contendo 0,35% de agarose de baixo ponto de fusão em placas de 6 poços com uma camada-base de 0,5% de agarose de alto ponto de fusão. As placas foram incubadas durante 14 dias (nas replicatas do experimento 1) e 13 dias (nas replicatas do experimento 2), a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO₂. A adição do meio de cultura fez-se a cada 3 dias. Após o período de crescimento em meio semissólido, as colônias foram fixadas com 200 µL de

paraformaldeído (4%, v/v) por 45 min. Na sequência, as colônias foram incubadas por 24 h com o fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) que se liga ao DNA. A intensidade de emissão de fluorescência do complexo DAPI-DNA foi mensurada em $\lambda_{exc.}= 358$ nm e $\lambda_{emi.}= 461$ nm, no equipamento Synergy H1 Multi-Mode Reader (Winooski, EUA), disponibilizado pela Profa. Dra. Tania Marcourakis (FCF USP). Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência emitida (Unidades Arbitrárias, U.A.). Alternativamente, foi feita a contagem das colônias com diâmetro igual ou superior a 100 μ m em microscópio invertido, utilizando-se aumento de 100 vezes.

Experimento 2: O ensaio foi realizado conforme o descrito em Borowicz *et al.*, 2014, com algumas adaptações. Após 168 h de exposição ao B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle, as células foram coletadas e transferidas para novas placas de cultura, onde permaneceram por 48 h somente com meio de cultura. Foram então plaqueadas na densidade de 15.000 células por poço em meio de cultura contendo 0,35% de agarose de baixo ponto de fusão em placas de 6 poços com uma camada-base de 0,5% de agarose de alto ponto de fusão. As placas foram incubadas durante 12 dias, a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO₂. A adição do meio de cultura fez-se a cada 3 dias. Após o período de crescimento em meio semissólido, as colônias foram fixadas com 200 μ L de paraformaldeído (4%, v/v) por 45 min. Na sequência, as colônias foram incubadas por 24 h com o fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) que se liga ao DNA. A intensidade de emissão de fluorescência do complexo DAPI-DNA foi mensurada em $\lambda_{exc.}= 358$ nm e $\lambda_{emi.}= 461$ nm, no equipamento Synergy H1 Multi-Mode Reader (Winooski, EUA), disponibilizado pela Profa. Dra. Tania Marcourakis (FCF USP). Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência emitida (Unidades Arbitrárias, U.A.). Alternativamente, também foi feita a contagem das colônias com diâmetro igual ou superior a 100 μ m em microscópio invertido, utilizando-se aumento de 100 vezes.

4.4.11. Extração do DNA das células após 168 h de exposição

As células foram expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle por 168 h (inicialmente, 5 x 10⁵/poço, em placas de 6 poços, quintuplicada de amostras por grupo). Após o término do período de exposição, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS. A

cada poço foram adicionados 1,5 mL da solução de lise celular (*Cell Lysis Solution, Genra Puregene® Kit*) com 25 µg de proteinase K, e as amostras foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi transferida para tubos tipo “falcon” de 50 mL, sendo vigorosamente agitada por 20 segundos. Foram adicionados 5 µL de uma solução contendo a enzima RNase A (15 mg/mL) e as amostras foram incubadas por 1 h a 37 °C. Após a incubação foram adicionados 500 µL da solução de precipitação proteica (*Protein Precipitation, Genra Puregene® Kit*) e novamente as amostras foram submetidas a uma vigorosa agitação por 20 segundos e posterior centrifugação a 8000 g por 10 min, 4 °C. Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante e aos tubos foram adicionados 2,5 mL de isopropanol gelado. Após leve agitação para precipitação do DNA, as soluções foram centrifugadas a 8000 g por 3 min, 4 °C, e o isopropanol foi descartado. O DNA foi lavado com 3 mL de etanol 70% em água, centrifugado a 8000 g por 3 min, 4 °C, seco ao ar e ressuspenso em 20 µL de solução de desferroxamina (0,1 mM). A concentração de DNA nas soluções foi verificada pela intensidade de absorvância em $\lambda = 260$ nm, utilizando-se o equipamento nanodrop (software ND 1000) disponível no laboratório da Profa. Silvy Maria Engler (FCF USP).

4.4.11.1. Hidrólise do DNA para as análises de 5-mC e 5-hmC

Alíquotas contendo 5 µg de DNA foram adicionadas a 2 µL de tampão Tris-HCl/MgCl₂ 200 mM (pH 7,4), 1 µL do padrão interno 1,N⁶-etenodA (400 fmol/µL), 1 µL do padrão interno [¹⁵N₃]5-hmC (400 fmol/µL) e 1 µL (0,31 unidade) de deoxirribonuclease I de pâncreas bovino (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 h com agitação de 1000 rpm. Após a incubação foram adicionados 1 µL (0,00016 unidade) de fosfodiesterase I de *Crotalus atrox* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1 µL (0,8 unidade) de fosfatase alcalina de mucosa intestinal bovina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). As amostras foram novamente incubadas a 37 °C por 1 h com agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora, com volume final da incubação de 40 µL, as amostras foram centrifugadas a 9300 g por 10 min. Após a centrifugação, alíquotas de 25 µL foram injetadas no sistema HPLC-DAD para quantificação de 2'-desoxicitidina (dC) e 5-mC, e alíquotas de 8 µL foram injetadas no sistema de HPLC-ESI-MS/MS (API4000 QTrap, Laboratório do Prof. Paolo Di Mascio, IQ USP) para quantificação de 5-hmC e 5-mC.

Curvas de calibração foram construídas no sistema de HPLC-DAD ($\lambda = 286$ nm) utilizando-se 10 – 4000 pmol de dC e 2 – 160 pmol de 5-mC, e no sistema de HPLC-ESI-MS/MS utilizando-se 0,1 – 20 pmol de 5-mC, 0,01 – 0,1 pmol de 5-hmC, e 80 fmol dos padrões internos 1,N⁶-etenodA e [¹⁵N₃]5-hmC.

Para as quantificações no sistema de HPLC-DAD foi utilizada a seguinte condição cromatográfica: Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em H₂O (Solução A) e ácido fórmico 0,1% em 50% metanol e H₂O (Solução B), a um fluxo de 1 mL/min, 35 °C, nas seguintes condições: 0 – 25 min, 0 – 40% B; 25 – 26 min, 40 – 0% B; 26 – 40 min, 0% B. O detector de DAD foi fixado em 286 nm para as quantificações de dC e 5-mC.

O método para as quantificações no sistema de HPLC-ESI-MS/MS está descrito abaixo.

4.4.11.2. Quantificação de 5-mC e 5-hmC por HPLC-ESI-MS/MS

A quantificação de 5-mC e 5-hmC nas amostras de DNA foi feita utilizando-se novo método cromatográfico padronizado no período.

No método anterior era utilizada uma coluna *Synchronis* HILIC (2) 100 mm x 4,6 mm, ID, 5 μ m, (Thermo Scientific, USA) eluída com um gradiente de acetonitrila (Solução A) e tampão acetato de amônio 5 mM, pH 8,2 (Solução B), a um fluxo de 600 μ L/min, 35 °C, nas seguintes condições: 0 – 20 min, 2 – 24 % B; 20 – 21 min, 24 – 2 % B; 21 – 35 min, 2 % B (Oliveira *et al.*, 2017). Essa condição levava a grande consumo de acetonitrila, tornando o método bastante custoso.

Assim, decidiu-se alterar as condições cromatográficas, tendo sido possível obter boa separação entre os analitos utilizando-se a seguinte condição: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 μ m, 100A Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída em gradiente por uma solução constituída de tampão acetato de amônio 10 mM (Solução A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (Solução B), a 35 °C, com fluxo de 350 μ L/min (0 – 7 min, 0 – 60% de B; 7 – 8 min, 60 – 100% de B; 8 – 10 min, 100% de B; 10 – 11 min, 100 – 0% de B, 11 – 20 min, 0% de B). A válvula de comutação

de fluxo foi configurada para permitir a entrada de eluentes no espectrômetro de massas durante o intervalo de 3 – 8 min. Além da intensa redução do uso de solvente orgânico, o método permitiu a redução do tempo de análise pela metade, sendo muito mais vantajoso.

As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo positivo (ESI⁺, [M+H]⁺), com os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 10 psi; GS1, 50 psi; GS2, 50 psi; CAD, medium; TEM, 450 °C; EP, 10 V e IS, 5500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM estão apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Fragmentações e energias utilizadas para análises dos níveis de metilação e hidroximetilação do DNA de células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula; Q1 e Q3: quadro polo 1 e 3).

Analito	Q1	Q3	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)
5-hmC 1	258,082	142	100	17	8
5-hmC 2	258,082	124,1	100	33	5
[¹⁵N₃]5-hmC	261,082	145	100	17	8
5-mC 1	242	126	100	17	5
5-mC 2	242	108,6	100	53	20
cdA 1	276,2	159,9	100	27	8
cdA 2	276,2	105,8	100	69	20
dC 1	228,055	112	100	15	20
dC 2	228,055	116,9	100	19	6

4.4.12. Quantificação dos metabólitos intracelulares

Dois experimentos foram realizados para quantificação dos metabólitos intracelulares, os métodos empregados em tais análises são descritos abaixo.

Experimento 1: no primeiro experimento foi realizada a quantificação simultânea dos metabólitos intracelulares NAD⁺, NADP⁺, ADP, ATP, AMP, lactato, fumarato, succinato, malato, glutamina e glutamato das células coletadas em 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de exposição. Foi utilizado o sistema de HPLC-ESI-MS/MS (API4000 QTrap, Laboratório do Prof. Paolo Di Mascio, IQ USP). O preparo das amostras foi realizado como descrito por RAHMAN *et al.*, 2014, com algumas modificações. Após os períodos de exposição de 0-168 h a B[a]P, NR, B[a]P+NR e grupo controle, o meio de cultura das células BEAS-2B foi removido e a camada celular foi cuidadosamente lavada com PBS. Subsequentemente, as células foram ressuspensas em 100 µL de uma solução de acetonitrila e tampão acetato de amônio (5 mM, pH 8,5) na proporção de 9:1 (v:v) para a completa inibição do metabolismo celular. As amostras foram armazenadas a -80 °C. Na sequência, a solução de inibição foi coletada e seca a vácuo. Foram adicionados 385 µL de uma solução de solvente de extração (40% acetonitrila, 40% metanol e 20% água) e 15 µL do padrão interno ([¹³C₁₀¹⁵N₅]ATP, 500 pmol) nos poços contendo as células. As placas foram novamente centrifugadas a 20.000 g e alíquotas de 450 µL foram transferidas para *ependorfs*. Por fim as amostras foram armazenadas a -20 °C. No momento da análise, as amostras foram secas a vácuo, ressuspensas em 30 µL de água ultrapura e centrifugadas por 5 min a 16.000 g. Foram injetados 6 µL no sistema HPLC-ESI-MS/MS. As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo negativo (ESI⁻, [M-H]⁻), com os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 18 psi; GS1, 40 psi; GS2, 45 psi; CAD, medium; TEM, 650 °C; EP, -10 V e IS, -4500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM estão apresentadas na **Tabela 2**. A razão entre as áreas (metabólitos/[¹³C₁₀¹⁵N₅]ATP) foi utilizada para quantificação. Curvas padrão foram preparadas e injetadas para os metabólitos listados anteriormente e a seguinte condição cromatográfica foi otimizada para separação dos analitos: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,01% de ácido acético em água (Solução A) e 40 % de acetonitrila em

tampão acetato de amônio 10 mM (Solução B), a 30 °C, com fluxo de 500 µL/min (0 – 2 min, 5 – 85 % de B; 2 – 3 min, 85 – 5 % de B; 3 – 9 min, 5 % de B).

Tabela 2. Fragmentações e energias que serão utilizadas para quantificação de metabólitos intermediários em células BEAS-2B expostas a B[a]P, B[a]P + NR e NR, e do grupo controle (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula; Q1 e Q3: quadro polo 1 e 3).

Analito	Q1	Q3	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Lactato 1	88,846	43	50	-40	-20	-1
Lactato 2	88,846	45	50	-40	-14	-7
Piruvato 1	86,843	43,1	50	-40	-14	-5
Piruvato 2	86,843	58,9	50	-40	-12	-9
Fumarato 1	114,829	70,9	50	-30	-12	-11
Fumarato 2	114,829	68,9	50	-30	-20	-1
Succinato 1	116,852	72,9	50	-25	-18	-1
Succinato 2	116,852	98,9	50	-25	-14	-5
Malato 1	132,839	114,7	100	-45	-16	-19
Malato 2	132,839	70,9	100	-45	-22	-13
α-cetoglutarato 1	144,864	100,8	100	-65	-14	-13
α-cetoglutarato 2	144,864	57,1	100	-65	-16	-5
Glutamina 1	144,845	126,7	50	-50	-18	-9
Glutamina 2	144,845	127,5	50	-50	-18	-7
Glutamato 1	145,851	101,9	50	-55	-18	-5
Glutamato 2	145,851	127,8	50	-55	-20	23
ADP 1	425,878	78,8	150	-70	-16	-13
ADP 2	425,878	158,7	150	-70	-64	-9
ATP 1	505,978	78,8	300	-65	-42	-17
ATP 2	505,978	159	300	-65	-124	-3
ATP (PI)	521	78,8	300	-65	-48	-17
NAD 1	662,122	540	50	-60	-124	-13
NAD 2	662,122	78,9	50	-60	-22	-13
NADH 1	664,126	78,7	50	-110	-106	-13
NADH 2	664,126	158,7	50	-110	-122	-7

NADP 1	742,081	620	50	-50	-76	-11
NADP 2	742,081	78,9	50	-50	-22	-13
NADPH 1	744,066	78,8	80	-105	-130	-13
NADPH 2	744,066	158,5	80	-105	-122	-13
AMP 1	345,887	78,9	50	-50	-80	-1
AMP 2	345,887	69,8	50	-60	-66	-1

Experimento 2: um segundo experimento foi realizado com o objetivo de aumentar a resolução dos picos cromatográficos de alguns analitos, aumentando a sensibilidade e a eficiência da análise. A coleta das amostras para análises no experimento 2 foi realizada da mesma forma, que no experimento 1, conforme descrito acima (Experimento 1). Três métodos foram utilizados para quantificação dos metabólitos das células coletadas em 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de exposição.

O **Método 2.1** foi utilizado para quantificação de malato, citrato, piruvato, lactato, aspartato, argininosuccinato, asparagina, arginina, fumarato, succinato, 2-L-hidroxiglutarato, glutamina e glutamato. O **Método 2.2** foi utilizado para quantificação de NAD⁺, NADP⁺, adenosina, nicotinamida e nicotinamida mononucleotídeo (NMN). O **Método 2.3** foi utilizado para quantificação de AMP, ADP e ATP.

As amostras foram coletadas como descrito para o Experimento 1. Antes da secagem a vácuo, foram adicionados outros dois padrões internos para serem utilizados nas quantificações dos metabólitos dos métodos 2.1 e 2.2: ácido benzoico (3,05 µL do padrão 0,01 µg/µL, correspondendo no final a 50 pmol no volume de injeção) e benzamida (3,02 µL do padrão 0,001 µg/µL, correspondendo no final a 5 pmol no volume de injeção).

Método 2.1. As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo negativo (ESI⁻, [M-H]⁻), com os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 18 psi; GS1, 40 psi; GS2, 45 psi; CAD, medium; TEM, 700 °C; EP, -10 V e IS, -4500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM estão apresentadas na **Tabela 3**. A razão entre as áreas (metabólitos/ácido benzoico) foi utilizada para quantificação. Curvas padrão foram preparadas e injetadas para os metabólitos listados e a seguinte condição cromatográfica foi otimizada para separação dos analitos: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A Phenomenex) com uma

pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,1% de ácido fórmico em água (Solução A) e 40 % de acetonitrila em tampão acetato de amônio 10 mM (Solução B), a 30 °C (0 – 4 min, 2 – 60% de B, 450 µL/min; 4 – 4,5 min, 60 – 100% de B, 450 – 600 µL/min; 4,5 – 5 min, 100% de B, 600 µL/min; 5 – 5,5 min, 100 – 2% de B, 600 µL/min; 5,5 – 6 min, 2 – 40% de B, 600 µL/min; 6 – 6,5 min, 40 – 2% de B, 600 µL/min; 6,5 – 14 min, 2% de B, 600 µL/min; 14 – 15 min, 2% de B, 600 – 450 µL/min). A fração cromatográfica compreendida entre 0,5 e 8,0 min foi direcionada para o espectrômetro de massas.

Método 2.2. As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo positivo (ESI⁺, [M+H]⁺), com os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 18 psi; GS1, 40 psi; GS2, 45 psi; CAD, medium; TEM, 700 °C; EP, 10 V e IS, 4500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM estão apresentadas na **Tabela 4**. A razão entre as áreas (metabólitos/benzamida) foi utilizada para quantificação. Curvas padrão foram preparadas e injetadas para os metabólitos listados e a seguinte condição cromatográfica foi otimizada para separação dos analitos: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,01% de ácido fórmico em água (Solução A) e 40 % de acetonitrila em tampão acetato de amônio 10 mM (Solução B), a 30 °C (0 – 2,5 min, 0 – 90% de B, 400 µL/min; 2,5 – 6 min, 90% de B, 400 µL/min; 6 – 6,5 min, 90 – 2% de B, 400 – 600 µL/min; 6,5 – 7 min, 2 – 90% de B, 600 µL/min; 7 – 8 min, 90% de B, 600 µL/min; 8 – 9 min, 90 – 0% de B, 600 µL/min; 9 – 14 min, 0% de B, 600 µL/min; 14 – 15 min, 0% de B, 600 – 400 µL/min). A fração cromatográfica compreendida entre 0,6 e 7,0 min foi direcionada para o espectrômetro de massas.

Método 2.3. As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo negativo (ESI⁻, [M-H]⁻), com os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 18 psi; GS1, 40 psi; GS2, 45 psi; CAD, medium; TEM, 700 °C; EP, -10 V e IS, -4500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM estão apresentadas na **Tabela 5**. A razão entre as áreas (metabólitos/[¹³C₁₀¹⁵N₅]ATP) foi utilizada para quantificação. Curvas padrão foram preparadas e injetadas para os metabólitos listados e a seguinte condição cromatográfica foi otimizada para separação dos analitos: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A

Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,01% de ácido fórmico em água (Solução A) e 40 % de acetonitrila em tampão acetato de amônio 10 mM (Solução B), a 30 °C (0 – 2,5 min, 2 – 90% de B, 400 µL/min; 2,5 – 3 min, 90 - 2% de B, 400 µL/min; 3 – 6 min, 2% de B, 400 µL/min; 6 – 6,5 min, 2 – 100% de B, 400 – 600 µL/min; 6,5 – 9 min, 100% de B, 600 µL/min; 9 – 9,5 min, 100 – 2% de B, 600 – 400 µL/min; 9,5 – 15 min, 2% de B, 400 µL/min). A fração cromatográfica compreendida entre 2,5 e 8,0 min foi direcionada para o espectrômetro de massas.

Tabela 3. Fragmentações e energias utilizadas para quantificação de metabólitos (Método 2.1) em células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula; Q1 e Q3: quadro polo 1 e 3).

Analito	Q1	Q3	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Lactato 1	88,900	45,000	50	-25	-14	-7
Lactato 2	88,900	43,000	50	-25	-18	-5
Piruvato 1	86,900	43,000	200	-40	-12	-5
Piruvato 2	86,900	42,600	200	-40	-18	-3
Fumarato 1	114,896	70,933	150	-35	-12	-1
Fumarato 2	114,896	42,041	150	-35	-14	-5
Succinato 1	116,900	72,800	50	-30	-18	-11
Succinato 2	116,900	83,900	50	-30	-10	-13
Malato 1	132,839	114,700	200	-45	-16	-19
Malato 2	132,839	70,900	200	-45	-22	-13
Citrato 1	190,900	111,100	200	-35	-20	-5
Citrato 2	190,900	86,900	200	-35	-26	-3
Aspartato 1	131,900	87,700	50	-45	-20	-5
Aspartato 2	131,900	114,900	50	-45	-16	-3
Glutamina 1	144,845	126,700	50	-50	-18	-7
Glutamina 2	144,845	127,500	50	-50	-18	-5
Glutamato 1	145,900	101,900	50	-50	-18	-5
Glutamato 2	145,900	127,700	50	-50	-16	-7
Argininosuccinato 1	289,000	270,700	50	-60	-16	-5
Argininosuccinato 2	289,000	131,000	50	-60	-34	-1
Arginina 1	173,100	130,800	50	-70	-18	-1
Arginina 2	173,100	155,800	50	-70	-16	-1
Asparagina 1	130,900	112,800	50	-50	-14	-5
Asparagina 2	130,900	113,900	50	-50	-16	-5
2-L-hidroxiglutarato 1	146,900	129,000	50	-35	-16	-7
2-L-hidroxiglutarato 2	146,900	85,000	50	-35	-24	-1
Ácido Benzoico (PI)	120,900	76,900	150	-45	-18	-1

Tabela 4. Fragmentações e energias utilizadas para quantificação de metabólitos (Método 2.2) em células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula; Q1 e Q3: quadro polo 1 e 3).

Analito	Q1	Q3	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Nicotinamida 1	122,9	80,0	150	61	31	14
Nicotinamida 2	122,9	78,0	150	61	35	14
NMN 1	335,1	123,0	150	36	23	6
NMN 2	335,1	97,0	150	36	39	18
Adenosina 1	268,1	136,0	150	56	31	6
Adenosina 2	268,1	119,0	150	56	67	22
NAD 1	664,1	135,9	150	61	67	6
NAD 2	664,1	427,5	150	61	39	10
NADH 1	666,1	648,2	150	91	25	18
NADH 2	666,1	513,2	150	91	37	12
NADP 1	744,0	136,3	150	61	83	4
NADP 2	744,0	603,0	150	61	31	16
NADPH 1	746,1	728,5	150	111	31	18
NADPH 2	746,1	301,6	150	111	47	20
Benzamida (PI)	122,0	104,9	150	51	19	18

Tabela 5. Fragmentações e energias utilizadas para quantificação de metabólitos (Método 2.3) em células BEAS-2B (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).

Analito	Q1	Q3	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
ADP 1	425,878	78,800	500	-70	-64	-13
ADP 2	425,878	158,700	500	-70	-42	-9
ATP 1	505,978	78,800	500	-65	-124	-17
ATP 2	505,978	159,000	500	-65	-48	-3
AMP 1	345,887	78,900	50	-50	-66	-1
AMP 2	345,887	96,800	50	-50	-20	-1
ATP (PI)	521,000	78,800	500	-65	-124	-17

4.4.13. Análise de componentes principais

Os modelos de componentes principais (PCA) foram construídos com as concentrações dos metabólitos succinato, piruvato, fumarato, arginina, citrato, lactato, asparagina, aspartato, 2-L-hidroxiglutarato, malato, argininosuccinato, nicotinamida, nicotinamida mononucleotídeo, NAD⁺, NADP⁺, ATP, ADP e AMP no *software* SIMCA P versão 12.0.1 (Umetrics, Suécia) utilizando o auto escalonamento.

Tabela 6. Parâmetros dos modelos de PCA.

Título	Número de componentes	Número de observações	R2X(cum)	Q2(cum)
Tudo	2	114	0.481	0.258
48h	2	19	0.523	0.132
72h	3	18	0.685	0.266
96h	2	19	0.478	0.0426
120h	3	20	0.773	0.276
144h	3	20	0.76	0.253
168h	3	18	0.767	0.306

A análise foi realizada com a colaboração da doutoranda Andréa Tedesco Faccio do grupo da Profa. Marina Franco Maggi Tavares do IQ/USP.

4.4.14. Análise da área cumulativa sob a curva

Com a colaboração da Profa. Silvia Regina Cavani Jorge Santos (FCF-USP), tratamos os dados de concentrações de metabólitos em cada período utilizando o *software* PK Solutions 2.0TM da Summit Research Services, de modo a obter a área cumulativa sob a curva (AUC, do inglês *cumulative area under the curve analyses*) para cada um dos metabólitos quantificados.

4.4.15. Atividade de SIRT1

As sirtuínas são uma família de desacetilases de histonas dependentes de NAD⁺. Essas enzimas modulam vários processos celulares em humanos e são subdivididas em sete grupos (SIRT1-SIRT7) de acordo com suas funções e com a distribuição na célula. Atualmente, está disponível comercialmente um kit para avaliar a atividade de SIRT1 em células e tecidos de animais. Os experimentos para quantificação de SIRT1 foram padronizados conforme as instruções do fabricante.

4.4.15.1. Extração de proteínas para análise da atividade de SIRT1

As células BEAS-2B (inicialmente, 1×10^5 células/poço, em placas de 6 poços, quadruplicata de amostras por grupo) foram coletadas em 24, 72, 120, 144 e 168 h de incubação com B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle. Após o período de exposição, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e lisadas em banho de gelo com 80 μ L de solução tampão RIPA (NaCl 150 mM, Triton X100 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e Tris 50 mM, pH 8,0) contendo 10 μ L/mL de EDTA (0,5 M) e 10 μ L/mL de coquetel inibidor de proteases e fosfatases. Após 10 min de contato e raspagem periódica com *cell scraper*, as placas foram centrifugadas a 2500 g a 4 °C por 10 min. As proteínas totais foram quantificadas no sobrenadante pelo método de Bradford e as alíquotas do extrato de proteínas foram estocadas a - 80 °C até a realização das análises.

4.4.15.2. Quantificação da atividade de SIRT1

Os experimentos de quantificação da atividade de SIRT1 nas células expostas ao B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle foram conduzidos conforme as instruções do fabricante, utilizando-se 5 μ L do extrato de proteínas. Após a incubação das amostras com 15 μ L de uma mistura de substrato e NAD⁺ e 10 μ L de tampão de ensaio por 45 min (37 °C), a reação foi interrompida pela adição de uma mistura de nicotinamida e revelador. Curvas de calibração (0,5, 1, 3, 5, 7, 10 μ M) foram preparadas com o padrão do peptídeo compreendendo os aminoácidos 379-382 da proteína p53 humana [Arg-His-Lys-Lys(Ac)]. A intensidade de emissão de fluorescência foi mensurada em $\lambda_{exc.} = 360$ nm; $\lambda_{emi.} = 460$ nm, no equipamento Synergy H1 Multi-Mode Reader (Winooski, EUA), disponibilizado pela Profa. Dra. Tania Marcourakis (FCF USP). Os resultados foram expressos em μ M de padrão desacetilado/ μ g de proteína.

4.4.16. Atividade de PARP1

As poli(ADP)ribose polimerase são alvos terapêuticos promissores para o câncer, doenças neurodegenerativas, inflamatórias e isquêmicas. Em resposta a danos ao DNA as poli(ADP)ribose polimerases (PARP1 e PARP2) são rapidamente ativadas. Uma vez ativada, o NAD⁺ é consumido para síntese de polímeros de ADP-ribose em proteínas nucleares alvos. Atualmente, está disponível um kit comercial de anticorpo policlonal para avaliar a atividade de PARP1 em células e tecidos (THURBER et al., 2014). Os experimentos para quantificação de PARP1 foram padronizados conforme as instruções do fabricante.

4.4.16.1. Extração de proteínas para análise da atividade de PARP1

As células BEAS-2B (inicialmente, 2 x 10⁵ células/poço, em placas de 6 poços, quadruplicata de amostras por grupo) foram coletadas em 120 e 168 h de incubação com B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle. Após o período de exposição, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e lisadas em banho de gelo com 300 µL de tampão de lise (reagente de lise celular, fluoreto de fenilmetilsulfonil 200 mM, inibidor de protease e fosfatase100X). Após 15 min de contato e raspagem periódica com *cell scraper*, o lisado celular foi coletado e se adicionou 15 µL de SDS, as soluções foram vigorosamente homogeneizadas e incubadas a 100 °C, por 5 min. Posteriormente à incubação, 3 µL de cátion magnésio 100X e 2 µL de DNase 1 foram adicionadas a cada tubo. O extrato celular foi novamente homogeneizado e incubado a 37 °C, por 90 min. Por fim, as mostras foram centrifugadas a 10000 g, por 10 min. O sobrenadante foi coletado, as proteínas totais foram quantificadas no sobrenadante pelo método de Bradford e as alíquotas do extrato de proteínas foram estocadas a - 80 °C até a realização das análises.

4.4.16.2. Ensaio para quantificação da atividade de PARP1

Os extratos de proteínas foram pré-diluídas em tampão de amostras (1:3, v/v), conforme preconizado pelo fabricante. Em seguida, foram adicionados 50 µL do extrato pré-diluído em cada poço, os mesmos foram vedados com filme de vedação e incubados a 4 °C, por 16 h. Após esse período, os poços foram lavados 4 vezes com 300 µL de PBST (PBS suplementado com 0,1% Tween 20). Logo, foram adicionados 50 µL de anticorpo (anti-poliADP-ribosilação) pré-diluído (1:250, v/v). As amostras foram novamente revestidas e incubadas a 25 °C, por 2 h. Na sequência, os poços foram novamente lavados com 300 µL de PBST por 4 vezes, e foram adicionados 50 µL do conjugado IgG-HPR pré-diluído. As amostras foram novamente revestidas com o filme de revestimento e incubados a 25 °C, por 1 h. Por fim, foi realizada uma última sequência de lavagens usando 300 µL de PBST, e pouco antes de realizar a leitura da quimiluminescência foi adicionado 100 µL da mistura de solução reveladora. A intensidade de quimiluminescência foi mensurada no equipamento Synergy H1 Multi-Mode Reader (Winooski, EUA), disponibilizado pela Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani (IQ USP).

4.4.17. Quantificação de malonaldeído no meio de cultura por HPLC-DAD

As células foram expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle por 24, 48, 72, 96, 120, (inicialmente, 2×10^4 /poço, em placas de 96 poços, quintuplicada de amostras por grupo). O meio de cultura foi coletado para *ependorf*, e as células foram lavadas por 2 vezes com 100 µL de PBS. Logo, foram adicionados 50 µL de solução de NaOH 150 mM em cada poço, para solubilização das proteínas. Os extratos de proteína foram quantificados pelo método de Bradford e o meio de cultura foi armazenado a -20 °C, até a realização das análises.

4.4.17.1. Análise de MDA no meio de cultura

O MDA possui ação citotóxica, genotóxica e é um dos aldeídos formados durante a fase de terminação da peroxidação lipídica (**Figura 4**) (ANTUNES et al., 2008).

A quantificação de malonaldeído (MDA) no meio de cultura foi realizada utilizando-se o método já padronizado pelo grupo. Após a realização das coletas, alíquotas de 100 μL do meio de cultura foram hidrolisadas com 10 μL de NaOH 4 M com subsequente incubação a 60 °C por 30 min sob agitação a 100 rpm. Ao término da incubação, 150 μL de H_2SO_4 1% (v/v) foram adicionados e as amostras foram submetidas à vigorosa agitação por 20 segundos com posterior centrifugação a 9.300 g por 10 min. Após a centrifugação, 175 μL do sobrenadante foram coletados e incubados com 25 μL de uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 1 mg/mL em HCl 2M). A reação de derivatização ocorreu em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 min. Alíquotas de 100 μL foram injetadas no sistema de HPLC–DAD (Shimadzu®). A seguinte condição cromatográfica foi utilizada para as análises: uma coluna Shim-pack VP-ODS (250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm , 100Å, Shimadzu) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de água (Solução A) e acetonitrila (Solução B), ambas suplementadas com ácido acético (0,2%; v/v), a 30 °C, com fluxo de 1 mL/min (0 – 28 min, 20 – 100% de B; 28 – 30 min, 100 – 20% de B; 30 – 40 min, 20% de B). O detector de DAD foi fixado em 306 nm para o monitoramento do produto MDA-DNPH. O padrão de MDA foi preparado pela adição de 1 μL de uma solução de 1,1,3,3-tetrametoxipropano a 10 mL de H_2SO_4 1% (v/v). Após a incubação (2 h, temperatura ambiente, no escuro) a concentração da solução foi calculada através da determinação da absorvância em H_2SO_4 1% (v/v), utilizando o respectivo coeficiente de extinção molar (ϵ): MDA, $\epsilon = 13700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 245 nm. Curvas de calibração foram feitas no intervalo de 0,05 – 6 μM de MDA.

4.4.18. Quantificação de proteínas totais

Alguns experimentos foram normalizados pela quantidade de proteínas totais nos extratos celulares. Essa normalização foi empregada nos ensaios de metabólitos intracelulares, quantificação de MDA no meio de cultura e atividade de SIRT1 e PARP. A quantidade de

proteínas em solução foi determinada pelo método de Bradford. O método se baseia na observação de que o azul brilhante de Coomassie se converte da forma vermelha para azul após ligação a proteínas. O complexo é formado rapidamente e permanece estável por um tempo relativamente longo (1 h), e tem alto coeficiente de extinção, o que permite grande sensibilidade na dosagem de proteínas (Bradford, 1976). Após o procedimento de extração dos metabólitos intracelulares descritos acima, as proteínas presentes nas placas foram solubilizadas com 40 µL de NaOH (300 mM) e armazenadas à - 20 °C. O procedimento de quantificação padronizado foi conduzido adicionando 195 µL de NaCl (150 mM), 5 µL de extrato de proteínas e 50 µL de reagente de Bradford. Curvas de calibração foram obtidas no intervalo de concentração de 0,0016 a 0,01 µg/µL de albumina de soro bovino.

4.4.19. Extração de RNA para as análises de expressão gênica

Para as análises das expressões gênicas de E-caderina, PTEN, semaforina 3F, p16(ink4a), nicotinamida fosforribosiltransferase e nicotinamida ribosídeo quinase, utilizou-se o kit de extração RNeasy[®] Mini kit (250) conforme instruções do fabricante. As células BEAS-2B foram incubadas por 48, 120 e 168 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e controle (inicialmente, 3 x 10⁵/poço, em placas de 6 poços, quintuplicada de amostras por grupo). Após o período de exposição, as células foram cuidadosamente lavadas 3 vezes com PBS gelado e procedeu-se com extração em banho de gelo. A cada poço foram adicionados 350 µL de tampão RLT, suplementado com 3,5 µL de β-mercaptoetanol. Após 15 min de contato e raspagem periódica com *cell scraper*, a solução foi transferida para seringa de insulina e submetida à pressão, para aumentar a eficiência da lise celular. Em seguida, o lisado foi transferido para *eppendorf* e foi vigorosamente submetido à homogeneização em vortex. Na sequência, foi realizada uma centrifugação a 8000 g por 5 min, e o sobrenadante foi coletado em *eppendorf*. Posteriormente, foram adicionados 350 µL de etanol 70%. A solução foi homogeneizada e transferida para a coluna (RNeasy Mini Spin Column), a qual foi submetida a centrifugação a 8000 g por 15 segundos, à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado, e foram realizados dois ciclos de lavagem. No primeiro ciclo, foram utilizados 700 µL de solução RW1, e o sistema foi

centrifugado a 8000 g por 15 segundos. Esse procedimento foi realizado 2 vezes para aumentar a eficiência das lavagens. No segundo ciclo, foram utilizados 500 µL de tampão RPE suplementado com etanol (8:2, v/v) e o sistema foi novamente centrifugado a 8000 g por 15 segundos, com uma segunda repetição, para aumentar a eficiência da lavagem. Por fim, a coluna foi centrifugada a 8000 g por 4 min, para remoção de resquícios das soluções de lavagem. Após esse procedimento a coluna foi transferida para um novo *ependorf* e foram adicionados 30 µL de água livre de Rnase. O sistema foi novamente centrifugado a 8000 g por 3 min. O filtrado obtido foi novamente passado pela coluna, com o objetivo de aumentar a extração do RNA. Todo o material utilizado estava livre de RNase e as etapas foram realizadas em fluxo laminar. As amostras foram quantificadas em nanodrop, e posteriormente foram diluídas a 5 ng/µL e armazenadas a -80 °C até a análise de integridade do RNA. As análises de integridade do RNA foram realizadas no Centro de Facilidade de Apoio a Pesquisa (CEFAP-ICB/USP) usando o sistema Bioanalyzer com *chips* RNA pico 6000, RIN eucarioto.

4.4.19.1. Obtenção de cDNA para as análises de expressão gênica

Depois de confirmada a integridade do RNA usando o sistema Bioanalyzer, foi realizada a síntese do cDNA. O High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit contém todos os componentes para a conversão quantitativa de até 2,5 µg de RNA total em DNA de fita simples em uma única reação de 20 µL. Nessa etapa, 2,5 µg (m/v) de RNA foram incubados com 2 µL de 10x RT Buffer, 0,8 µL de dNTPmix (100 mM), 2 µL de Randon Primers e 1 µL MultiScribe Reverse Transcriptase e água livre de nuclease (q.s.p.). O ensaio de obtenção do cDNA foi realizado sob as seguintes condições: estágio 1 (25 °C por 10 min), estágio 2 (37 °C por 120 min), estágio 3 (85 °C por 5 min) e estágio 4 (refrigeração a 4°C). Essas reações foram realizadas no laboratório da Profa. Ana Campa da FCF-USP. Após a obtenção do cDNA, as amostras foram armazenadas a -20 °C até a análise da expressão gênica.

4.4.19.2. Reação de PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o método de Taqman® (Life Technologies, Carlsbad, EUA). As reações foram feitas para um volume final de 10 µL, contendo 0,5 µL da mistura de *primers* (*forward and reverse*) com a sonda FAN-NFQ de cada gene, 1 µL de cDNA e 5 µL de 2X Taqman® gene mastermix e 3,5 µL de água livre de RNase. Nesses ensaios foram utilizados os *primers* PTEN (Hs02621230_s1), SEMA (Hs01030910_g1), E-caderina (Hs0123895_m1), P16InK4a (Hs00923894_m1), NAMPT (Hs00237184_m1), NMRK1 (Hs00944470_m1) e β-actina (Hs01060665_g1) fornecidos pela Life Technologies Corporation (Pleasanton, EUA), que não especifica a sequência nucleotídica, entretanto garantem a especificidade e funcionamento do ensaio. Para análise do mRNA, o nível relativo da expressão gênica dos genes alvos foi calculado em relação à expressão do gene endógeno (β-actina) utilizando o método do Ct (cycle threshold method).

O ensaio de PCR em tempo real pelo método de Taqman® foi realizado sob as seguintes condições: ativação da enzima AmpErase®UNG a 50 °C por 2 min, seguida da desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 15 seg a 95 °C para término do processo de desnaturação e por fim o anelamento e alongação dos *primers* e sonda a 60 °C por 1 min. As análises foram realizadas em triplicata técnica e cada grupo em quintuplicata experimental. Essas análises foram realizadas no laboratório do Prof. Jorge Sampaio da FCF-USP utilizando o equipamento StepOnePlus-RT-PCR (Applied Biosystems®, USA).

4.4.20. Ensaio para avaliar a contaminação com *Mycoplasma* sp da linhagem de células BEAS-2B

A contaminação microbiológica de cultura de células por fungos e bactérias pode ser detectada a olho nu. No entanto, a contaminação por *Mycoplasma* sp e endotoxinas permanecem invisíveis, e pode inclusive alterar as características fenotípicas e genotípicas das linhagens de células. Atualmente, muitos periódicos pedem evidências de ausência de *Mycoplasma* sp nas culturas de células, pois contaminantes não detectados são fontes de

interpretação equivocada de dados, além disso, a contaminação dificulta a reprodutibilidade dos ensaios. Portanto, descartar a possível contaminação por *Mycoplasma* sp nas culturas de células é um fator crucial no controle de qualidade em laboratório de pesquisa (VERITASBIO, 2021). Para realizar as análises, o meio de cultura das células BEAS-2B foi coletado em diferentes momentos e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises. O meio de cultura foi centrifugado a 8000 g por 5 min, e sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspensão em solução LOTE (Low Tris-EDTA) e então incubado por 5 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. A detecção do DNA de *Mycoplasma* sp nas amostras foi realizada por meio do PCR convencional utilizando mix (9,7 μL de água Mili-Q autoclavada, 4,5 μL de MgCl_2 50mM, 3 μL PCR buffer 10x, 1 μL de primer oligo sense (5' GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG 3'), 1 μL de primer oligo anti-sense (5' CGG ATA ACG GTT GCG ACC TAT 3'), 0,6 μL de dNTP e 0,2 μL de Taq polimerase 5 U/ μL por amostra). As amostras amplificadas foram submetidas à corrida de eletroforese (100V, 300mA), usando gel de agarose 3%. Após a corrida o gel foi incubado com solução de 0,01% de Gel Red em água Mili-Q. Para a detecção das bandas foi utilizado o transiluminador. As análises foram realizadas em colaboração com o laboratório da Profa. Silvy Stuchi e Profa. Ana Campa, ambas da FCF/USP.

4.4.21. Análise da expressão da proteína ciclina B1

As células BEAS-2B (inicialmente, 3×10^5 células/poço, em placas de 6 poços, quadruplicata de amostras por grupo) foram coletadas em 168 h de incubação com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e coletadas por tripsinização. Após a centrifugação, o *pellet* de células foi cuidadosamente lavado com 1 mL de PBS. As células foram novamente centrifugadas, e o lisadas com solução tampão (Tris 1 M, pH 8,0; NaCl 5M, EDTA, pH 8,0; Triton X-10; Deoxicolato de Sódio 10%; SDS 10%) suplementado com inibidores de proteases e fosfatases. As amostras foram congeladas e mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises. A segunda parte dos experimentos foi realizada em colaboração com Laboratório do Prof. Dr Leonardo Karam Teixeira, pesquisador do INCA/RJ. Nessa etapa as amostras foram mantidas por 30 min em banho de gelo. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi

coletado e transferido para novos tubos. Na sequência foi determinada a concentração de proteínas no extrato pelo método adaptado de Lowry. Em seguida, o tampão de amostra (Tris 200 mM, pH 6,8; SDS 8%; Glicerol 40%; Azul de bromofenol 0,01%; β -mercaptoetanol 10%) foi adicionado em volume equivalente a 1/3 do volume total da amostra.

Os extratos proteicos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida Bis-Tris 4-12% (Invitrogen, NP0322BOX) a 20 V por 16 horas em tampão de corrida MOPS SDS (Invitrogen, NP001) e, após o término da corrida, transferidos para membranas de PVDF (GE Healthcare, GE10600029). A transferência foi realizada a 45 mA por 2 horas em ambiente semi-seco (Owl™ HEP-1, Thermo Fisher) em tampão de transferência (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; Metanol 20%). Em seguida, as membranas foram bloqueadas utilizando uma solução de 1x TBST pH 7,5 (Tris 20 mM; NaCl 500 mM; Triton X-100 0,02%) e 5% leite desnatado por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação suave. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos primários anti-Ciclina B1 (Santa Cruz, sc-245, 1:1.000) e anti-GAPDH (Santa Cruz, sc-32233, 1:2.000) por 16 horas a 4 °C sob agitação suave. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 vezes por 15 minutos em 1x TBST pH 7,5 em temperatura ambiente e incubadas com anticorpo secundário (Pierce, 1:10.000) por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação. Após a incubação, as membranas foram lavadas 6 vezes por 15 minutos em 1x TBST pH 7,5. A revelação das membranas foi realizada através de um ensaio de quimioluminescência (ECL, Thermo Fisher) e da exposição das membranas por diferentes intervalos de tempo a filmes de raio X (GE Healthcare, 28906836). A densitometria das bandas foi realizada através do programa Image-J (NIH). Os níveis de Ciclina B1 foram normalizados a partir dos níveis de GAPDH das respectivas amostras e estão representados de forma relativa ao controle.

4.4.22. Análise estatística

Os dados são apresentados como média e erro padrão. Todas as análises apresentaram distribuição normal, e às médias entre os grupos foram comparadas por *teste T* ou Anova de uma ou duas vias, com testes de comparações múltiplas de Dunnet, Bonferroni ou Sidak. As

diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no *software* de análise estatística GraphPrism.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção da nicotinamida ribosídeo

A nicotinamida ribosídeo é um precursor de NAD^+ em células de mamíferos, fungos e bactérias (YANG; CHAN; SUAVE, 2007). Uma vez que a nicotinamida ribosídeo não está disponível comercialmente na forma pura, decidimos obtê-la como descrito por BIEGANOWSKI e BRENNER (2004), pela reação de hidrólise da nicotinamida mononucleotídeo catalisada pela fosfatase alcalina (item 4.4.3 de Material e Métodos). Na **Figura 13** são apresentadas as estruturas da nicotinamida mononucleotídeo (NMN) obtida comercialmente da Sigma e do produto nicotinamida ribosídeo (NR) obtido após reação catalisada pela fosfatase alcalina.

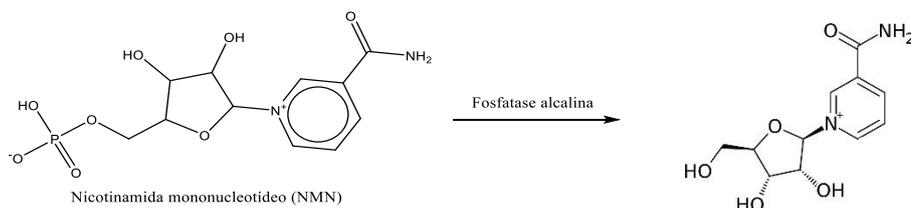


Figura 13. Estruturas da nicotinamida mononucleotídeo (NMN) e nicotinamida ribosídeo (NR).

O produto da hidrólise foi purificado por HPLC/DAD e sua concentração determinada por leitura da absorbância em 266 nm ($\epsilon = 5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), como descrito no item 4.4.3 de Material e Métodos. Na **Figura 14** são apresentados os cromatogramas obtidos antes e após a purificação da nicotinamida ribosídeo.

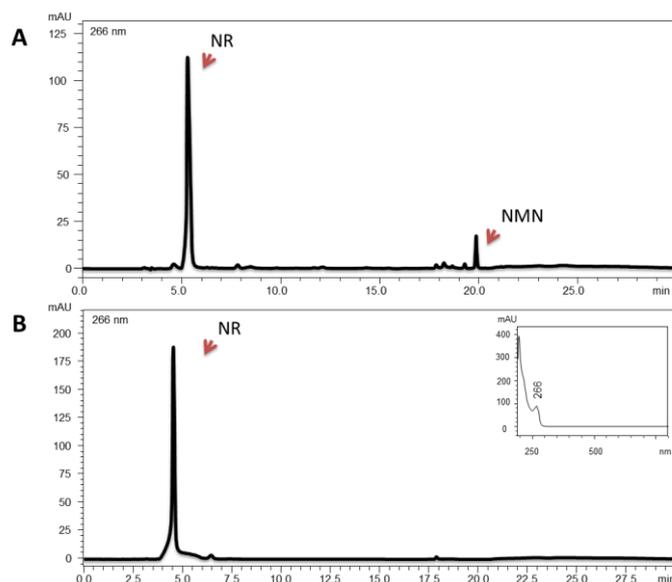


Figura 14. Cromatogramas obtidos por HPLC/DAD. A) separação cromatográfica entre NR e NMN. B) NR obtida após o procedimento purificação.

A estabilidade da solução aquosa da NR estocada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi monitorada por espectrofotometria. Os dados obtidos nas determinações das absorvâncias ao longo de 90 dias demonstram que a NR é estável ao longo desse período quando mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Tabela 7**).

Tabela 7. Intensidade de absorvância da solução aquosa de NR estocada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 meses.

Dia da determinação	Intensidade de absorvância ($\lambda = 266\text{ nm}$)
1	0,422
15	0,438
45	0,447
75	0,412
90	0,419

5.2. Análise da estabilidade de NR no meio de cultura

A estabilidade da NR no meio de cultura foi monitorada ao longo de 24 h a 37 °C, com quantificações em 1, 3, 5, 7, 16, 20 e 24 h por HPLC/DAD, conforme descrito em 4.4.4 de Material e Métodos. Após 24 h, NR foi detectada na concentração de 43% da concentração inicial (**Figura 15**). Uma vez que o meio contendo NR é renovado a cada 24 h, assumimos que NR está disponível para as células ao longo de todo o período de incubação. Não foi possível identificar produtos de degradação da NR no meio de cultura, uma vez que as análises foram realizadas por HPLC/DAD. Os cromatogramas obtidos durante as análises de estabilidade no meio de cultura são demonstrados na **Figura 16**.

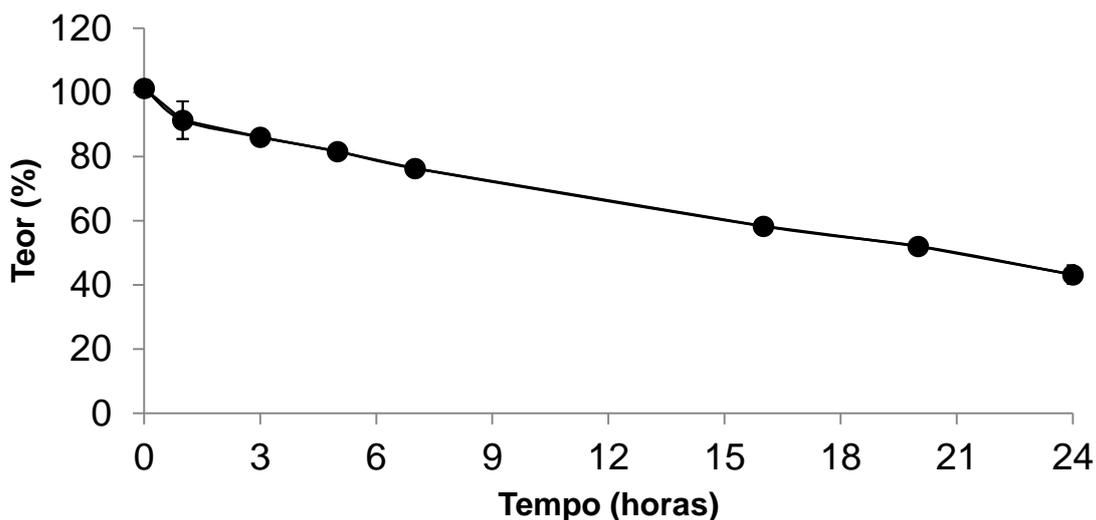


Figura 15. Concentração relativa (%) de NR no meio de cultura ao longo de 24 h a 37 °C.

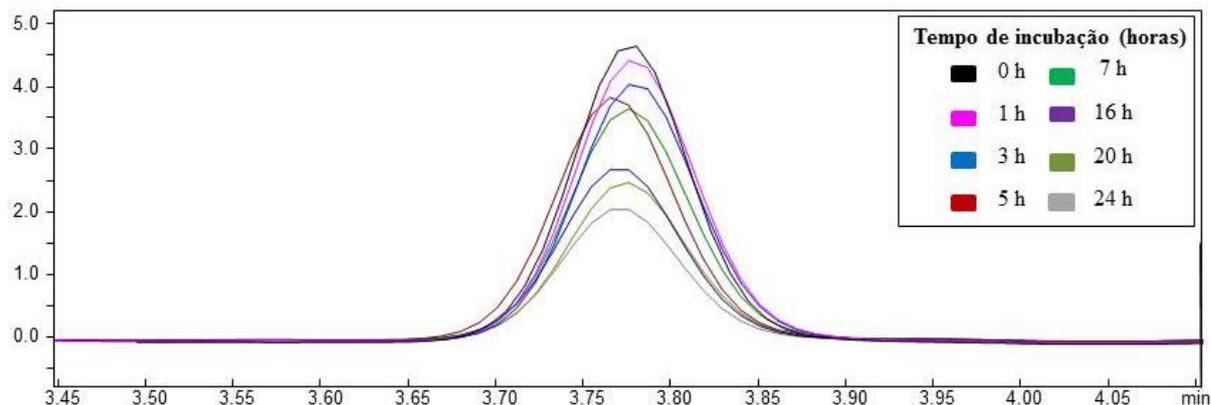


Figura 16. Sobreposição dos cromatogramas da análise de estabilidade de NR no meio de cultura ao longo de 24 h de incubações a 37 °C.

5.3. Citotoxicidade da NR em células BEAS-2B

A fim de definirmos a concentração de NR a ser utilizada nos ensaios de modulação do metabolismo, expressão de genes e proteínas, atividade de enzimas (PARP1 e SIRT1) e crescimento em *soft-agar* das células BEAS-2B, diferentes concentrações foram testadas em incubações ao longo de 192 h utilizando-se os métodos de coloração com o corante cristal violeta (CVD) e MTT.

As células BEAS-2B crescem aderidas à placa de cultura e, quando morrem, perdem a capacidade de adesão. Assim, é possível avaliar seu crescimento e sobrevivência por meio da coloração das células aderidas com o CVD, que se liga ao DNA das células (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016).

O ensaio foi realizado como descrito no item 4.4.5 de Material e Métodos. Foi avaliado o efeito da suplementação das células com diferentes concentrações de NR ao longo de 192 h de exposição, com coletas das células a cada 24 horas. Foi observada citotoxicidade dose e tempo dependente (**Figura 17**), com indução de morte celular em períodos superiores a 48 ou 72 h de incubação nos ensaios utilizando concentrações de 50, 10 e 5 μM de NR. No entanto, esse efeito citotóxico não foi observado para a concentração de 1 μM de NR, quando adicionada ao meio de cultura das células a cada 24 h.

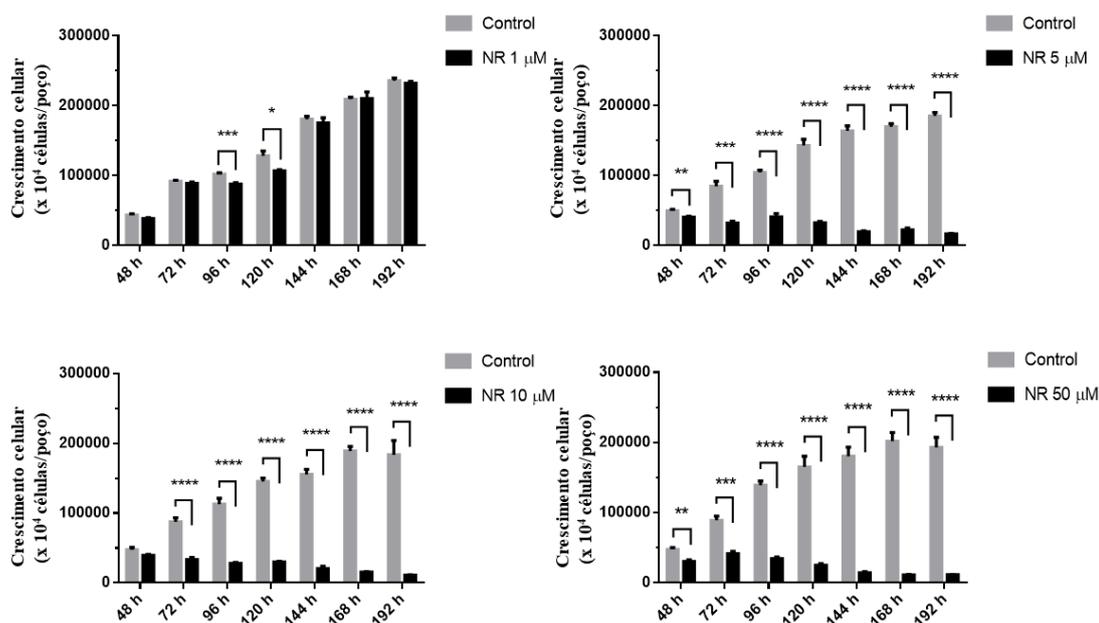


Figura 17. Crescimento das células BEAS-2B expostas a diferentes concentrações de NR. As análises foram feitas utilizando o método do CVD. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *t test*. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto à NR e o grupo controle em cada tempo ($p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***).

A suplementação com NR (50 a 600 μ M) é descrita em estudos anteriores com diferentes linhagens celulares, como Neuro2a (neuroblastoma), HEK293 (rim de embrião humano) e AB1 (células tronco embrionárias de camundongos) como não citotóxica (YANG; CHAN; SUAVE, 2007). Resultados de estudos de segurança biológica para a NR também são descritos na literatura (CONZE; CRESPO-BARRETO; KRUGER, 2016). No ensaio de Ames utilizando cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* incubadas com concentrações entre 50 e 5000 μ g, não foram observados efeitos mutagênicos. Para avaliar os efeitos de aberração cromossômica, cultura de linfócitos de um doador voluntário foi exposta a concentrações de 1 a 5 mg/mL de Niagen (Choromadex International, Irvine, California, USA). Os resultados da coloração com Giensa demonstraram que Niagen não altera o índice de divisão mitótica, não apresentando, portanto, efeitos clastogênicos nas concentrações utilizadas. No ensaio do micronúcleo *in vivo*, os animais (ratos) foram expostos por gavagem a doses entre 500 e 2000 mg/kg. Resultados da análise de medula óssea demonstraram que NR não induz a formação de eritrócitos policromáticos. Por fim, estudos de toxicidade aguda demonstram que NR não apresenta efeitos tóxicos 14 dias após administração de dose única de Niagen (5000 mg/kg). No entanto, estudos de toxicidade subcrônica, nos quais os animais foram expostos por 90 dias a doses diárias de 300, 1000 e 3000 mg/kg de Niagen ou 1260 mg/kg/dia de nicotinamida (dose equivalente a 3000 mg/kg/dia de Niagen), demonstraram que Niagen reduz o peso corporal dos animais em relação ao grupo controle. Além disso, induziu alterações hepáticas (aumento de ALT, AST, triglicerídeos e de ácidos biliares), renais (nefropatia) e no sistema reprodutor (atrofia dos túbulos seminíferos e redução no tamanho dos testículos) nos grupos tratados com dose diária de 3000 mg/kg (CONZE; CRESPO-BARRETO; KRUGER, 2016).

Diante dos dados de citotoxicidade da NR obtidos neste trabalho, que mostram que concentrações iguais ou superiores a 5 μ M induzem morte das células em períodos de exposição superiores a 48 h, consideramos com cautela a informação da literatura de que NR não é citotóxica em altas concentrações. É importante salientar que os estudos publicados de citotoxicidade da NR avaliaram a sobrevivência celular após 24 ou 48 h de uma única exposição a NR. No presente trabalho foi feita a suplementação diária e a citotoxicidade avaliada ao longo de 192 h.

Além do ensaio com o CVD, a viabilidade celular pode ser monitorada por meio da verificação da atividade mitocondrial das células. Dois tipos de sais de tetrazólio podem ser

utilizados nesses ensaios: XTT e MTT. Em ambas as situações, quando os sais de tetrazólio são convertidos a formazam por clivagem redutiva do anel tetrazólio, formam-se cristais solúveis (XTT) ou insolúveis (MTT) que podem ser quantificados espectrofotometricamente. A succinato desidrogenase é uma das enzimas responsável pela redução intracelular desses sais (RISS et al., 2016).

Os ensaios de atividade mitocondrial estão apresentados na **Figura 18 (A e B)**, e confirmam a citotoxicidade dose e tempo dependente. Foi observada citotoxicidade (**Figura 18A**) após 120 h de incubações a 5 μM de NR, e após 72 h de incubações a 10 e 50 μM de NR, com renovação de meio de cultura a cada 24 h.

Considerando o número de células vivas (ensaio com o CVD) foi possível calcular a capacidade redutiva de MTT por célula. Conforme demonstrado na **Figura 18B**, as células suplementadas com 10 e 50 μM de NR apresentaram aumento da atividade redutora do sal tetrazólio em 48 h e 96 h, havendo redução em relação ao controle após 168 h e 192 h de incubação. As células suplementadas com 5 μM de NR apresentaram aumento da atividade redutora do sal tetrazólio em 48 h, 72 h, 96 h e 120 h, também com redução em relação ao controle após 168 h e 192 h de incubação. Nas incubações com 1 μM de NR, houve aumento menos acentuado da atividade redutora do sal tetrazólio em 72 h, 96 h e 120 h, sem alterações em relação ao controle em períodos maiores de incubação.

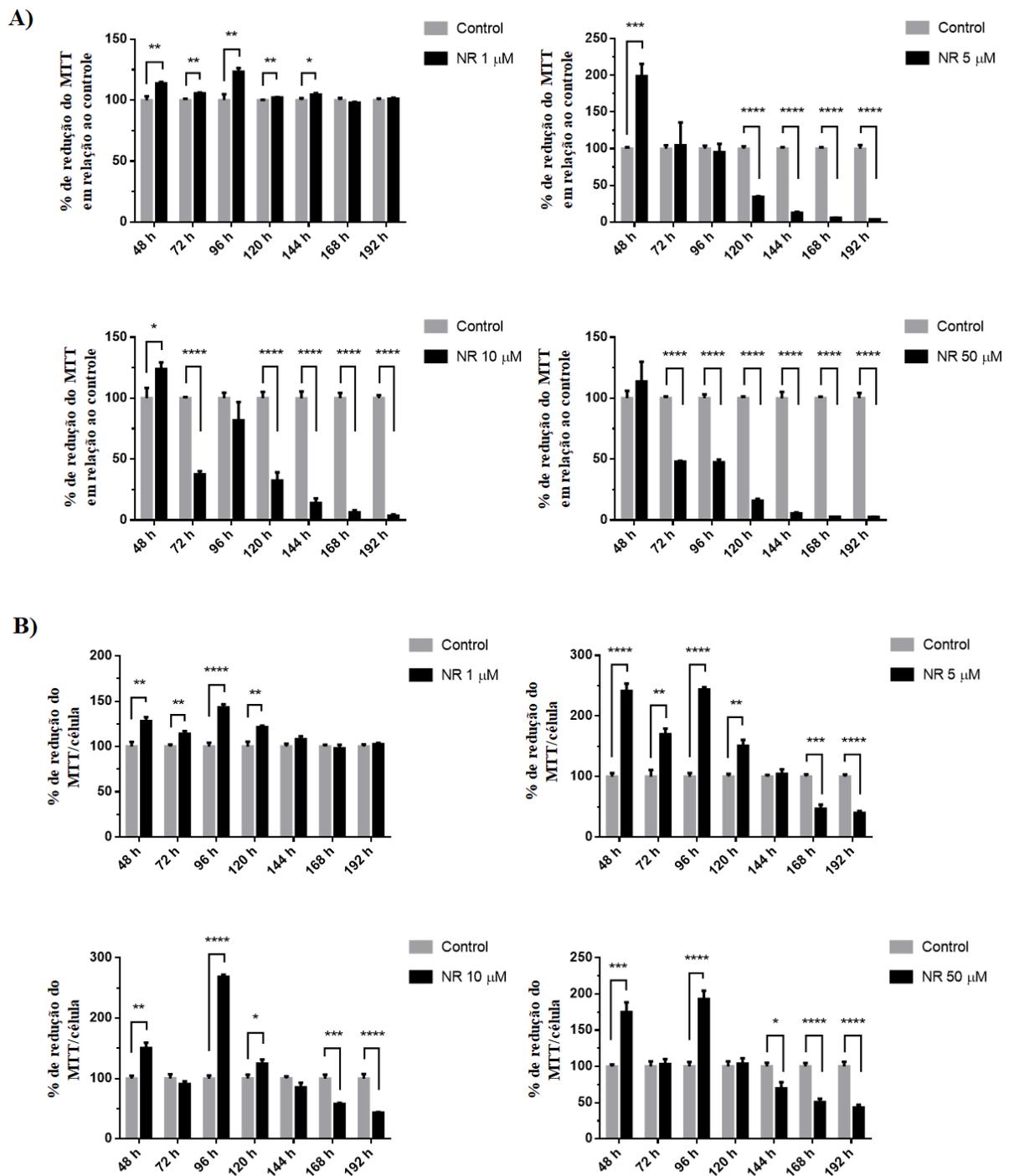


Figura 18. Atividade mitocondrial de células BEAS-2B expostas a diferentes concentrações de NR. **A.** Cálculo de % de redução do MTT em relação ao grupo controle. **B.** Cálculo de % de redução do MTT/célula em relação ao grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *t test*. Asteriscos indicam a significância das diferenças entre o grupo exposto à NR e o grupo controle em cada tempo ($p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***).

É descrito que o balanço NAD^+/NADH está intrinsecamente relacionado à atividade de proteínas ligantes de NAD^+/NADH , que atuam como sensores redox e traduzem a condição metabólica da célula para sistemas de controle da expressão gênica (KOCH-NOLTE et al., 2011). Portanto, a biossíntese, o transporte e o catabolismo de NAD^+ desempenham um importante papel na regulação de mediadores que consomem NAD^+ , como sirtuínas, poli(ADP-ribose)polimerases e ectoenzimas CD38/157, em compartimentos intra e extracelulares (STEIN; IMAI, 2012). Uma vez tendo sido verificado que NR na concentração de $1 \mu\text{M}$ não foi citotóxica para as células BEAS-2B em suplementações a cada 24 h ao longo de 168 h e que levou ao aumento da atividade redutora do sal tetrazólio até 96 h de incubação (o que indica aumento da atividade da cadeia respiratória mitocondrial), os ensaios subsequentes foram realizados com NR na concentração de $1 \mu\text{M}$ com suplementações a cada 24 h.

Investigou-se, na sequência, o efeito da suplementação com NR ($1 \mu\text{M}$) no crescimento celular e atividade mitocondrial modulados pela exposição ao B[a]P ($1 \mu\text{M}$) por 168 h. Vale ressaltar que as células foram pré-incubadas com a NR por 24 h, e subsequentemente, iniciou as exposições com o B[a]P ($1 \mu\text{M}$). Os resultados desses ensaios estão apresentados na **Figura 19** e **Figura 20**.

Ao analisarmos o crescimento das células ao longo do tempo (**Figura 19** e **Figura 20**), observamos que B[a]P ($1 \mu\text{M}$) em suplementações a cada 24 h induziu parada no crescimento celular no intervalo de 48 a 168 h. Na **Figura 21** observa-se que o B[a]P induziu a redução do sal tetrazólio (MTT) em 48 h e no intervalo de 120 a 168 h de incubação, indicando maior atividade da cadeia respiratória mitocondrial em relação ao grupo controle. As células incubadas com B[a]P+NR foram induzidas à morte entre 48 e 96 h, com subsequente parada do crescimento até 168 h (**Figura 19**). Maior atividade redutora do sal tetrazólio (MTT) foi observada em 96 h e 120 h (**Figura 21**) em comparação com as células suplementadas somente com B[a]P. As incubações somente com NR não levaram à parada do crescimento celular, apesar do aumento em relação ao controle da atividade redutora do MTT no período de 24 a 96 h. Nota-se, principalmente no ensaio do CVD (**Figura 19**), uma ação citotóxica seletiva da NR nas células expostas ao B[a]P.

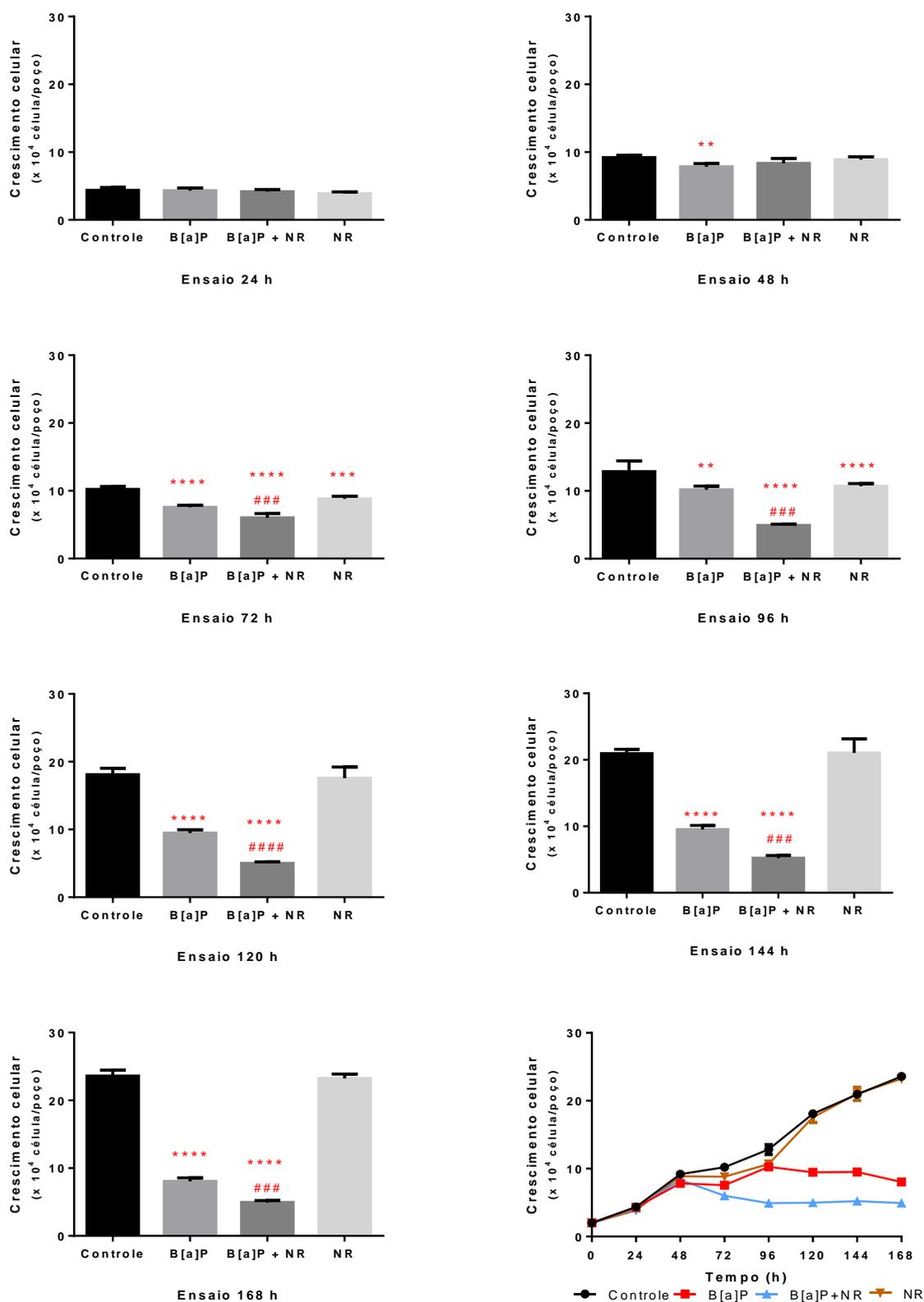


Figura 19. Curva de crescimento das células BEAS-2B expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. As análises foram feitas em intervalos de 24 h durante 7 dias (168 h). Os

resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Bonferroni, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$).

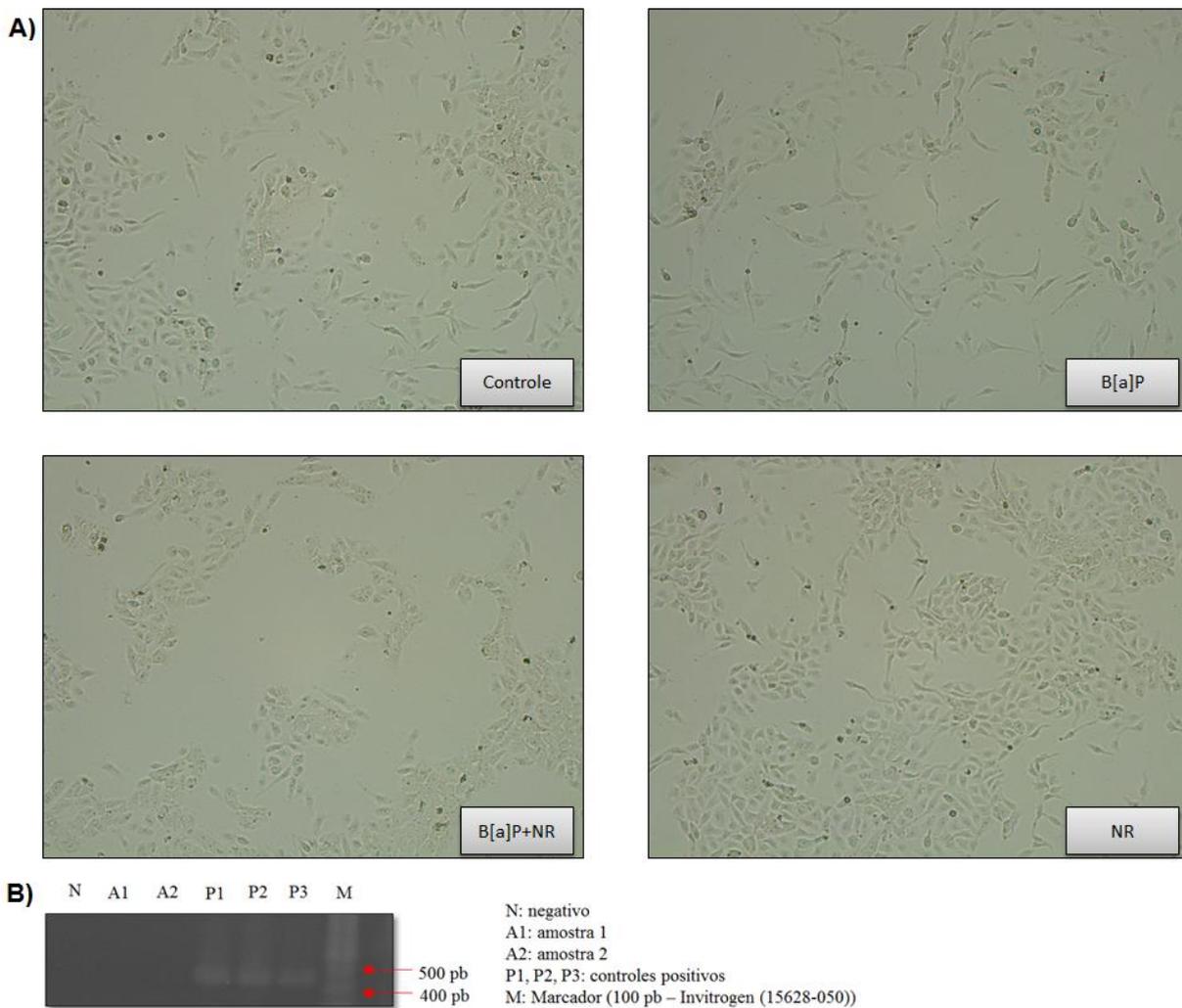


Figura 20. A. Imagem da morfologia de células BEAS-2B após 144 h de incubações com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle, utilizando placas de 96 poços. **B.** Representação do perfil de bandas de eletroforese em gel na análise de contaminação por *Mycoplasma* sp.

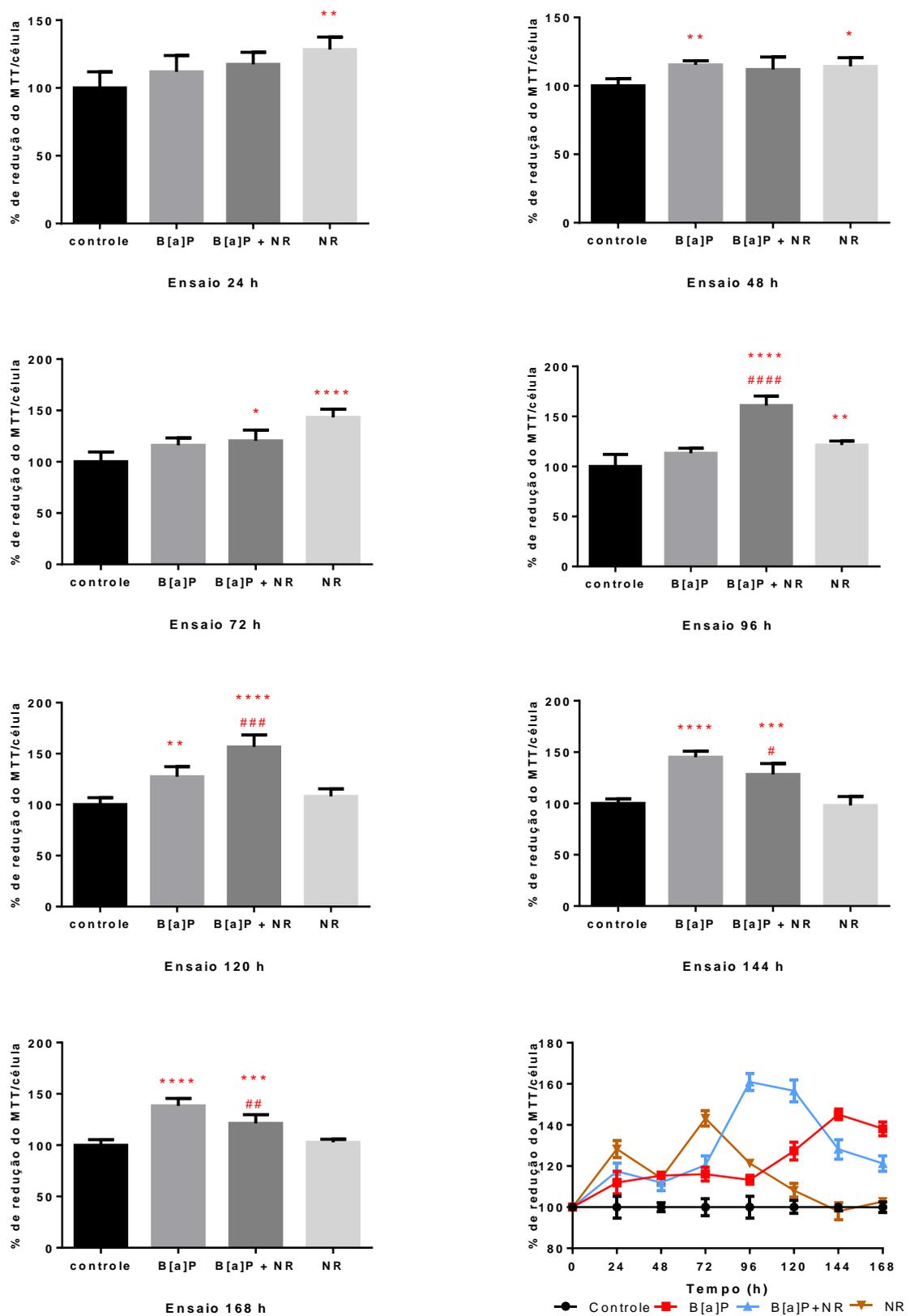


Figura 21. Curva de % de redução do MTT/célula das células BEAS-2B expostas ao B[a]P,

B[a]P+NR, NR e grupo controle. As análises foram feitas em intervalos de 24 h durante 7 dias (168 h). Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Bonferroni, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$).

É relatado que a suplementação com NR em modelos de células aumenta os níveis intracelulares de NAD⁺. Sabe-se que NAD⁺ é co-substrato para atividades de PARPs, sirtuínas, assim como para ADP-ribose cíclica e CD38, sendo continuamente degradado por essas enzimas, liberando nicotinamida (POLJSK, 2016). Por sua vez, é compreendido que nicotinamida regula negativamente as atividades de sirtuínas e PARP1. Além disso, está bem estabelecido que inibidores de PARP1 ou CD38 aumentam a biodisponibilidade de NAD⁺ para sirtuínas e bloqueiam o reparo de danos ao DNA, levando à morte celular (POLJSK, 2016). Outros estudos propõem que a inibição de SIRT1/2 induz a morte de células de linhagem de câncer de mama, sendo vista como possível tratamento para diversos tipos de câncer (ZHAO et al., 2013). As sirtuínas são uma família de proteínas que regulam importantes processos celulares, incluindo silenciamento gênico, inibição transcricional, estabilidade cromossômica, metabolismo celular, ciclo celular, apoptose e resposta celular a agentes causadores de danos ao DNA (HEBERLÉ, 2011; POLJSK, 2016). Estudos avaliando a inativação de sirtuínas por nicotinamida são amplamente encontrados na literatura. Além disso, estudos de modelagem molecular mostram que nicotinamida se liga ao sítio catalítico da enzima, impedindo a ligação da enzima ao co-substrato NAD⁺ (BITTERMAN et al., 2002).

5.4. Análise da viabilidade celular: coloração com azul de tripan

A análise da viabilidade celular após 168 h de exposição foi feita como descrito no item 4.4.6 de Material e Métodos. No experimento foram consideradas somente as células que permaneceram aderidas à placa de cultura após as exposições. Os resultados (**Figura 22**) demonstram uma redução do número de células viáveis de aproximadamente 7% no grupo B[a]P+NR em relação ao controle. Esses dados confirmam os dados apresentados anteriormente, quando observamos no ensaio do cristal violeta que NR foi seletivamente tóxica para as células incubadas com B[a]P, levando à parada do crescimento e redução do número de células aderidas à placa a partir de 72 h de exposição. É interessante notar que apesar de B[a]P parar o crescimento celular, não foi observada perda de viabilidade nesse grupo de células utilizando a marcação com o azul de tripan.

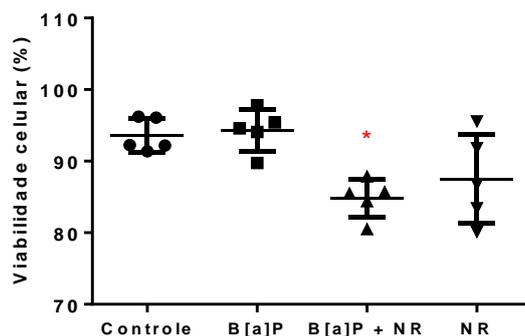


Figura 22. Viabilidade celular após exposição das células BEAS-2B por 168 h a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. As análises foram feitas pelo método de coloração com azul de tripan. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Bonferroni, em que o asterisco indica a significância da diferença entre o grupo exposto *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *).

5.5. Análise do ciclo celular

Estudos descrevendo os efeitos de B[a]P no processo transformação celular incluem a formação de lesões no DNA, mutações gênicas, alterações no ciclo celular e nos mecanismos de morte celular (DING et al., 2009; HE et al., 2018). Neste sentido, buscamos avaliar os efeitos da suplementação com B[a]P na presença e na ausência de NR no ciclo celular, nos períodos de 24, 72, 96 e 168 h de incubação (item 4.4.7 de Material e Métodos). Também avaliamos os efeitos em 48 e 72 h de incubação com NR (10 µM). Essas últimas análises tiveram como objetivo avaliar as alterações no ciclo celular de concentrações de NR que acarretaram em redução do número de células pelo método de coloração com o cristal violeta.

Os resultados obtidos para as células BEAS-2B expostas a B[a]P na presença e ausência de NR são demonstrados nas **Figuras 23 a 26**. Nas primeiras 24 h de incubação, houve redução do número de células em G0/G1 nas incubações com B[a]P e B[a]P+NR, e aumento do número de células em G2/M nas incubações com B[a]P+NR. Em 72 h, 96 h e 168 h observou-se decréscimo do número de células na fase G0/G1 e aumento nas fases S e G2/M nas incubações com B[a]P e B[a]P+NR. Esses resultados confirmam o observado no ensaio de crescimento celular, evidenciando a parada das células no ciclo. As incubações somente com NR reduziram o número de células em G0/G1 (em 72 h e 96 h) e aumentaram em G2/M (em 96 h), mas o ciclo celular desse grupo se normalizou em 168 h. Foi observada fragmentação do DNA (fração sub G0/G1) nas células expostas a B[a]P+NR por 168 h.

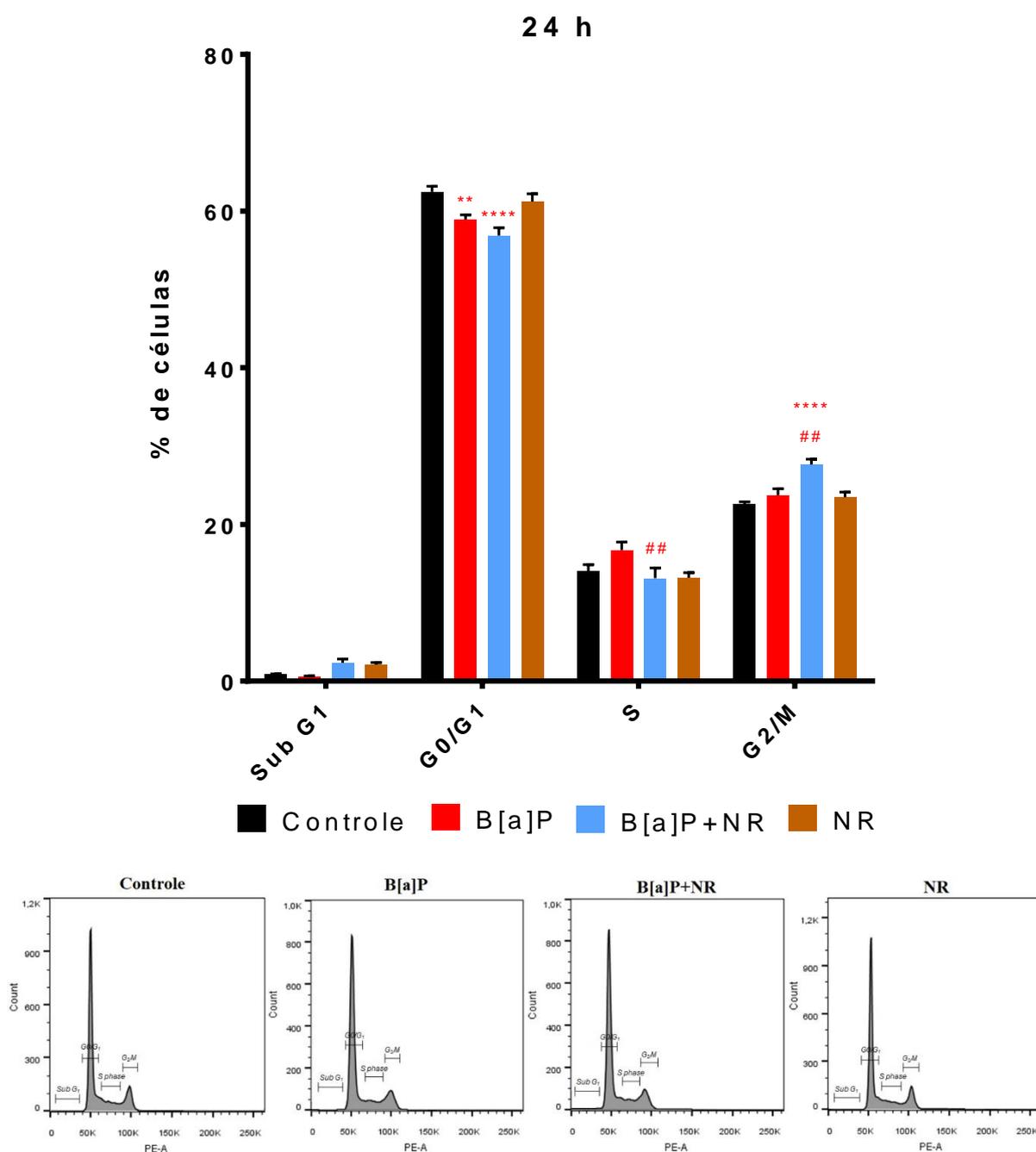


Figura 23. Análise de distribuição das fases do ciclo celular e fragmentação do DNA. Dados obtidos por citometria de fluxo das células BEAS-2B após 24 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *two-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).

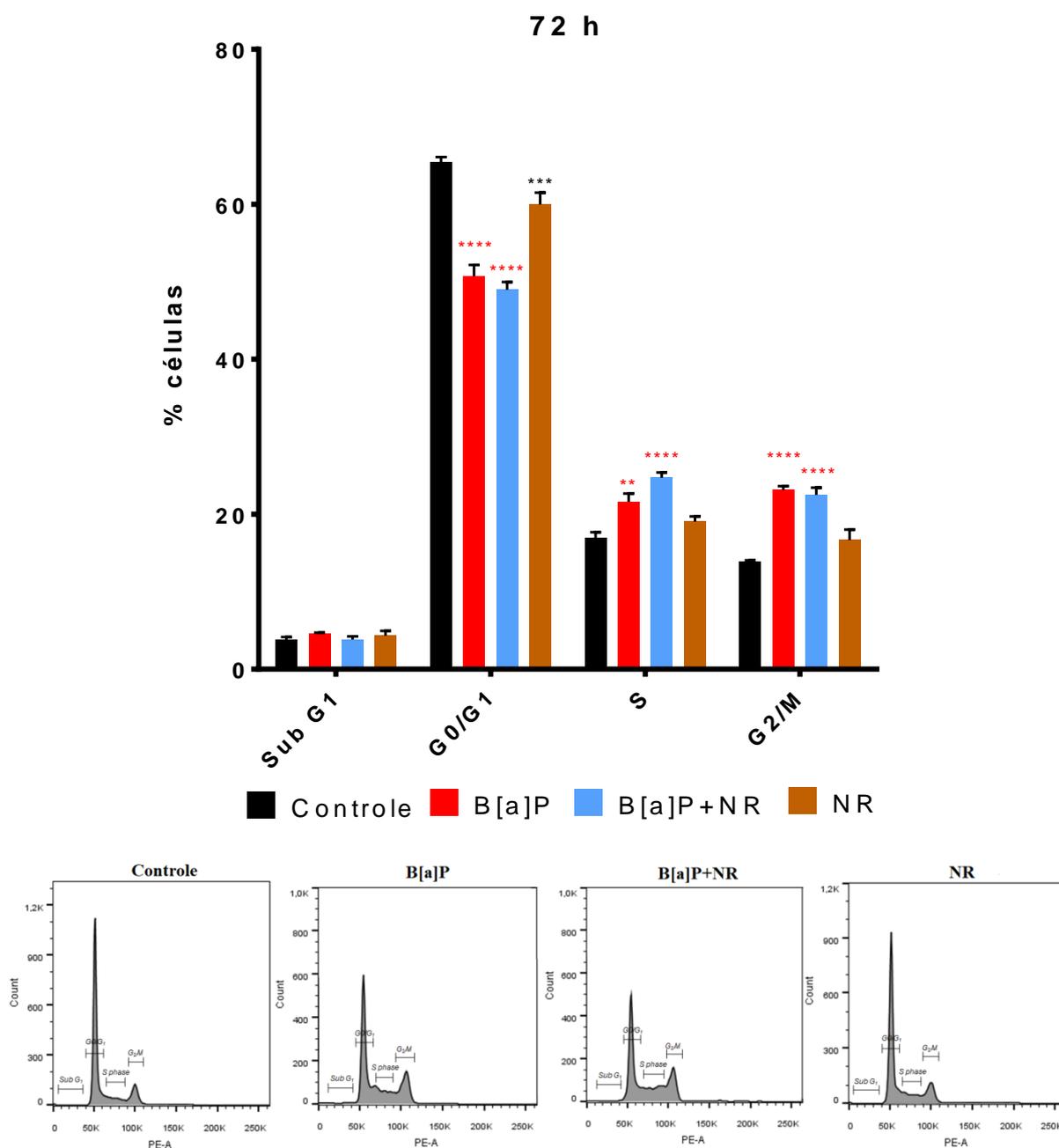


Figura 24. Análise de distribuição das fases do ciclo celular e fragmentação do DNA. Dados obtidos por citometria de fluxo das células BEAS-2B após 72 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão e uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *two-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, #####).

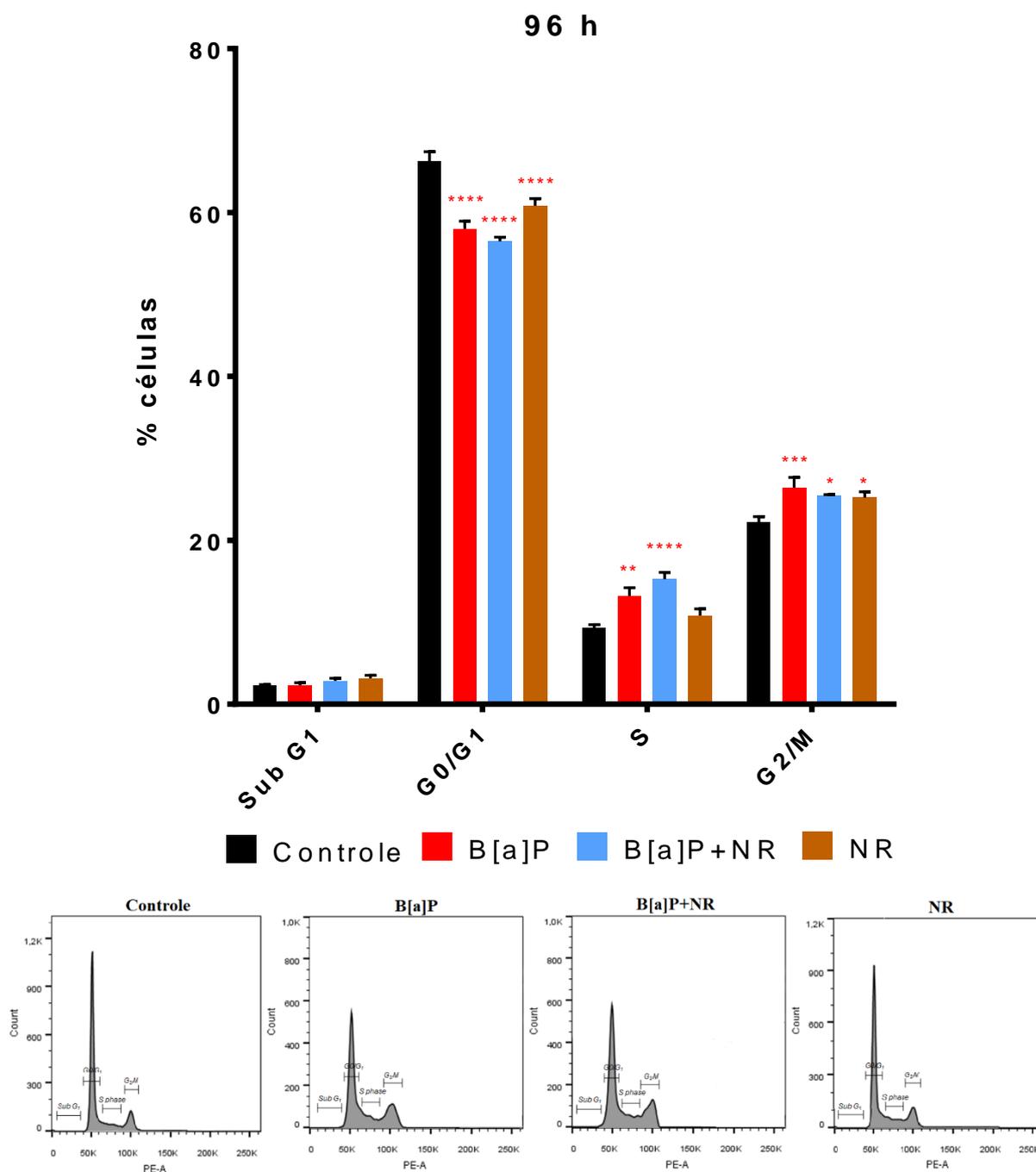


Figura 25. Análise de distribuição das fases do ciclo celular e fragmentação do DNA. Dados obtidos por citometria de fluxo das células BEAS-2B após 96 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *two-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).

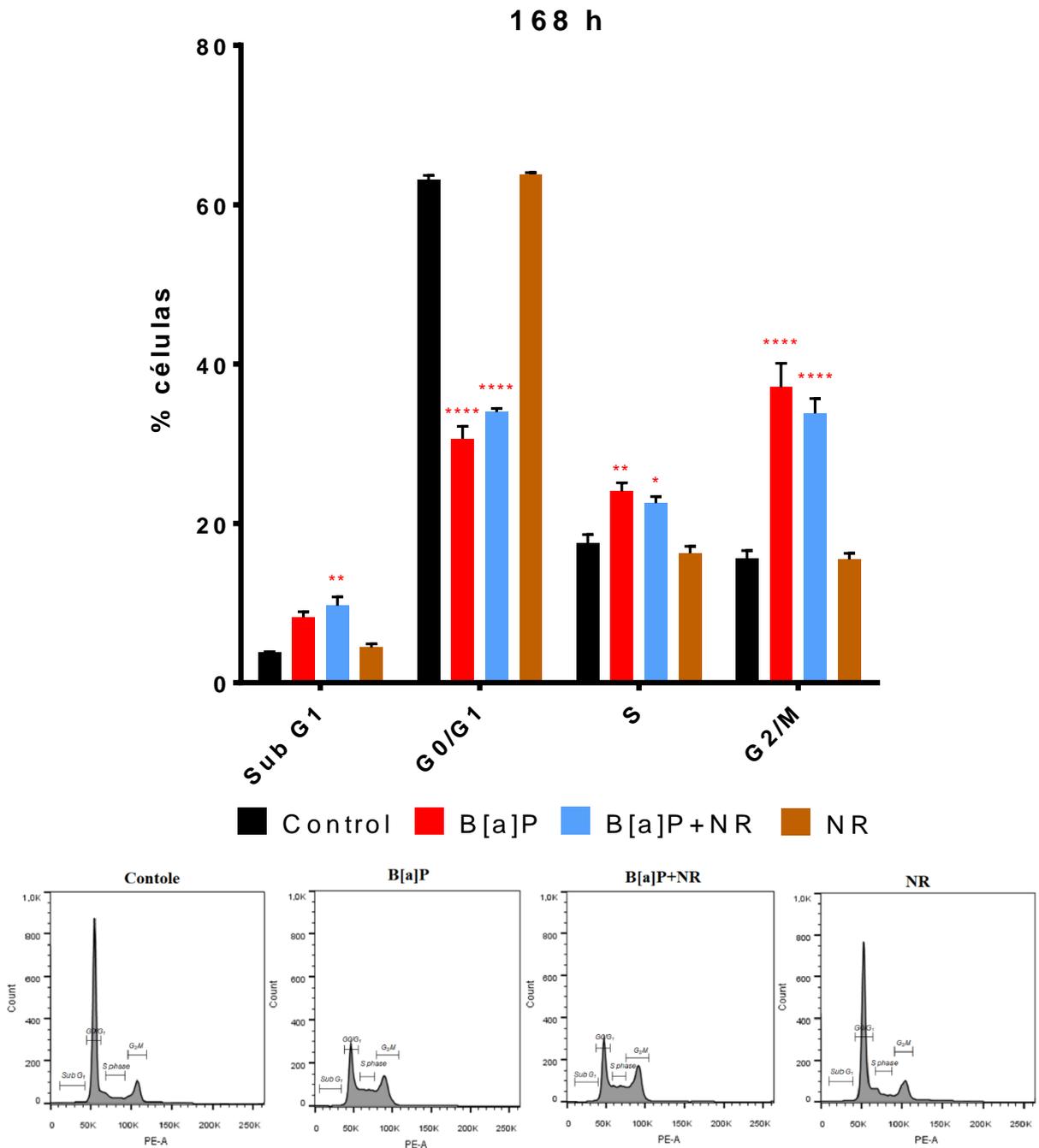


Figura 26. Análise de distribuição das fases do ciclo celular e fragmentação do DNA. Dados obtidos por citometria de fluxo das células BEAS-2B após 168 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *two-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, #####).

As alterações no ciclo celular induzidas por B[a]P são bem caracterizadas na literatura. Um dos possíveis efeitos de B[a]P nas células expostas é a indução da fragmentação do DNA, um importante evento que está diretamente associado à ocorrência de mutações e aberrações cromossômicas (DING et al., 2009; HE et al., 2018). A fase G0/G1 é preparatória para a divisão celular. Nesse período as células estão suscetíveis a estímulos positivos e negativos, que modulam o crescimento, diferenciação, multiplicação e apoptose, bem como a produção de enzimas e outras moléculas necessárias para a próxima fase do ciclo (IACOMINO et al., 2006). O aumento da proporção de células nas fases G2/M e S pode estar relacionado com a parada da replicação do DNA e associado com o surgimento de lesões no DNA. Estudos demonstram que o bloqueio da progressão do ciclo na fase G2/M representa um requisito para deflagração de apoptose (LIU et al., 2005).

Considerando que as células expostas a B[a]P e B[a]P+NR apresentaram parada de crescimento em G2/M, achamos pertinente avaliar os níveis de expressão de ciclina B1. Essas análises foram feitas em colaboração com o pesquisador Dr. Leonardo Karam Teixeira do Instituto Nacional do Câncer (INCA, Rio de Janeiro, RJ). O aumento da expressão de ciclina B1 nas células expostas a B[a]P (**Figura 27**) está de acordo com a observação de parada de ciclo celular em G2/M. As células expostas a B[a]P+NR não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, embora se tenha observado uma tendência de aumento na sua expressão. Já as células incubadas somente com NR apresentam expressão semelhante ao grupo controle.

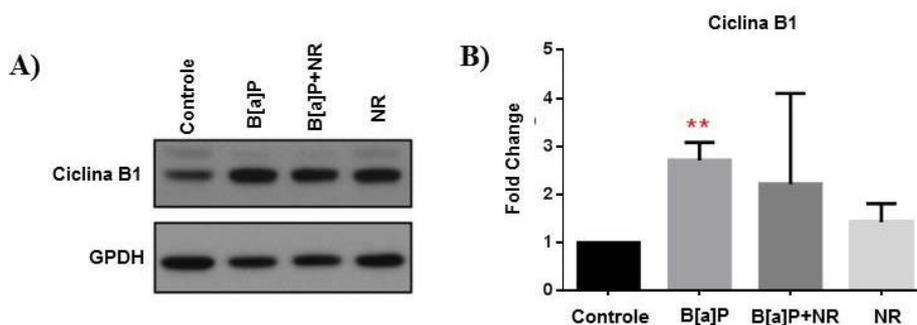


Figura 27. Expressão da proteína ciclina B1. A) Imagem representativa das bandas obtidas a partir de extratos proteicos de células BEAS-2B após 168 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. B) Expressão relativa de ciclina B1 após normalização com controle endógeno (GAPDH). Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de

Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **).

Dados da literatura mostram que células BEAS-2B e células de carcinoma brônquio-alveolar (H358) expostas por 6 h ao BPDE (0,03 - 0,3 μM) apresentaram redução da população de células em G0/G1 e parada do ciclo celular em G2/M (CAINO et al., 2007). As mudanças no ciclo celular também foram associadas a mutações em p53, sinalização pró-apoptótica, redução de ROS e formação de lesões no DNA em células BEAS-2B expostas ao BPDE, implicando em transformação celular (HUSSAIN et al., 2001; XU et al., 2012). Em outro estudo foi observado que células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) expostas por 12 h ao B[a]P (2,5 μM) apresentaram aumento de lesões em DNA quando na fase S e G2/M, em comparação às que apresentavam ciclo celular sincronizado (grupo controle) (JEFFY et al., 2000). A exposição de células BEAS-2B a 500 μM de BPDE por 24 h levou à parada do ciclo nas fases S e G2/M, paralelamente à diminuição da quantidade de células em G0/G1. Essa alteração foi acompanhada de crescimento em meio semissólido e aumento da tumorigenicidade em modelo de xenotransplante. Todas essas alterações foram associadas à superexpressão de ciclina D1, uma vez que o silenciamento de ciclina D1 reduzia esses efeitos (DING et al., 2009).

Quanto aos estudos de quimioprevenção, ZHU et al. (2014) realizaram a análise do ciclo celular de células BEAS-2B expostas a B[a]P pelo período de 24 horas. Foi observado aumento do número de células na fase G2/M com concomitante diminuição da população de células na fase G0/G1. No entanto, o tratamento paralelo com curcumina e vitamina E diminuiu esse efeito, além de acarretar em depleção dos níveis de ROS e de lesões no DNA. O uso de extrato aquoso de *Camptosorus sibiricus Rupr* também apresentou efeitos na redução de ROS e de danos ao DNA em células BEAS-2B e em células de adenocarcinoma de pulmão expostas por 48 h a B[a]P (HE et al., 2018). B[a]P reduziu a população de células na fase G0/G1 e aumentou na fase G2/M e S. Embora sem diferença estatística, houve uma tendência a aumentar a fragmentação do DNA em células expostas ao B[a]P (DING et al., 2009).

Além disso, os resultados obtidos nas análises do ciclo das células BEAS-2B expostas a 10 μM de NR (**Figura 28**) demonstram que houve redução do número de células em G0/G1 nas primeiras 48 h de incubação, paralelamente ao aumento em G2/M. Os mesmos efeitos foram observados em 72 h de incubação com 10 μM de NR

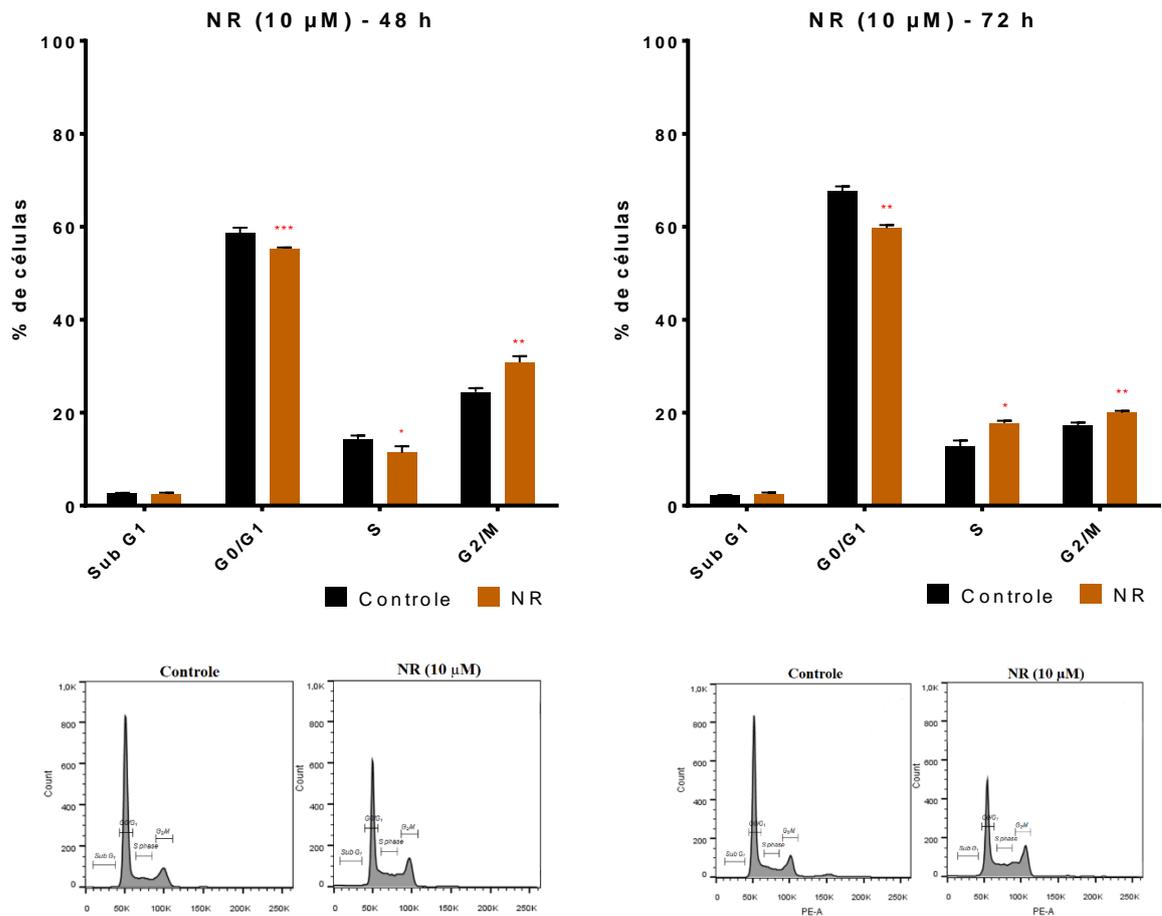


Figura 28. Análise de distribuição das fases do ciclo celular e fragmentação do DNA. Dados obtidos por citometria de fluxo das células BEAS-2B após 48 e 72 h de exposição a 10 μM de NR. Os resultados representam a média ± erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *teste t de students*, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****).

5.6. Análise da viabilidade e tipo de morte celular por citometria de fluxo

Considerando que os resultados apresentados até o momento indicavam uma parada de crescimento das células incubadas com B[a]P e uma toxicidade seletiva em células em co-exposição a B[a]P+NR, buscamos avaliar o tipo de morte envolvida neste processo. Como ferramenta utilizamos a marcação com anexina FITC V e PI. Dois experimentos independentes foram realizados, como descrito no item 4.4.8 de Material e Métodos.

No primeiro experimento foram coletadas tanto as células aderidas quanto as que estavam suspensas no meio de cultura. As análises foram realizadas nos períodos de 24, 120 e 168 h de incubação com B[a]P na presença e ausência de NR, sendo os resultados apresentados nas **Figuras 29 a 31**. Aumento da morte celular por apoptose foi observada em 120 e 168 h de exposição a B[a]P e B[a]P+NR em relação ao grupo controle. Entretanto, o grupo exposto a B[a]P+NR apresentou menos células em apoptose tardia, em comparação com o grupo exposto a B[a]P. Após 168 h de incubação houve aumento da porcentagem de células em apoptose inicial no grupo exposto a B[a]P+NR em comparação com o grupo exposto a B[a]P. Adicionalmente, foi observado pequeno aumento da porcentagem de células em necrose nas incubações com B[a]P (168 h) ou NR (24 e 168 h), e esse efeito não foi observado nas células incubadas com B[a]P+NR.

Na análise dos dados apresentados na **Figura 31** observa-se que os grupos B[a]P e B[a]P+NR apresentaram redução da viabilidade após 168 h, o que difere do verificado no ensaio com azul de tripan. Houve também pequena redução da viabilidade do grupo NR após 168 h. Deve-se considerar que para a análise apresentada nas **Figuras 29 a 31** foram coletadas as células aderidas e suspensas no meio de cultura, enquanto que a coloração com azul de tripan foi feita somente nas células que permaneceram aderidas à placa após as incubações. Além disso, como a coleta das células é feita após 24 h da última suplementação do meio de cultura, ao juntar todas as células (suspensas e aderidas) detectamos os eventos que ocorreram ao longo desse período.

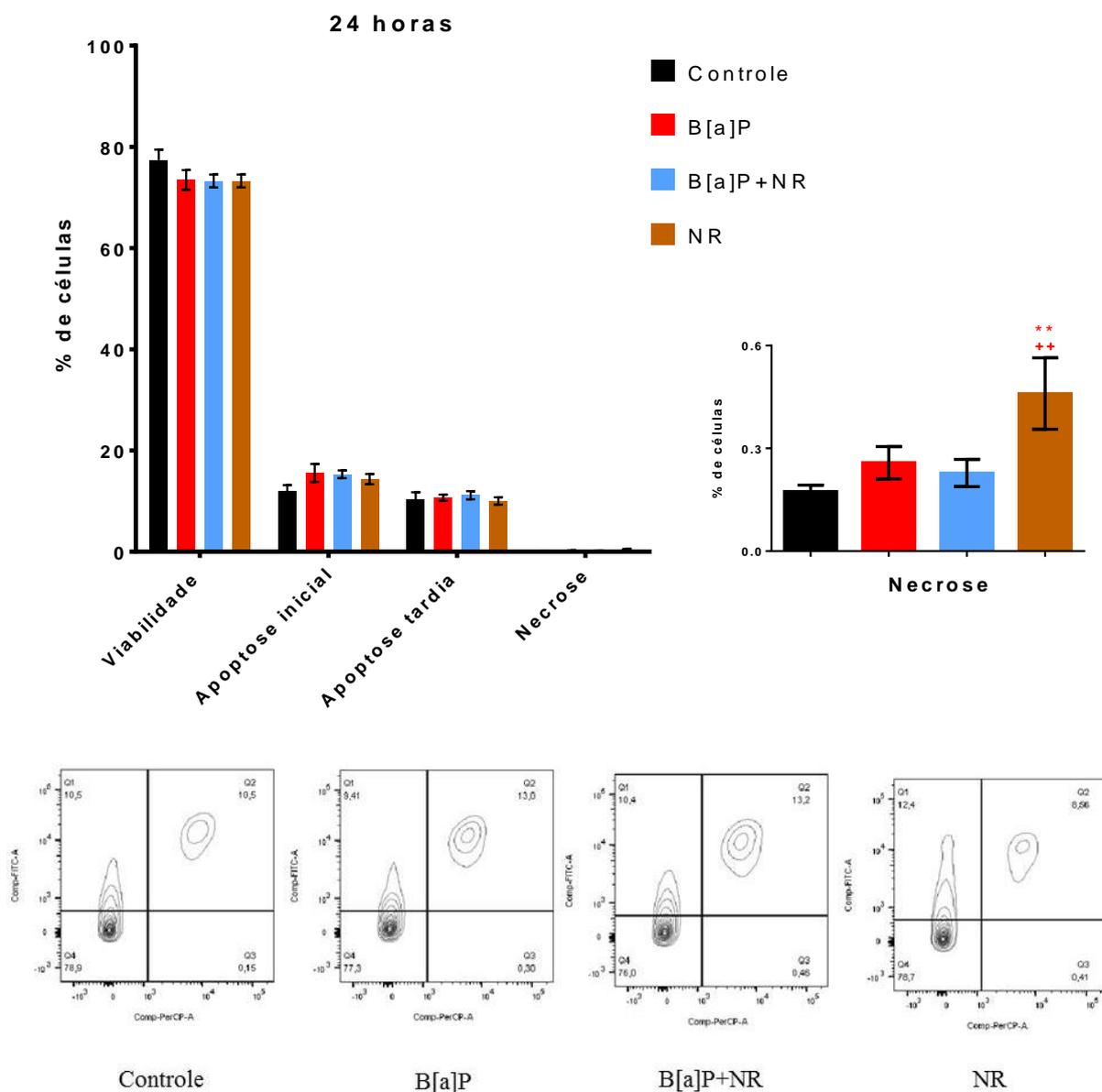


Figura 29. Viabilidade e tipos de morte avaliados por citometria de fluxo de células BEAS-2B células aderidas e em suspensão no meio de cultura, após incubações por 24 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++).

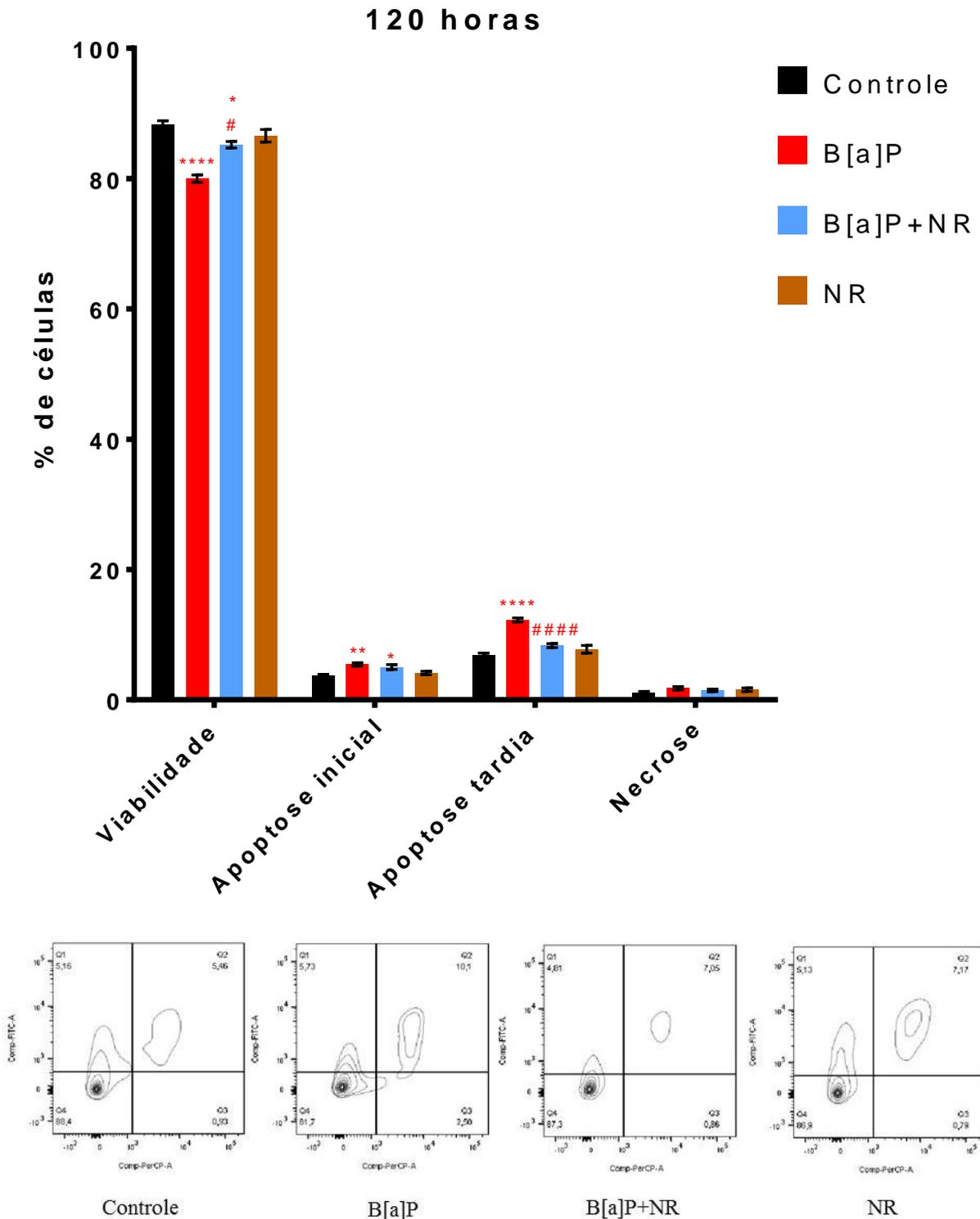


Figura 30. Viabilidade e tipos de morte avaliados por citometria de fluxo de células BEAS-2B células aderidas e em suspensão no meio de cultura, após incubações por 120 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos

expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****),
cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).

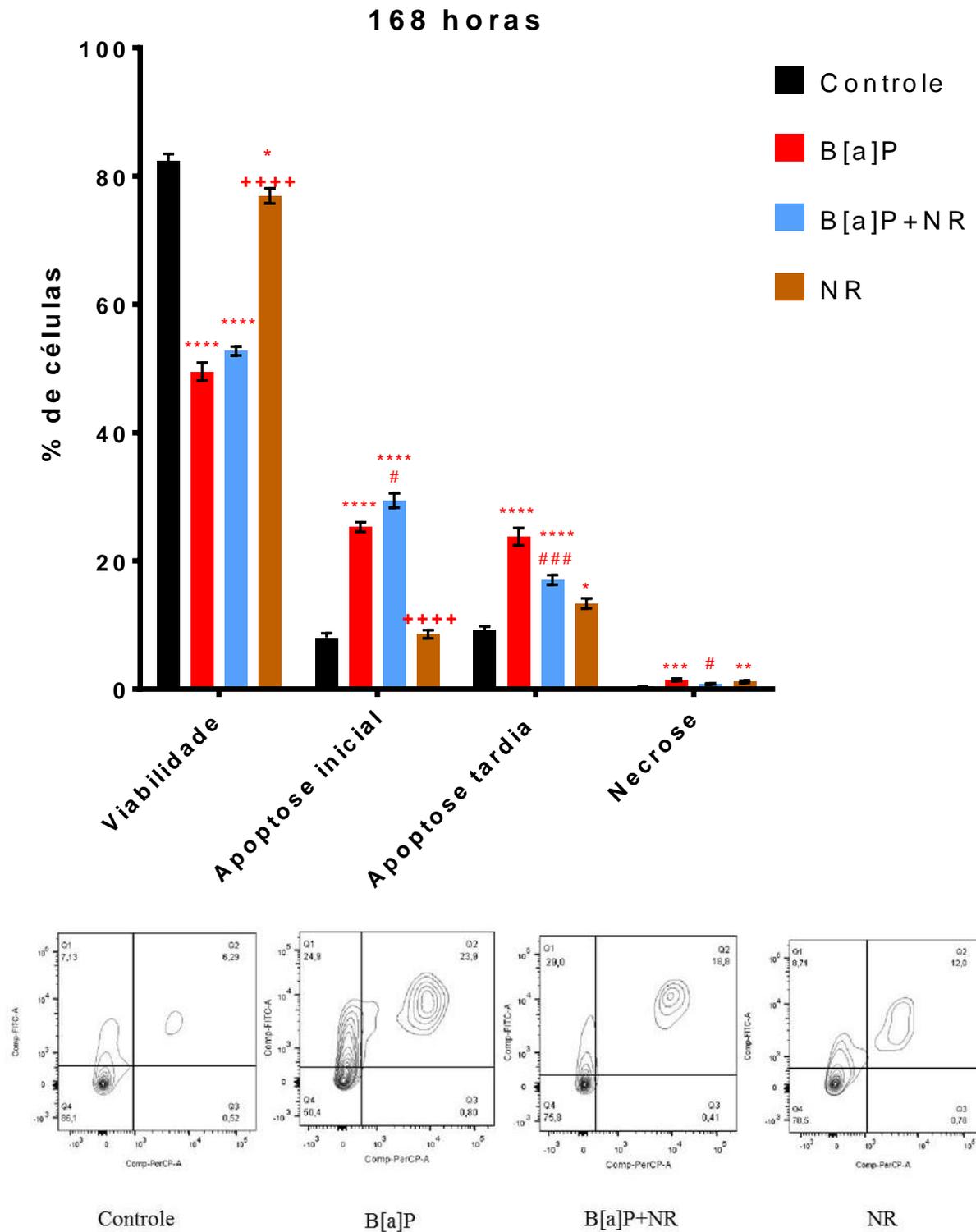


Figura 31. Viabilidade e tipos de morte avaliados por citometria de fluxo de células BEAS-2B células aderidas e em suspensão no meio de cultura, após incubações por 168 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos

expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e estrelas indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

A ligação da Anexina V à fosfatidilserina localizada na face citosólica da membrana plasmática pode se dar ao ocorrer a permeabilização da membrana no início da necrose (STURM et al., 2006). Assim, as células indicadas como em apoptose tardia (marcadas com iodeto de propídio e Anexina V) não podem ser diferenciadas de células em início de necrose por esse método. Entretanto, como a porcentagem de células em necrose não aumentou proporcionalmente ao aumento da porcentagem das células em apoptose tardia ao longo do tempo, pode-se inferir que as células sofrem predominantemente apoptose, sendo esta detectada nas fases inicial e tardia. Na **Figura 32** são apresentadas as razões entre apoptose inicial e tardia para os diferentes grupos nos três períodos de exposição, observando-se em 120 e 168 h maiores razões no grupo B[a]P+NR, em comparação com o grupo B[a]P. Assim, NR parece acelerar a entrada em apoptose das células expostas a B[a]P.

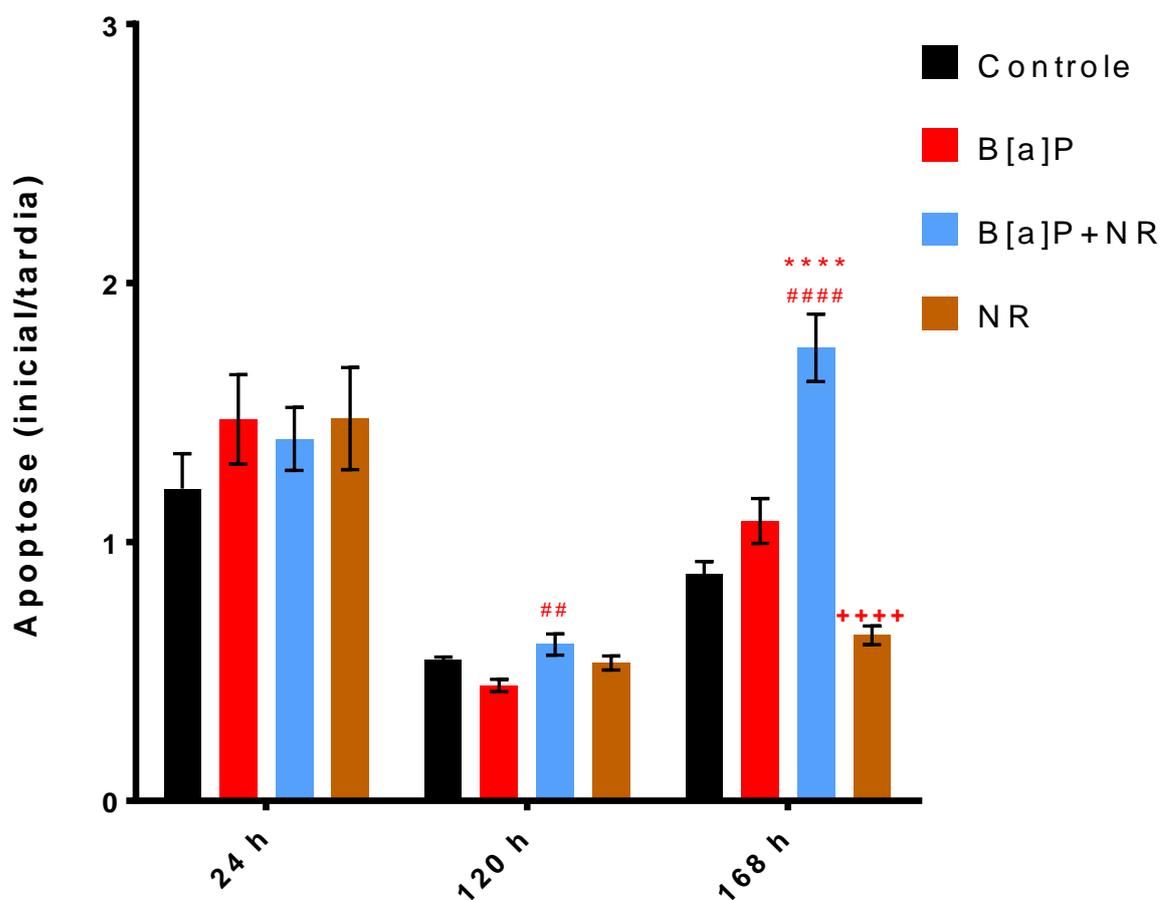


Figura 32. Razões entre apoptose inicial e apoptose tardia de células BEAS-2B incubadas por 24, 120 e 168 h com B[a]P (1 μ M), B[a]P (1 μ M) + NR (1 μ M), NR (1 μ M) e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

A partir desses resultados resolvemos repetir a análise dos tipos de morte por citometria (experimento 2, item 4.4.8 de Material e Métodos), mas utilizando-se somente as células que permaneceram aderidas à placa. Consideramos que a análise separada das células aderidas à placa ao final do período de incubação nos permitiria detectar os eventos em andamento naquele momento, possibilitando melhor comparação das taxas de ocorrência entre os diferentes grupos.

O tipo de morte de células aderidas à placa foi monitorado em 96, 120, 144 e 168 h de incubação com B[a]P na presença e ausência de NR. Essas análises, **Figura 33 a Figura 36**, mostram diminuição da viabilidade das células em todos os grupos expostos, sendo mais acentuada no grupo B[a]P+NR após 120 e 168 h. A diminuição da viabilidade foi acompanhada de aumento da porcentagem de células em apoptose, sendo também mais acentuado no grupo B[a]P+NR em 120 e 168 h. Não foi observado aumento de células em necrose.

Os dados confirmam que NR aumenta seletivamente a taxa de apoptose das células expostas a B[a]P.

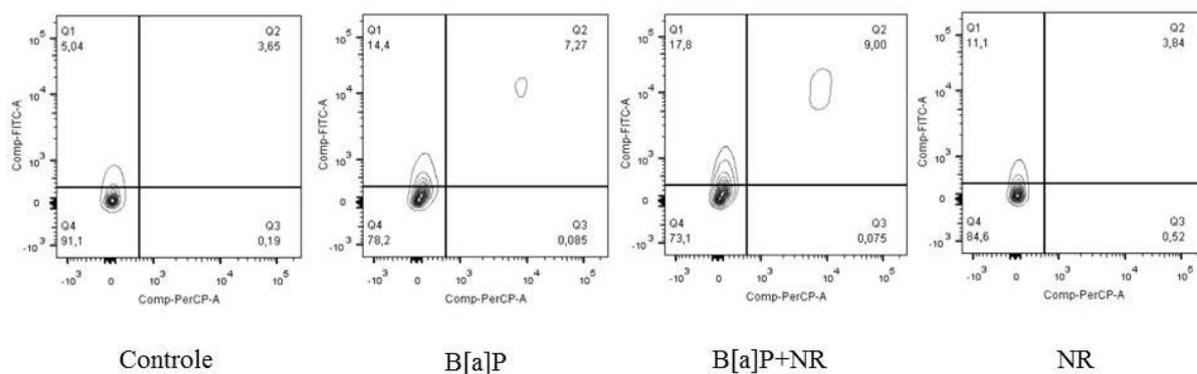
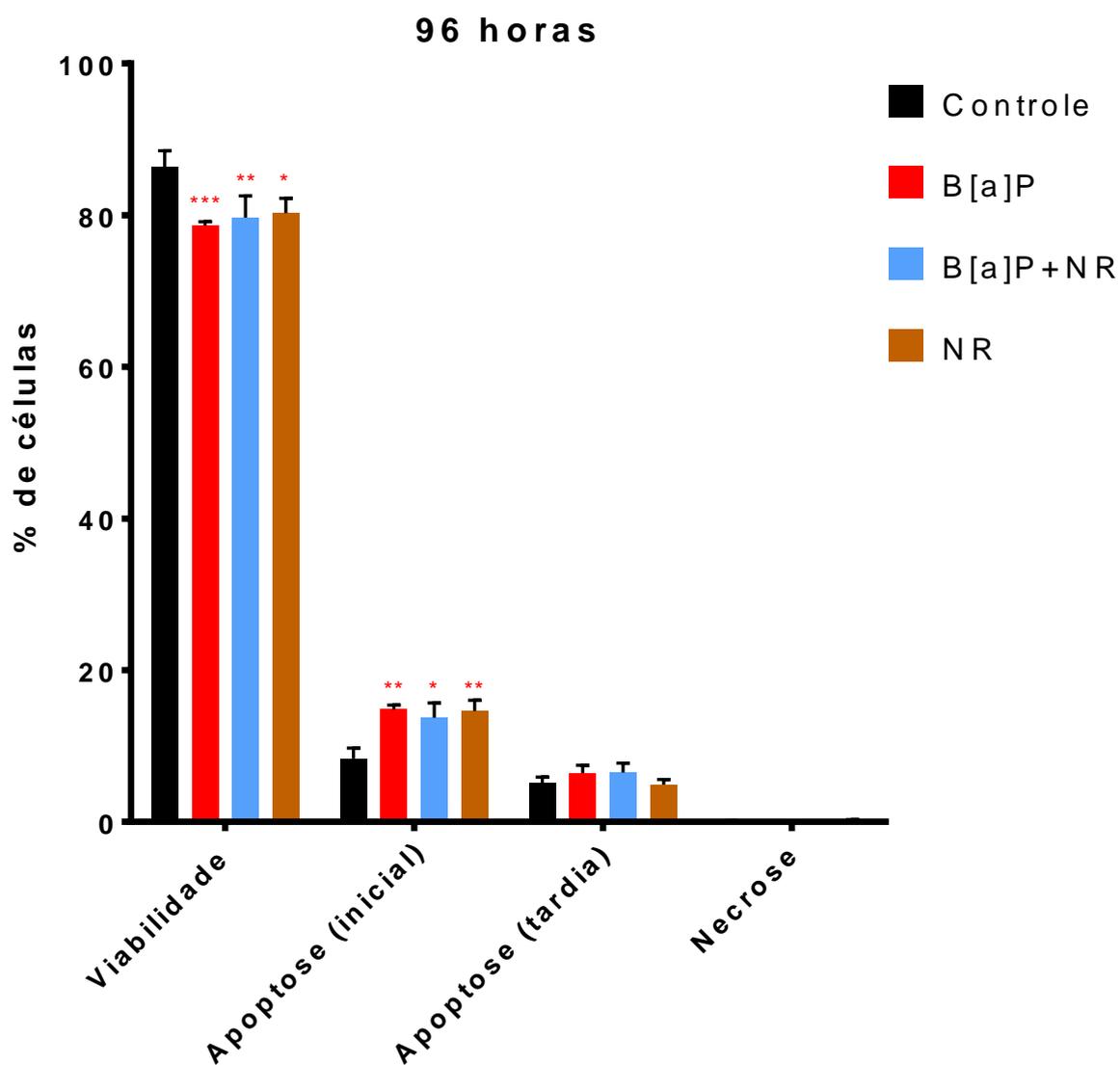


Figura 33. Viabilidade e tipos de morte avaliados por citometria de fluxo de células BEAS-2B que permaneceram aderidas a placa de cultura após incubações por 96 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de

Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****).

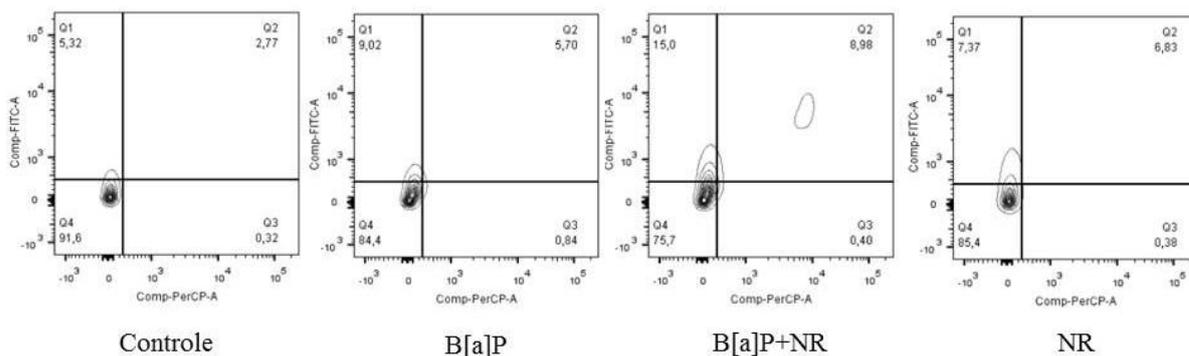
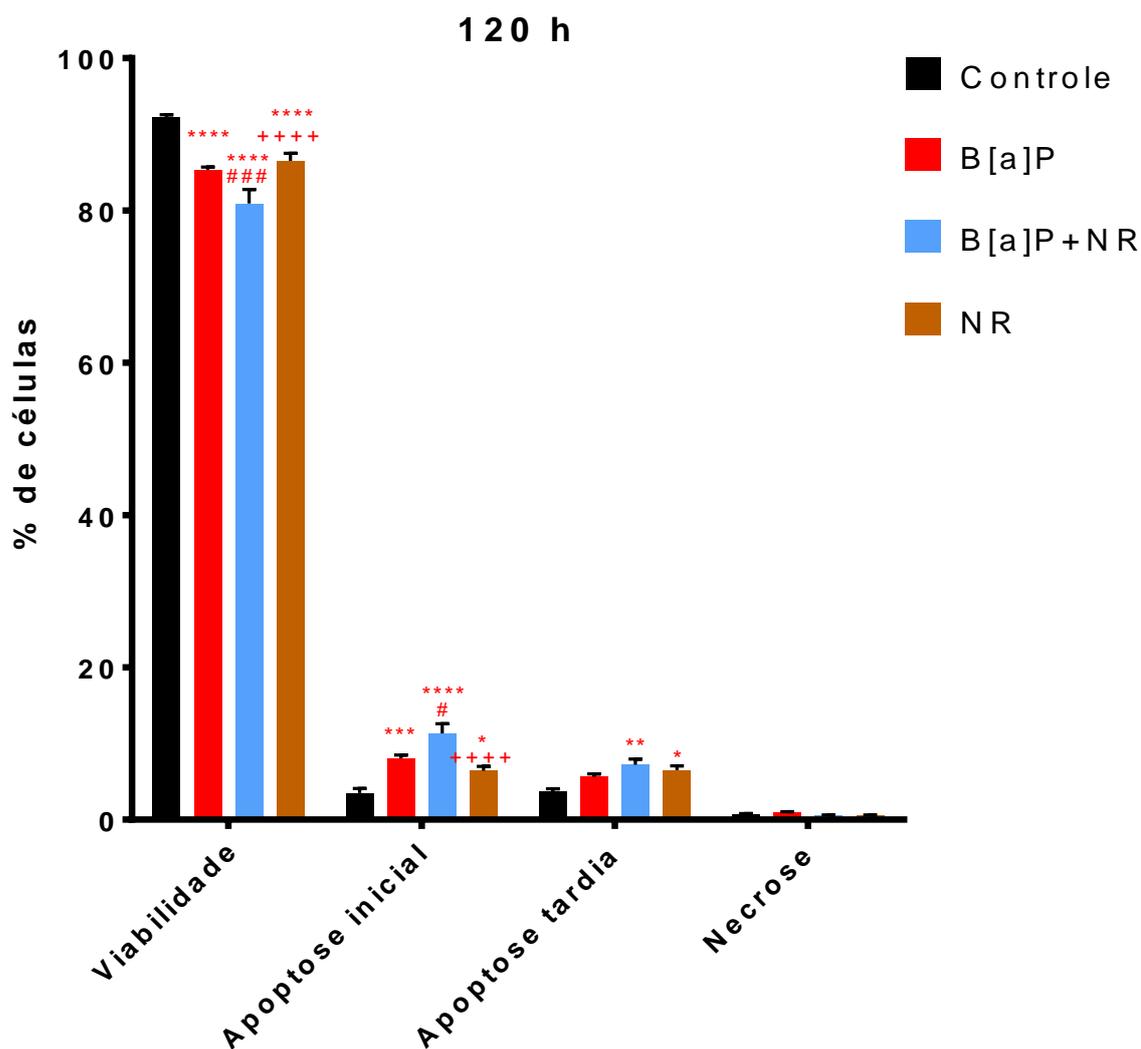


Figura 34. Viabilidade e tipos de morte avaliados por citometria de fluxo de células BEAS-2B que permaneceram aderidas a placa de cultura após incubações por 120 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p <$

0,05, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

.

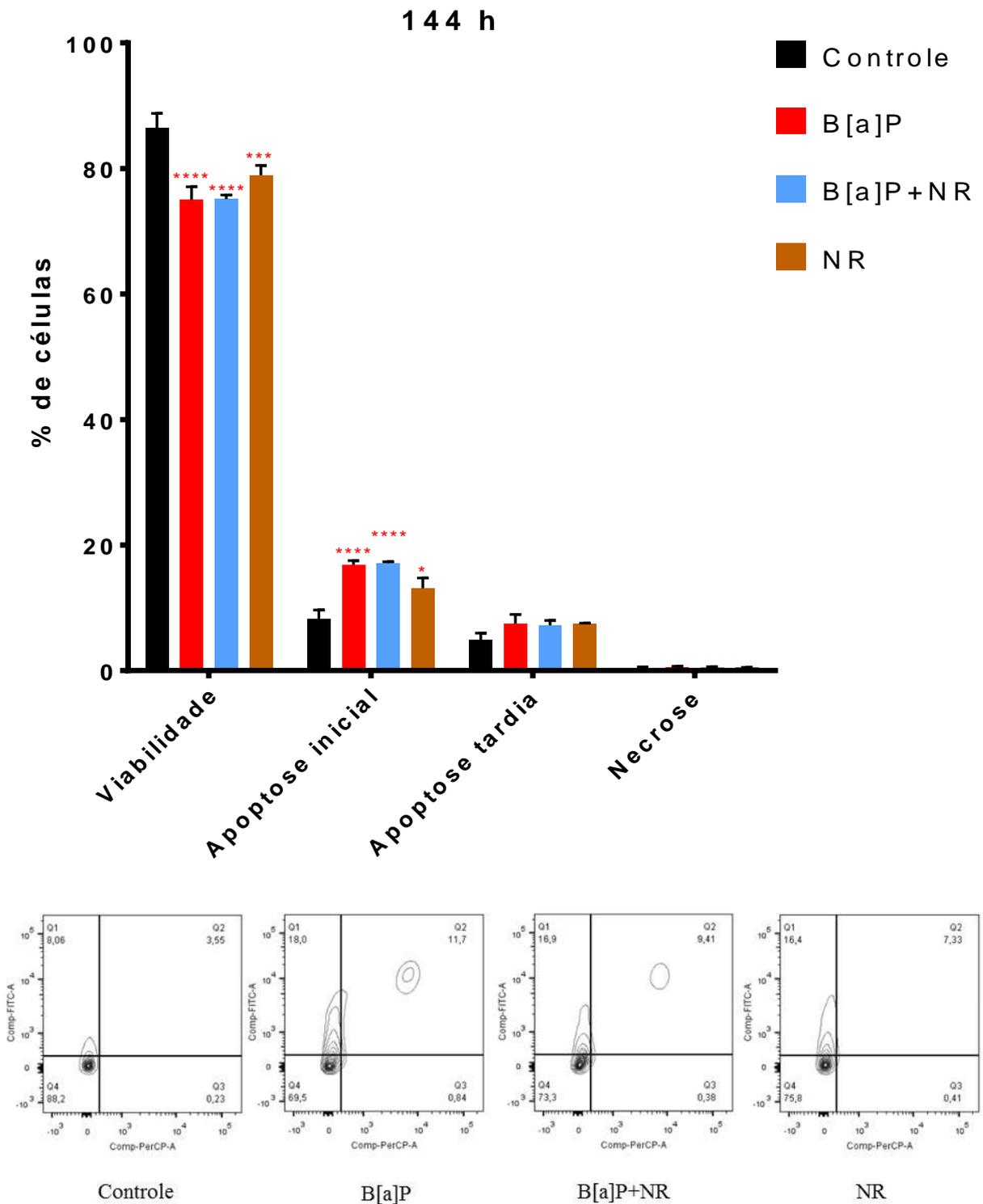


Figura 35. Viabilidade e tipos de morte avaliados por citometria de fluxo de células BEAS-2B que permaneceram aderidas a placa de cultura após incubações por 144 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações

múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****).

168 h

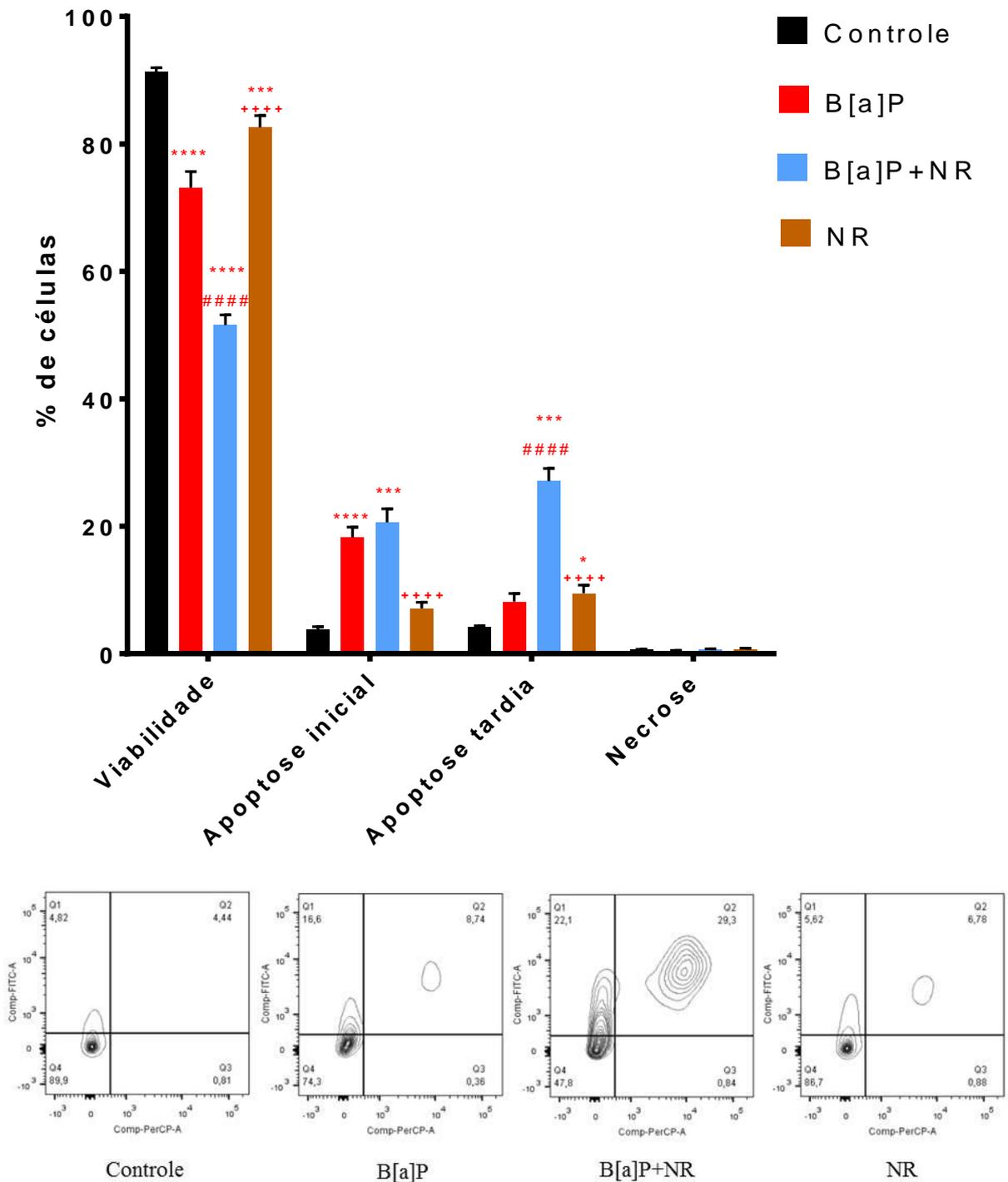


Figura 36. Viabilidade e tipos de morte avaliada por citometria de fluxo de células BEAS-2B que permaneceram aderidas a placa de cultura após incubações por 168 h com B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos

expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

Verificamos que NR não modula a parada das células nas diferentes fases do ciclo celular induzida por B[a]P. Entretanto, sensibiliza as células à morte por apoptose. Além disso, a apoptose pode ser vista como um mecanismo de evasão à instabilidade genômica causada pelos produtos de biotransformação do B[a]P (BORTOLI et al., 2018).

Na **Figura 37** são apresentados paralelamente os dados de parada no ciclo celular, porcentagem de células viáveis e porcentagem de células em apoptose após 96 h e 168 h de incubações e análises das células aderidas à placa. Em 168 h, as células expostas a B[a]P apresentaram parada em G2/M, paralelamente ao aumento da taxa de apoptose. Observa-se, no entanto, que a taxa de apoptose nas células incubadas com B[a]P+NR é maior que a observada no grupo B[a]P, muito embora não haja diferença entre os dois grupos quanto à parada de ciclo celular. Neste sentido, observa-se que NR induziu a morte das células paradas no ciclo.

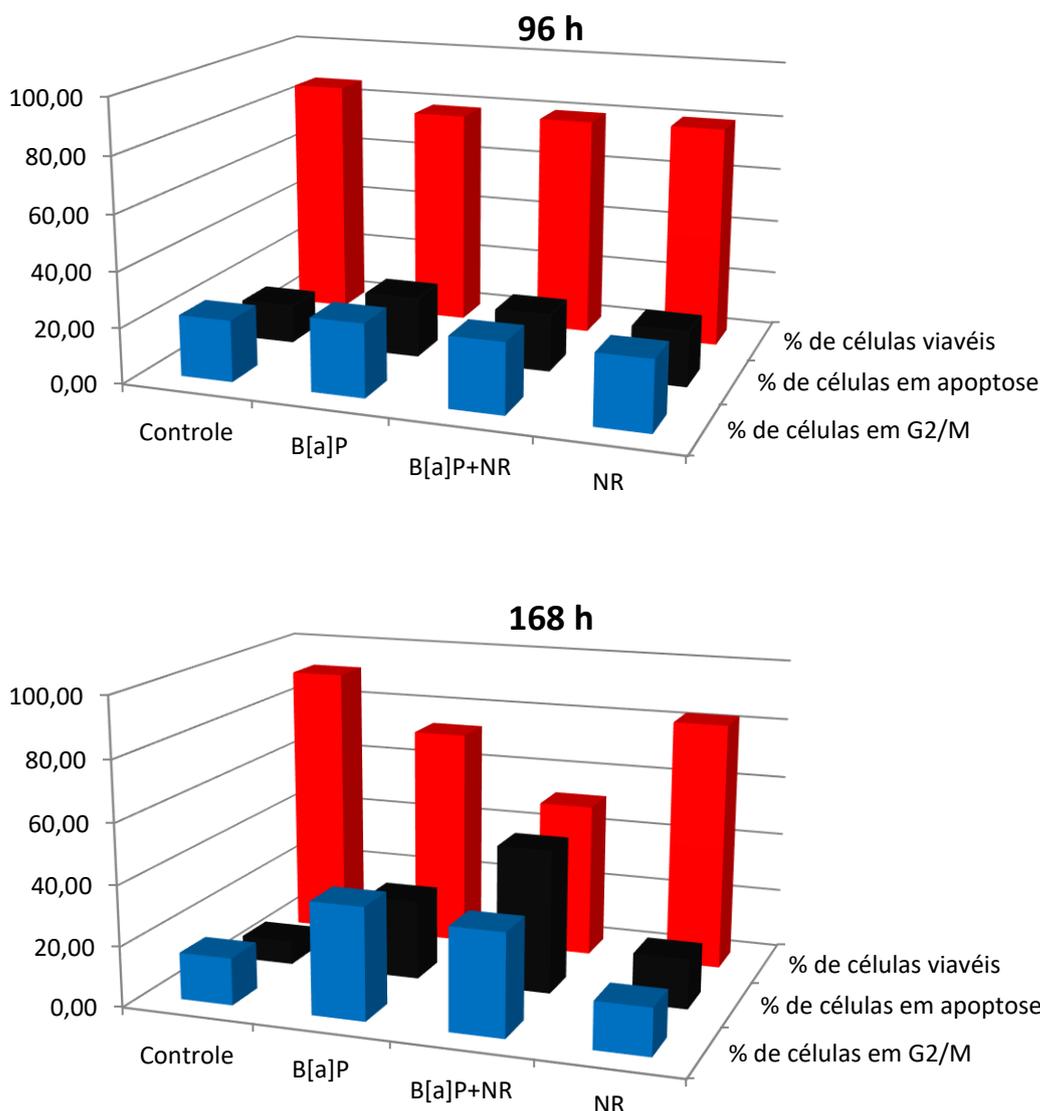


Figura 37. Análise comparativa da porcentagem de células viáveis, porcentagem de células em apoptose (somatória das células em apoptose inicial e tardia) e porcentagem de células em G2/M em 96 e 168 h. Na figura não são apresentadas as análises estatísticas entre os grupos, mas as mesmas são apresentadas nas análises individuais ao longo do tempo.

A apoptose, ou morte celular programada, é processo normal que mantém a homeostasia tecidual e também contribui para eliminação de células danificadas (WANNHOFF et al., 2013). Desregulação dos processos que regulam a apoptose frequentemente contribuem para o desenvolvimento de neoplasias (WU et al., 2016). Existem duas vias de ativação da apoptose: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca é iniciada por ativação de um receptor de morte, enquanto que a via intrínseca (VI) é modulada por estresse citotóxico, como danos ao

DNA e/ou estresse oxidativo. A mitocôndria e o citocromo c desempenham papel central no processo de apoptose na VI. O citocromo c leva à formação de apoptossoma, e consequente ativação da caspase 3 que degrada componentes celulares como por exemplo enzimas de reparo de DNA (WANNHOFF et al., 2013). A quebra de PARP por caspase 3 é um mecanismo de sinalização para ativação de apoptose (KO et al., 2004). A necrose por sua vez é caracterizada por falha bioenergética, inflamação, perda rápida da integridade da membrana, produção mitocondrial de ROS, captação de cálcio mediada por canais e também pela destruição enzimática de co-fatores necessários para a produção de ATP (LIN; YANG, 2008).

Estudos avaliando os mecanismos de morte celular pelo B[a]P são amplamente difundidos na literatura. Nesses estudos é demonstrado que B[a]P afeta vias de sinalização que regulam a apoptose. O tratamento de células HEPA1c1c7 com B[a]P aumentou a expressão transcricional de ArNT (do inglês, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) e CYP1A1 de modo dose e tempo dependente. Além disso, o tratamento aumentou a atividade de caspases da via intrínseca (caspases 3 e 9). Essas alterações foram acompanhadas de aumento da expressão de genes pró-apoptóticos como o BAX (do inglês, *Bcl-2 associated X*), liberação de citocromo c para o citosol, disfunções mitocondriais e ativação de p53 (KO et al., 2004).

Células de mucosa oral expostas por 5 a 360 min ao B[a]P (1 µmol/L) apresentaram aumento de caspase 3 ativada de modo tempo dependente. Um aumento transitório de 3-nitrotirosina (3-NT) foi observado no início das incubações, mas as concentrações se normalizaram em períodos maiores de exposição. Além disso, foi detectado aumento das concentrações de 8-epi-prostaglandina-F2 (8-epi-PGF2) em todo o período de incubação. Esses dados reforçam que B[a]P modula marcadores de apoptose e de estresse oxidativo e nitrosativo (WANNHOFF et al., 2013).

Células de câncer de pulmão humano H460 expostas por 24 h ao BPDE (0,4; 0,6 e 0,8 µM) apresentaram aumento da apoptose de modo dose dependente. A morte foi caracterizada pelo aumento de PARP-clivada e fragmentação do DNA. BPDE também induziu apoptose em células H460, paralelamente ao aumento da expressão da proteína pró-apoptótica BAK (do inglês, *Bcl-2 antagonist/killer 1*), além da regulação negativa de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (Bcl-2 e Bcl-xL), liberação de citocromo c para o citosol, aumento de caspase clivada (caspases 3, 8 e 9), mas sem alteração na morfologia e no potencial de membrana mitocondrial. A apoptose causada por BPDE foi atenuada pela presença de inibidores específicos de caspase 9 e caspase 8 (XIAO et al., 2007).

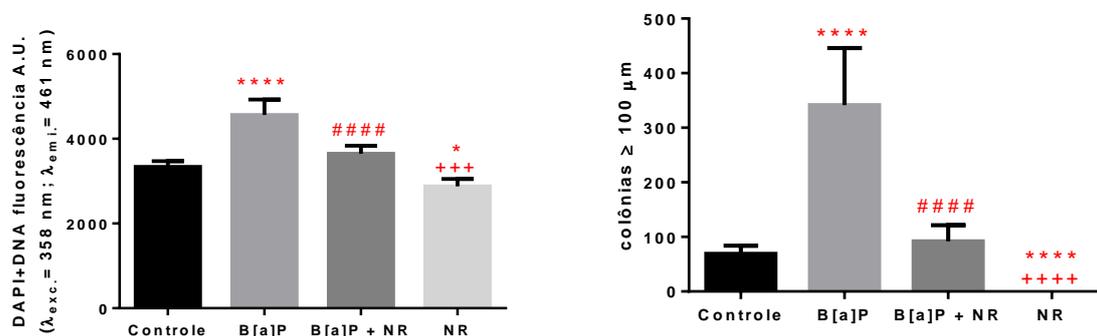
As concentrações de proteínas de células Jurkat expostas a B[a]P (40 µM, por 24 h) foram verificadas por uma análise proteômica. Foram demonstrados efeitos citotóxicos dose dependente para concentrações entre 5 µM e 40 µM por 48 h. Esses efeitos citotóxicos foram acompanhados de danos ao DNA, avaliados por meio da análise de fragmentação do DNA pelo ensaio cometa. Na análise proteômica foi observado um total de 46 proteínas alteradas, sendo que 33 foram reguladas negativamente e as outras 13 sofreram regulação positiva em relação ao controle. Na análise direcionada, utilizando espectrometria de massas (MALDI-QTOF-MS), foi observado que um grupo de proteínas relacionadas à apoptose sofreu regulação positiva, e outro grupo foi regulado negativamente, sendo que essas proteínas estavam envolvidas com metabolismo energético, síntese de DNA, motilidade e estrutura celular (OH *et al.*, 2004).

5.7. Análise da formação de colônias em meio semissólido *soft-agar*

O ensaio de formação de colônias em meio semissólido *soft-agar* é um método bem estabelecido para verificar o crescimento celular independente de ancoragem em modelos experimentais *in vitro*. Esse tipo de crescimento é uma característica do processo neoplásico (BOROWICZ *et al.*, 2014). Para avaliar a transformação para o fenótipo tumoral, as células BEAS-2B foram expostas por 168 h a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle, e posteriormente foi realizado o ensaio em *soft-agar* como descrito no item 4.4.10 de Material e Métodos.

Foi observado um aumento significativo de colônias no *soft-agar* (**Figura 38** e **Figura 39**) após exposição ao B[a]P, quando comparado ao grupo controle ($p < 0.05$ na análise de fluorescência das células e $p < 0,0001$ na contagem das colônias com diâmetro superior a 100 µm). Esse resultado condiz com o efeito tumorigênico do B[a]P.

Experimento 1



Experimento 2

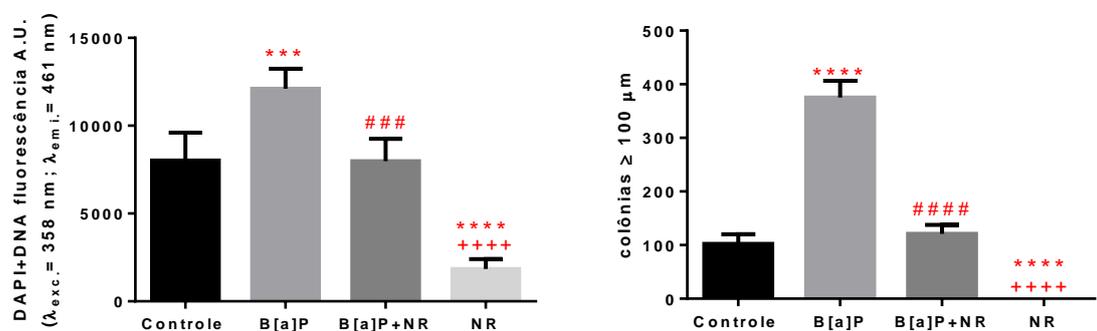


Figura 38. Análise da formação de colônias em meio semissólido *soft-agar* após 168 h de exposição das células BEAS-2B a B[a]P, B[a]P + NR e NR, e do grupo controle. Os resultados representam a média ± erro padrão de uma quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

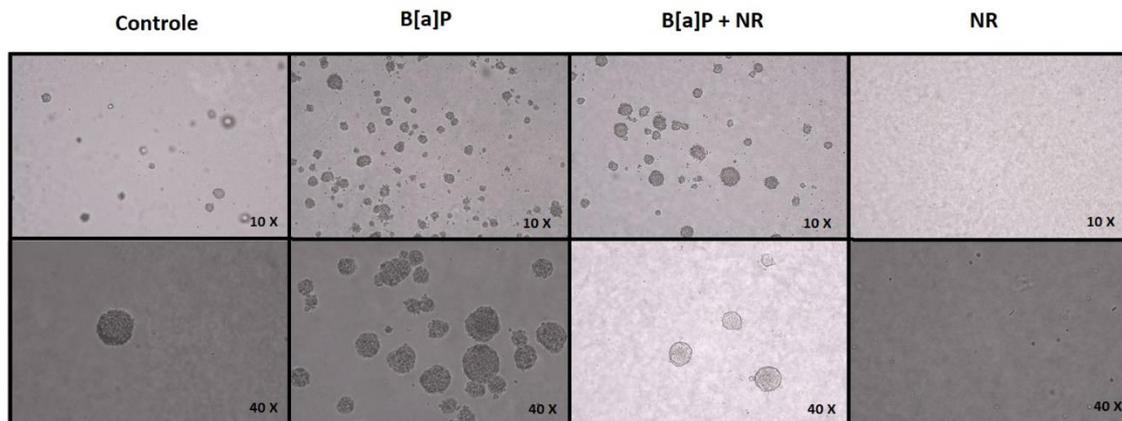


Figura 39. Imagem microscópica de colônias das células BEAS-2B em *soft-agar* após 168 h de exposição ao B[a]P, B[a]P + NR, NR e grupo controle. As células foram cultivadas por 15 dias em meio semissólido *soft-agar* como descrito em Material e Métodos.

O ensaio em meio semissólido *soft-agar* foi utilizado para avaliar a transformação celular induzida pelo B[a]P em vários outros estudos. Células de epitélio brônquico (HBETR) expostas a 1 e 20 μM de B[a]P apresentaram crescimento em meio semissólido após 48 h de exposição (PANG *et al.*, 2009). Também foi observado aumento da taxa de transformação celular após incubação de células BEAS-2B durante 7 semanas com 0,1 μM de B[a]P (PUPPALA; GAIROLA; SWANSON, 2007). Em outro modelo *in vitro*, também utilizando a linhagem de células BEAS-2B, foi observado aumento da formação de colônias em *soft-agar* após exposição das células ao BPDE por 72 horas (XIULING *et al.*, 2012). O crescimento em meio semissólido também foi observado para células BEAS-2B expostas por 12 semanas a 0,5 μM de BPDE. No mesmo estudo foi avaliado o efeito tumorigênico em um modelo de xenotransplante. O crescimento do tumor nos animais foi monitorado durante 6 semanas e foi observado que a exposição repetida a BPDE aumentou a tumorigenicidade das células BEAS-2B *in vivo*. Esses resultados confirmam que o crescimento independente de ancoragem reflete a tumorigênese (DING *et al.*, 2009).

Células de tumor gástrico (SGC-7001 e MNK-45) expostas por 16 h ao B[a]P (0,1; 0,5 e 1 μM) apresentaram aumento da capacidade proliferativa, invasiva e migrativa. Paralelamente, foram observados aumentos das expressões gênicas e proteicas de metaloproteinase-9 (MTP-9) e c-MYC, além da ativação de AhR e da via ERK (do inglês, *extracellular signal-regulated kinases*). Esses dados sugerem que B[a]P promove proliferação e metástase de células de câncer gástrico por meio da regulação positiva de MTP-9 e do aumento da expressão de c-MYC, alterações associadas à ativação de AhR e da via sinalização

de ERK (WEI et al., 2016). Foi verificado que B[a]P também modula a ativação de ERK em câncer de cólon e mama (WEI et al., 2016).

Observa-se nas **Figuras 38 e 39** um efeito protetor da NR contra a indução de formação de colônias em *soft-agar* pelo B[a]P. As células que foram incubadas somente com NR apresentaram ainda uma redução do crescimento em *soft-agar* em comparação com o grupo controle. As células BEAS-2B apresentam, como uma característica, formação espontânea de colônias no *soft-agar*, mas essas colônias não formam tumores em modelo de xenotransplante (REDDEL et al., 1989). Os dados obtidos no ensaio do crescimento celular em *soft-agar* reforçam a importância de se entender como NR protege as células contra a transformação induzida por B[a]P. Uma das hipóteses é que o aumento das concentrações intracelulares de NAD⁺ pode modular o padrão de metilação do DNA ou estimular a atividade de enzimas envolvidas em processos de reparo do DNA. Neste sentido, buscamos avaliar o perfil de metilação do DNA, os níveis de metabólitos intracelulares e a atividade de PARP1 e SIRT1, enzimas NAD⁺ dependentes e que estão envolvidas em diferentes processos celulares, incluindo o reparo de lesões no DNA, morte e controle do ciclo celular (STEIN; IMAI, 2012).

Diante dos dados de viabilidade das células após 168 h de exposição a B[a]P (73,2%), B[a]P+NR (51,6%), NR (82,6%) e controle (91,4%), calculamos a taxa de formação de colônias no *soft-agar* para os diferentes grupos, considerando a porcentagem de células viáveis após 168 h. Os dados obtidos são apresentados na **Figura 40A** e evidenciam menor formação de colônias no grupo B[a]P+NR em comparação com o grupo B[a]P, embora não retornem para o nível do controle.

Para confirmação dos dados de formação de colônias no *soft agar*, o experimento foi repetido com a adição de uma etapa entre o final da exposição (168 h) e o plaqueamento no *soft agar*. As células removidas da exposição foram transferidas para nova placa de cultura e mantidas por 48 h sem exposição, para que houvesse a adesão das células vivas à placa e estabilização da cultura. Ao final desse período as células foram lavadas com PBS para remoção das células mortas, em seguida, somente as células vivas (aderidas à placa) foram transferidas para o *soft agar*. O resultado (**Figura 40B**) reproduziu o obtido anteriormente ao considerarmos a porcentagem de células viáveis no cálculo da taxa de formação de colônias (**Figura 40A**).

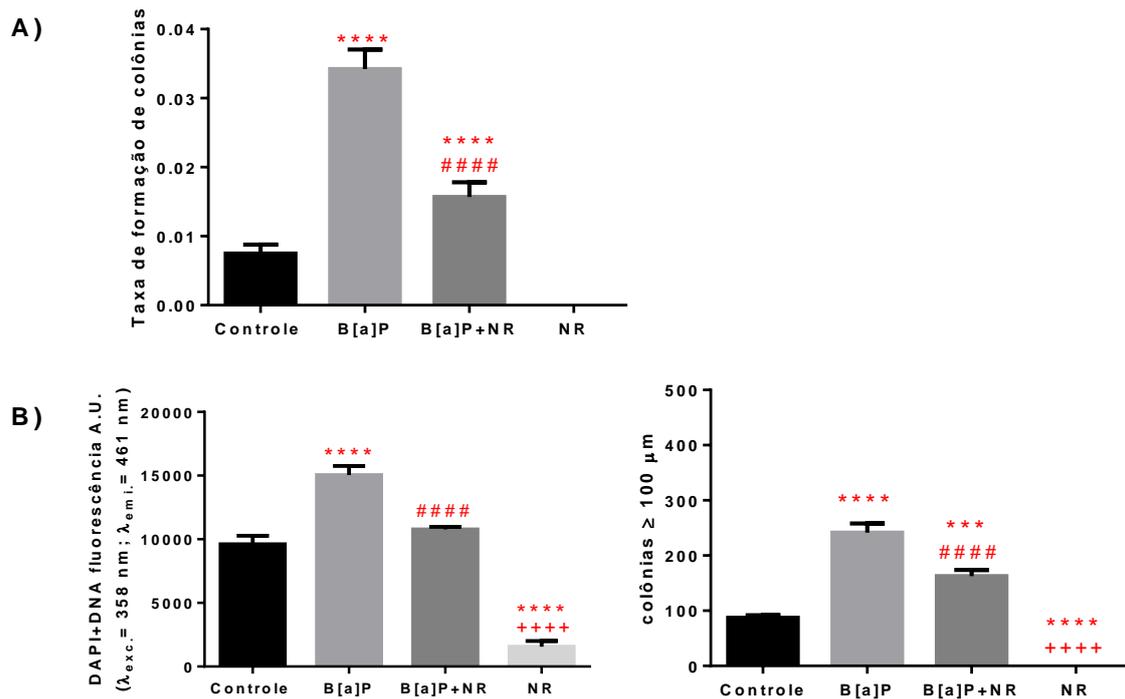
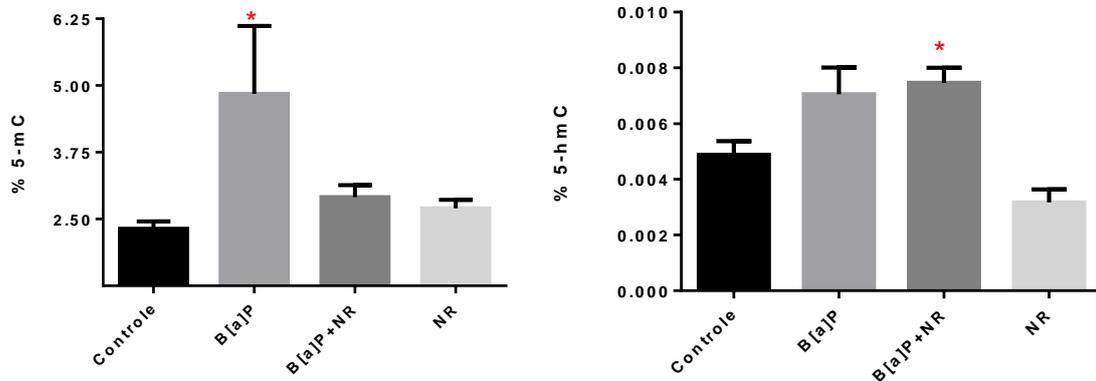


Figura 40. A. Taxa de formação de colônias em meio semissólido *soft-agar* após 168 h de exposição das células BEAS-2B ao B[a]P, B[a]P+NR, NR, e do grupo controle. A taxa foi calculada a partir do número de colônias formadas em cada grupo dividido pelo número de células viáveis no momento do plaqueamento (quintuplicata por grupo, experimento 2, **Figura 38**). **B.** Colônias formadas no *soft-agar* a partir do plaqueamento das células aderidas que ficaram livres das exposições por 48 h antes do plaqueamento (triplicata por grupo). Foi feita a marcação com DAPI e contagem das colônias. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

5.8. Quantificação de 5-mC e 5-hmC no DNA de células BEAS-2B após 168 h das exposições

Observou-se que a exposição a B[a]P por 168 h induziu aumento da concentração de 5-mC no DNA. Já as células incubadas concomitantemente com B[a]P+NR foram protegidas contra a hipermetilação induzida por B[a]P. Por outro lado, as concentrações de 5-hmC permaneceram elevadas nos grupos B[a]P e B[a]P+NR em comparação com os grupos controle e NR (**Figura 41**).

Experimento 1



Experimento 2

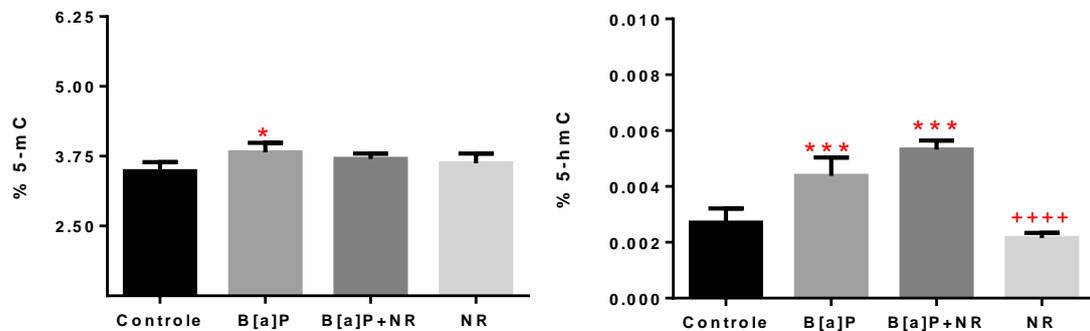


Figura 41. Quantificação de 5-mC e 5-hmC no DNA das células BEAS-2B após 168 h de exposição a B[a]P, B[a]P + NR e NR, e do grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão médio de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

Diferentes estudos têm revelado que B[a]P induz alterações epigenéticas em diferentes linhagens de células. Alterações no perfil de metilação do DNA, com sítios hiper e hipometilados em relação ao controle, foram observadas em células BEAS-2B expostas a B[a]P (0,1 nM e 1 nM por 8, 24 e 48 dias, com renovação do meio de cultura a cada 2 dias) (Jiang et al., 2017). As concentrações globais de 5-mC e 5-hmC foram determinadas utilizando kits de ELISA, tendo sido observada queda das quantidades de 5-mC e aumento de 5-hmC nas células

expostas, juntamente com diminuição da expressão do gene da DNA metiltransferase 3B (DNMT3B) e aumento da expressão do gene da TET1. Parte dos sítios diferencialmente metilados foi restaurada para o estado normal de metilação quando as células foram expostas a vitamina C ou B6 concomitantemente à exposição ao B[a]P (JIANG et al., 2017).

Linhagens de células de câncer de mama expostas a B[a]P (0,05 μ M, 0,5 μ M e 5 μ M, por 48 h, 72 h e 96 h, sem renovação do meio de cultura) não apresentaram alteração da concentração global de 5-mC, determinada por um método indireto de incorporação enzimática de grupo metila radioativo em amostras de DNA. Entretanto, o perfil de metilação verificado pelo método de amplificação de sítios intermetilados revelou sítios hipo e hipermetilados nas células expostas (SADIKOVIC; RODENHISER, 2006). Alterações do perfil de acetilação de histonas também foram observadas na linhagem de carcinoma mamário MCF-7 exposta a B[a]P (0,5 μ M, 4 dias) (SADIKOVIC et al., 2008).

Um estudo foi conduzido com o intuito de compreender alterações moleculares chave durante a transformação de células epiteliais pulmonares expostas a baixas concentrações dos carcinógenos metil-nitrosouréia e BPDE. Nesse estudo, concentrações aumentadas de DNA metiltransferase 1 (DNMT1) foram observadas nas células expostas aos carcinógenos, com hipermetilação de regiões promotoras de 5 a 10 genes em cada linhagem transformada, dentre os quais membros da família das caderinas (E-caderina e H-caderina), também encontrados hipermetilados em tumores pulmonares humanos. A transformação celular e o silenciamento dos genes foram revertidos pela diminuição da expressão de DNMT1 (DAMIANI et al., 2008). Em outro estudo foi verificado que células epiteliais bronquiais humanas (BEAS-2B) expostas a baixas concentrações de condensado de fumaça de cigarro por 1 mês apresentaram silenciamento epigenético de 130 genes, incluindo E-caderina, tendo sido observada transição epitélio-mesenquimal (VELJKOVIC et al., 2011)

5.9. Análise da taxa de consumo de glicose

Considerando que as alterações da atividade da cadeia respiratória mitocondrial podem ser acompanhadas por alterações do consumo de glicose pelas células, avaliou-se a taxa de consumo de glicose após 24 h, 96 h e 168 h de exposição ao B[a]P, B[a]P+NR NR e controle. Observa-se um paralelo entre os dados apresentados na **Figura 42** (taxa de consumo de glicose)

e na **Figura 21** (atividade mitocondrial) para os períodos de 24, 96 e 168 h, confirmando que tanto B[a]P quanto B[a]P+NR induzem alterações metabólicas nas células, com aumento do consumo de glicose, em períodos entre 96 e 168 h de incubação.

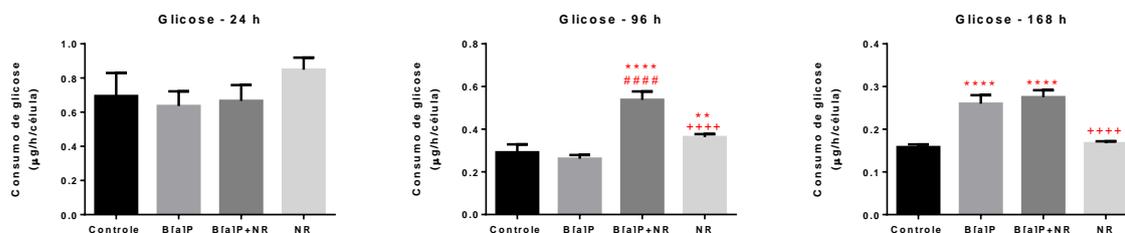


Figura 42. Análise da taxa de consumo de glicose de células BEAS-2B após 24, 96 e 168 horas de incubação com B[a]P, B[a]P + NR, NR e do grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, #####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

Estudos em modelos de tumorigênese demonstram que células tumorais apresentam alterações em vias de sinalização oncogênicas, representadas principalmente pelas vias PI3K/AKT/Mtor, HIF e MYC, que possuem em comum a propriedade de ativar a via glicolítica e/ou inibir o ciclo de Krebs (CHIA et al., 2011; CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011). B[a]P também induziu efeito Warburg em células epiteliais de fígado de rato via ativação de AhR e as alterações fenotípicas, migratórias e na sobrevivência celular foram associadas a reprogramação metabólica induzida pelo carcinógeno (HARDONNIÈRE et al., 2016). Os dados que obtivemos no modelo de exposição das células BEAS-2B a B[a]P também apontam nesse sentido e reforçam a necessidade de compreender os efeitos de B[a]P na transformação celular e na modulação do metabolismo energético.

5.10. Análises dos metabólitos intracelulares

Os metabólitos intracelulares foram quantificados em dois experimentos (item 4.4.12 de Material e Métodos), e os resultados estão apresentados separadamente. No primeiro experimento foram quantificados AMP, ADP, ATP, lactato, fumarato, succinato, malato, glutamina, glutamato, NAD^+ e NADP^+ das células coletadas em 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de exposição. NADH , α -cetoglutarato e piruvato não foram detectados pelo método cromatográficos. Uma visão geral é apresentada na **Figura 43** e os gráficos com as análises estatísticas são apresentados nas **Figuras 44 a 57**.

As análises revelaram a indução de estresse energético (redução das razões ATP/AMP e ATP/ADP) nas células incubadas com NR ou com B[a]P, que foi exacerbado na exposição a B[a]P+NR até 96 h de incubação. Após esse período, somente as células expostas NR se recuperaram do estresse energético (**Figuras 47 e 48**). Lactato, succinato, fumarato, malato e glutamina (**Figuras 49 a 53**) foram detectados em concentrações aumentadas no grupo exposto a B[a]P+NR em relação aos demais grupos em períodos superiores a 48 h de incubação. A razão glutamina/glutamato aumentou nas células expostas a B[a]P e B[a]P+NR, sendo observado maior aumento nas células expostas a B[a]P+NR a partir de 72 h (**Figura 55**). NAD^+ foi detectado em concentração aumentada nos grupos expostos a B[a]P, B[a]P+NR e NR por 168 h (**Figura 56**). Já a concentração de NADP^+ aumentou principalmente no grupo exposto a B[a]P+NR por 120 a 168 h (**Figura 57**).

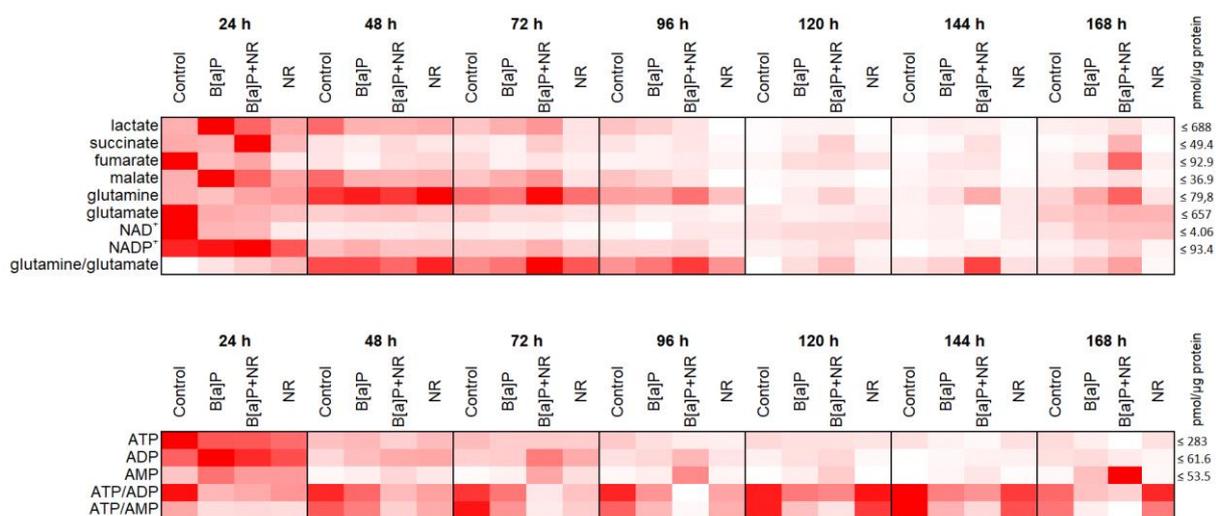
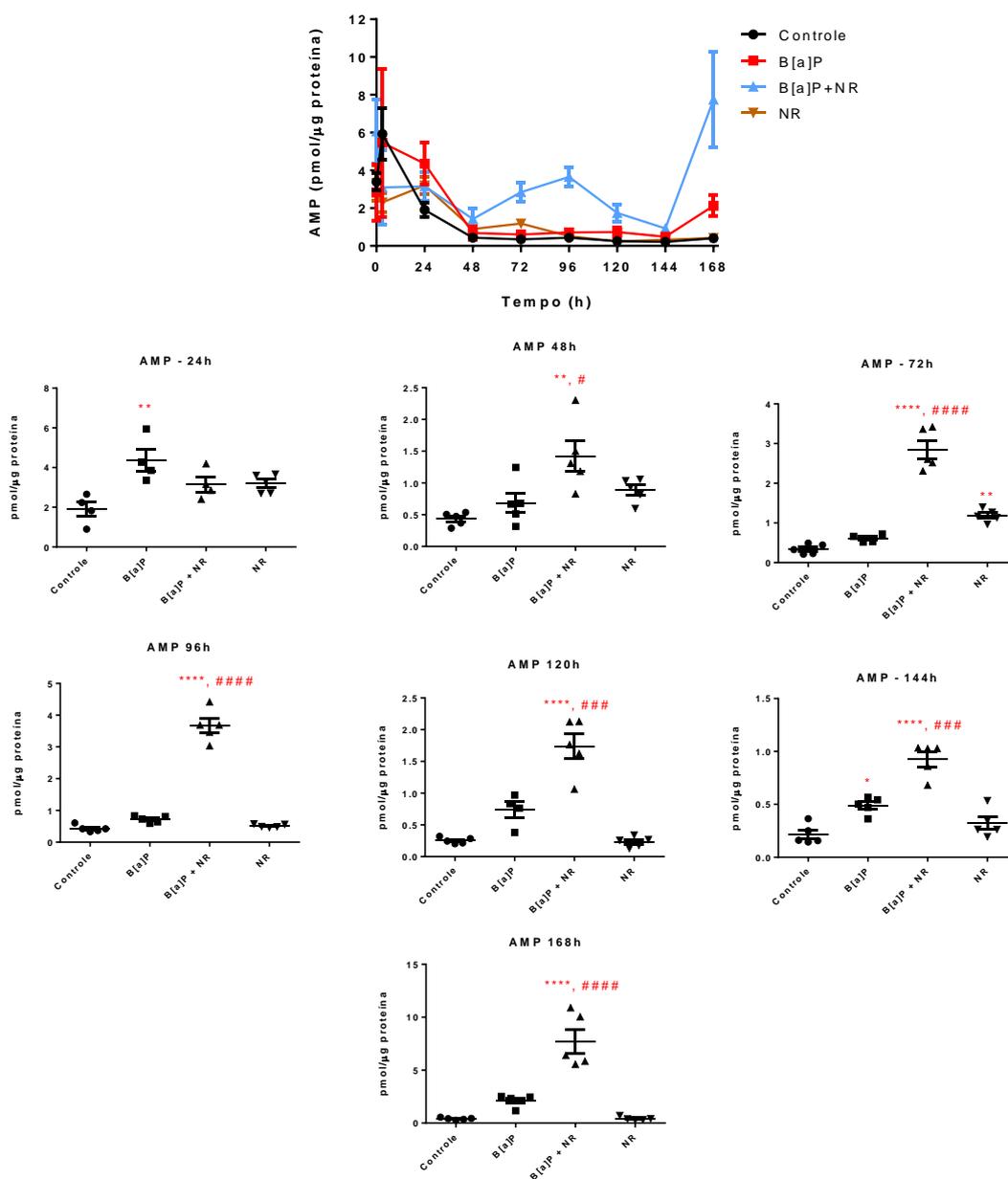


Figura 43. Visão geral das concentrações das moléculas quantificadas nas células BEAS-2B expostas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. São apresentadas as médias ao longo do tempo. As maiores concentrações em cada linha são apresentadas na cor vermelha intensa



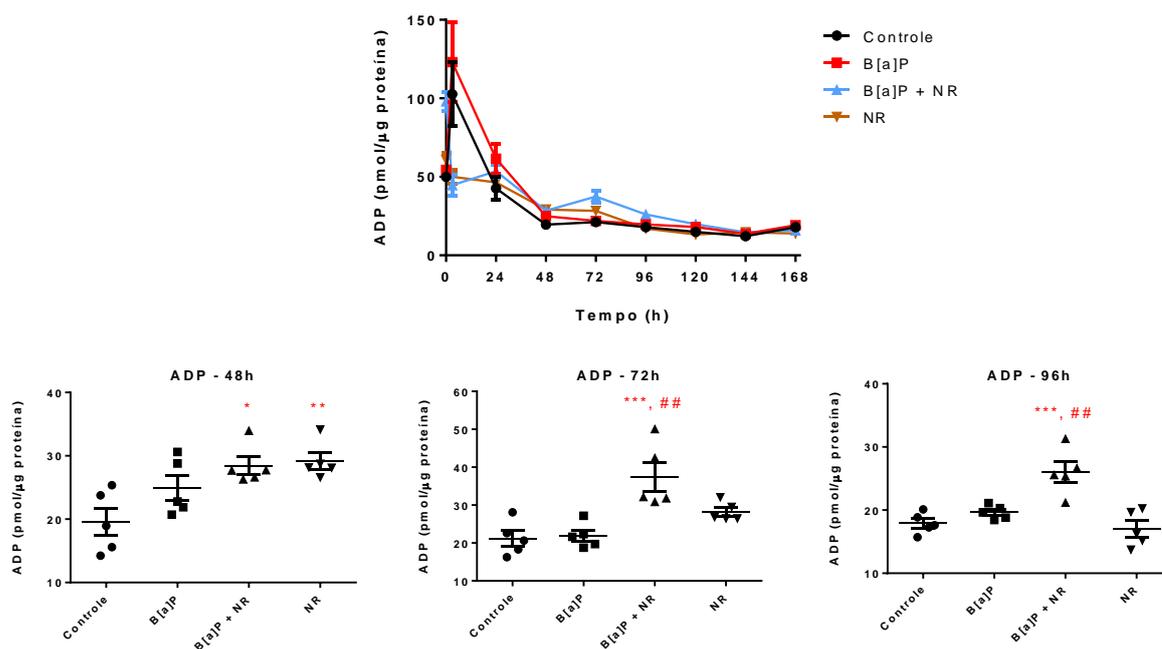


Figura 45. Concentração de ADP em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).

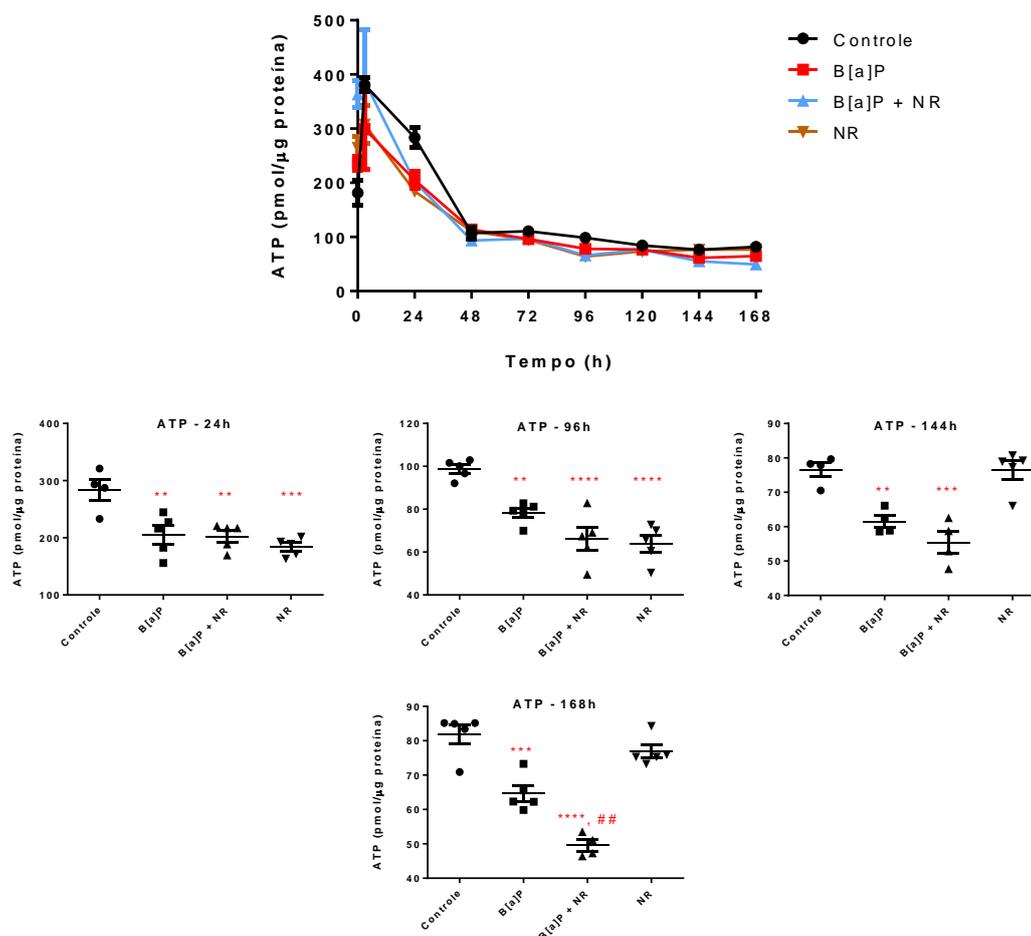


Figura 46. Concentração de ATP em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, #####).

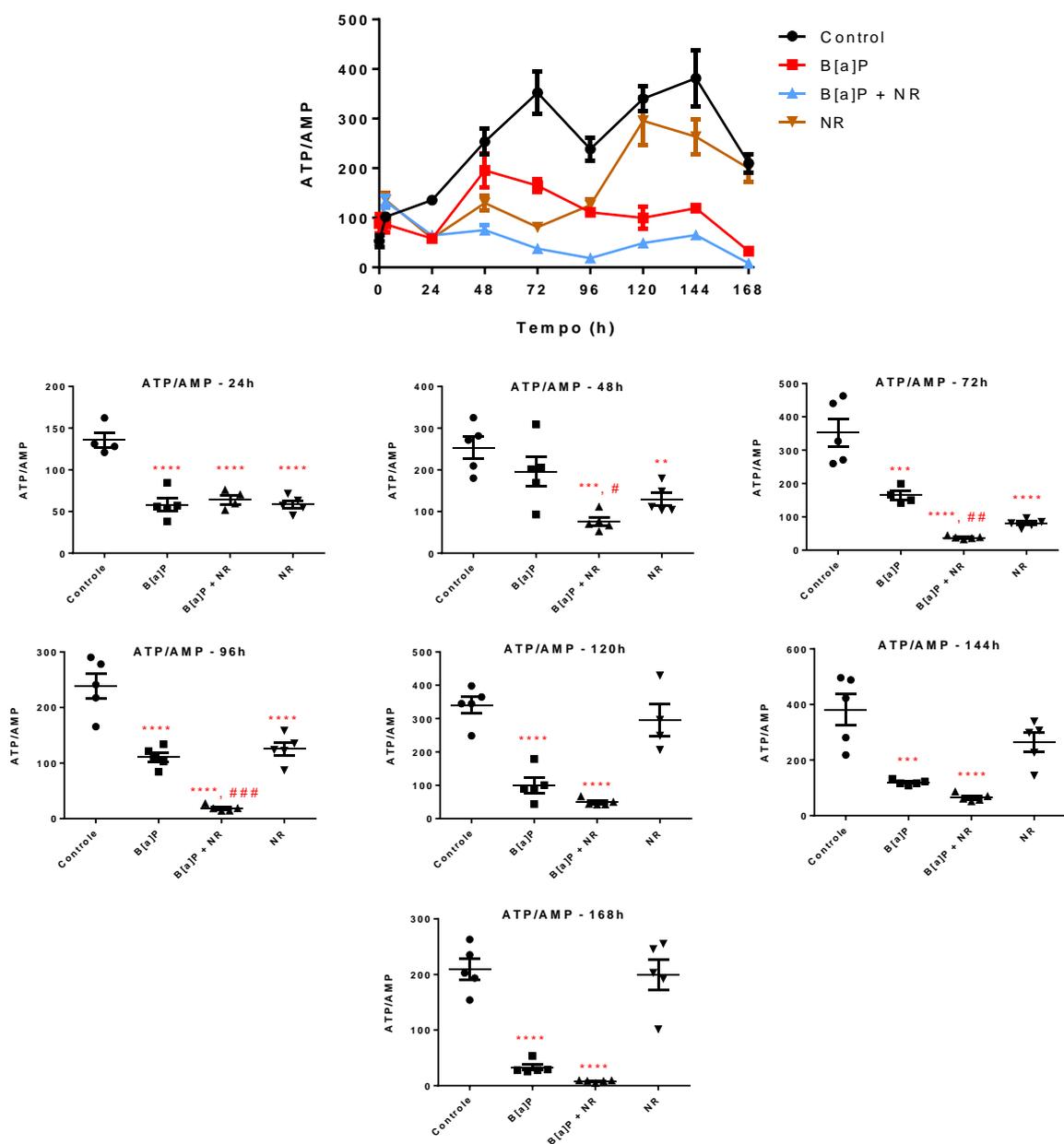


Figura 47. Razão ATP/AMP em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).

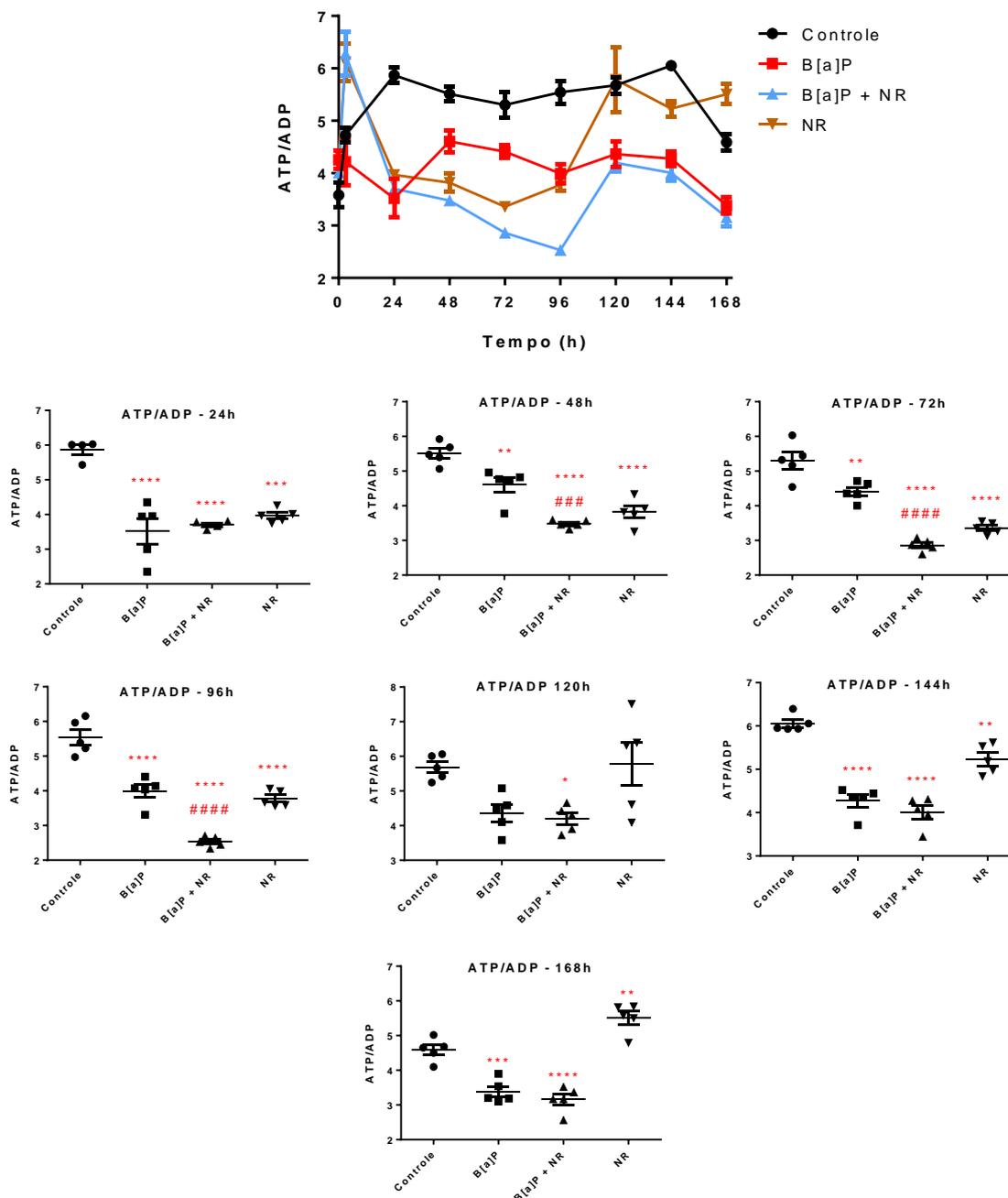
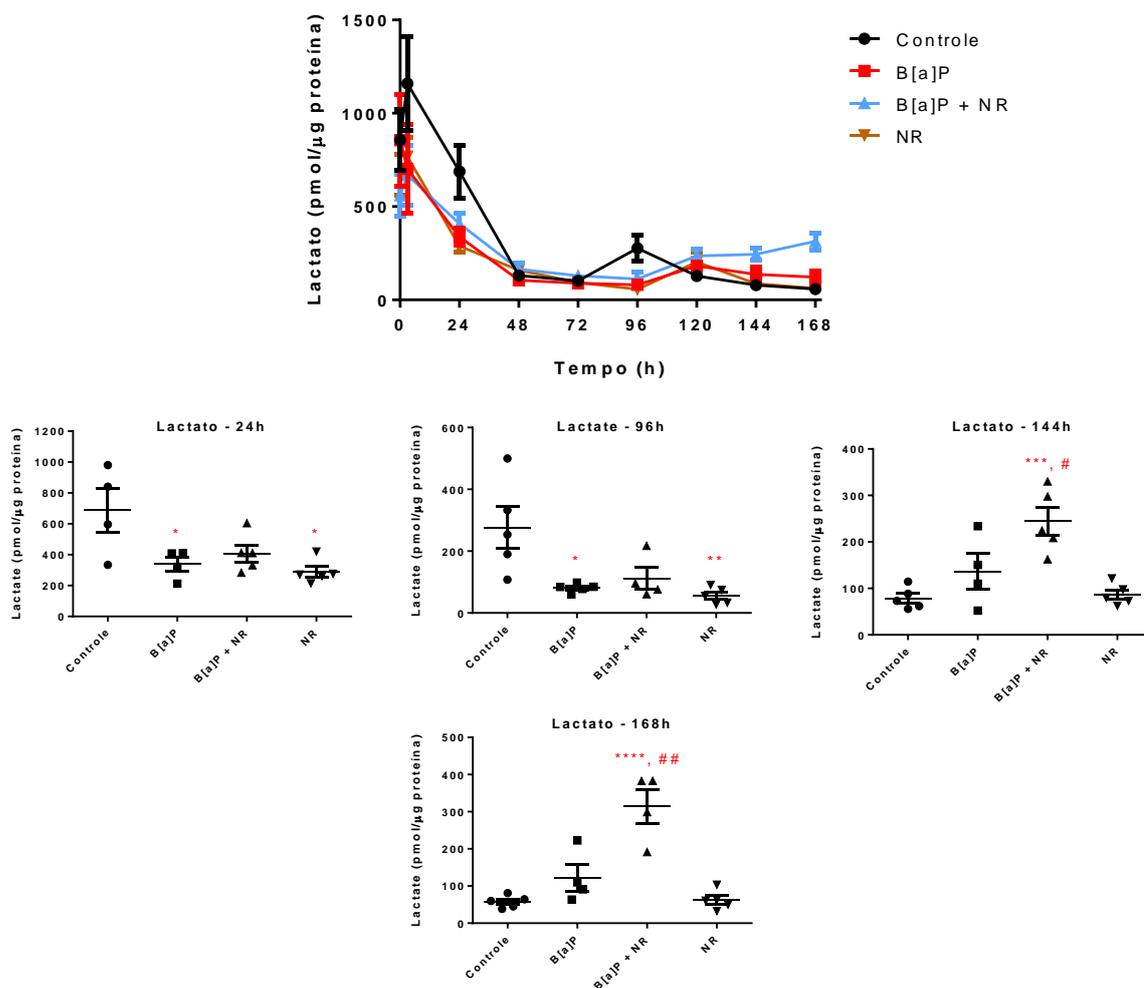


Figura 48. Razão ATP/ADP em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).



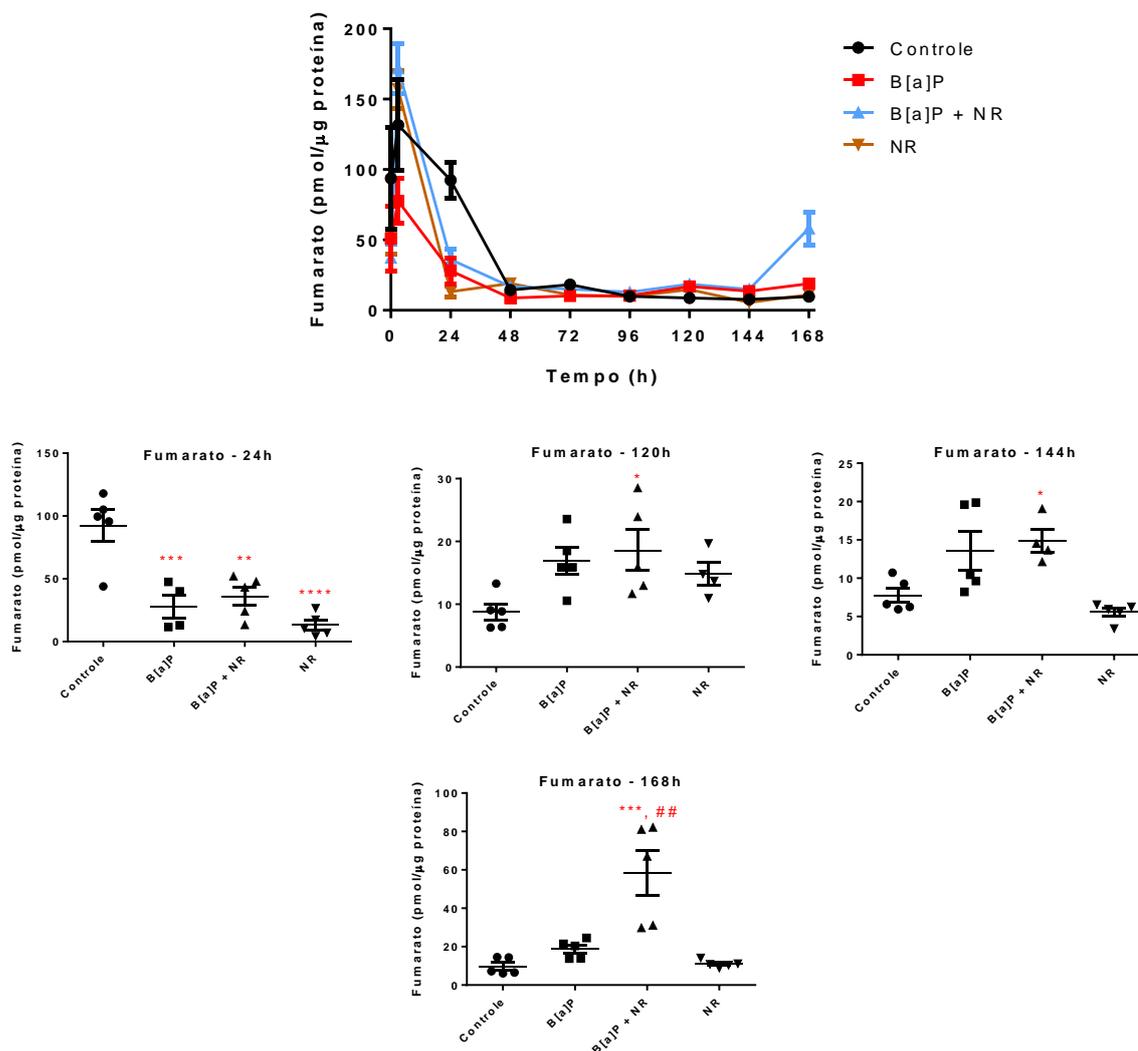


Figura 50. Concentração de fumarato em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, #####).

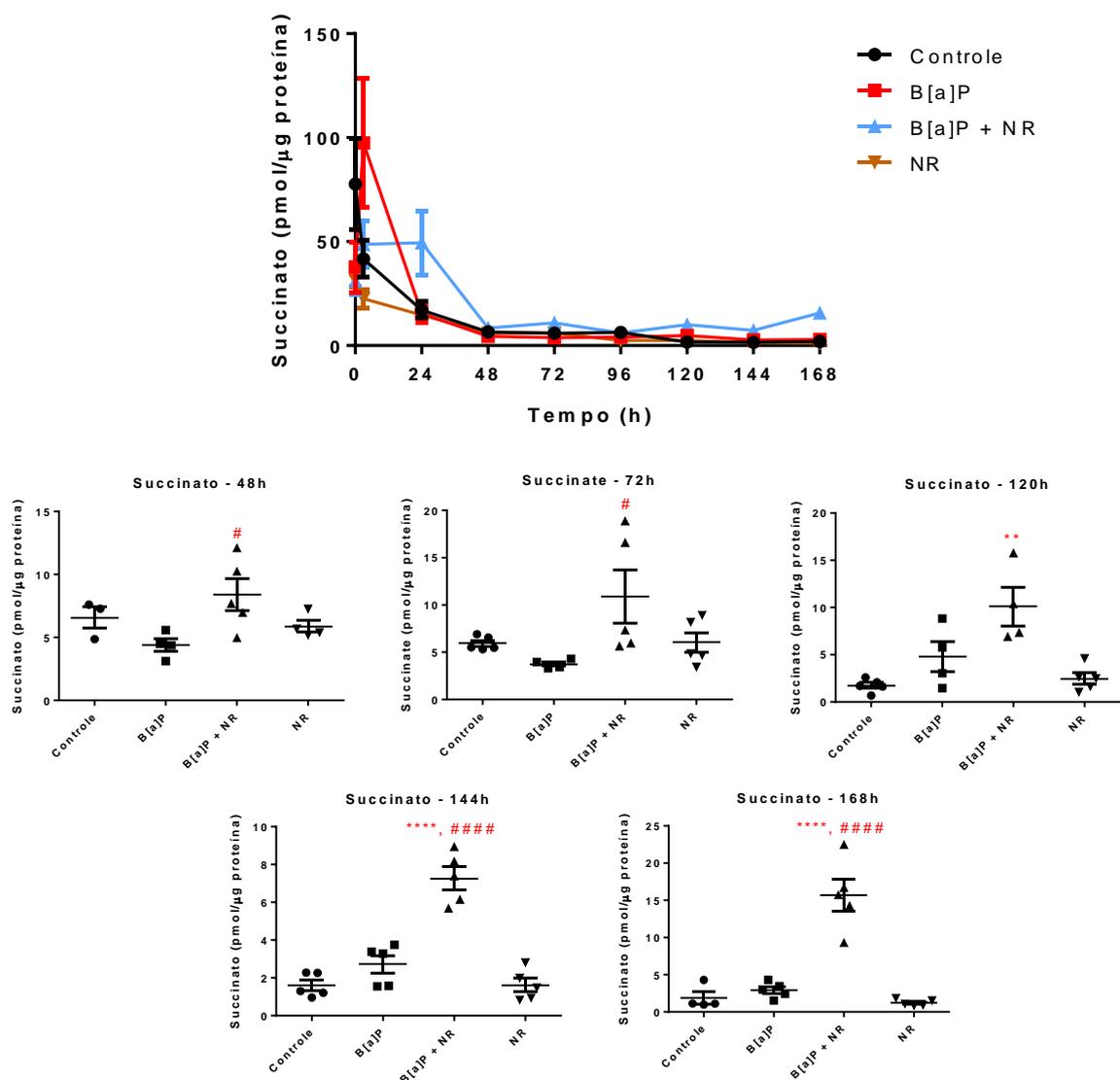


Figura 51. Concentração de succinato em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, #####).

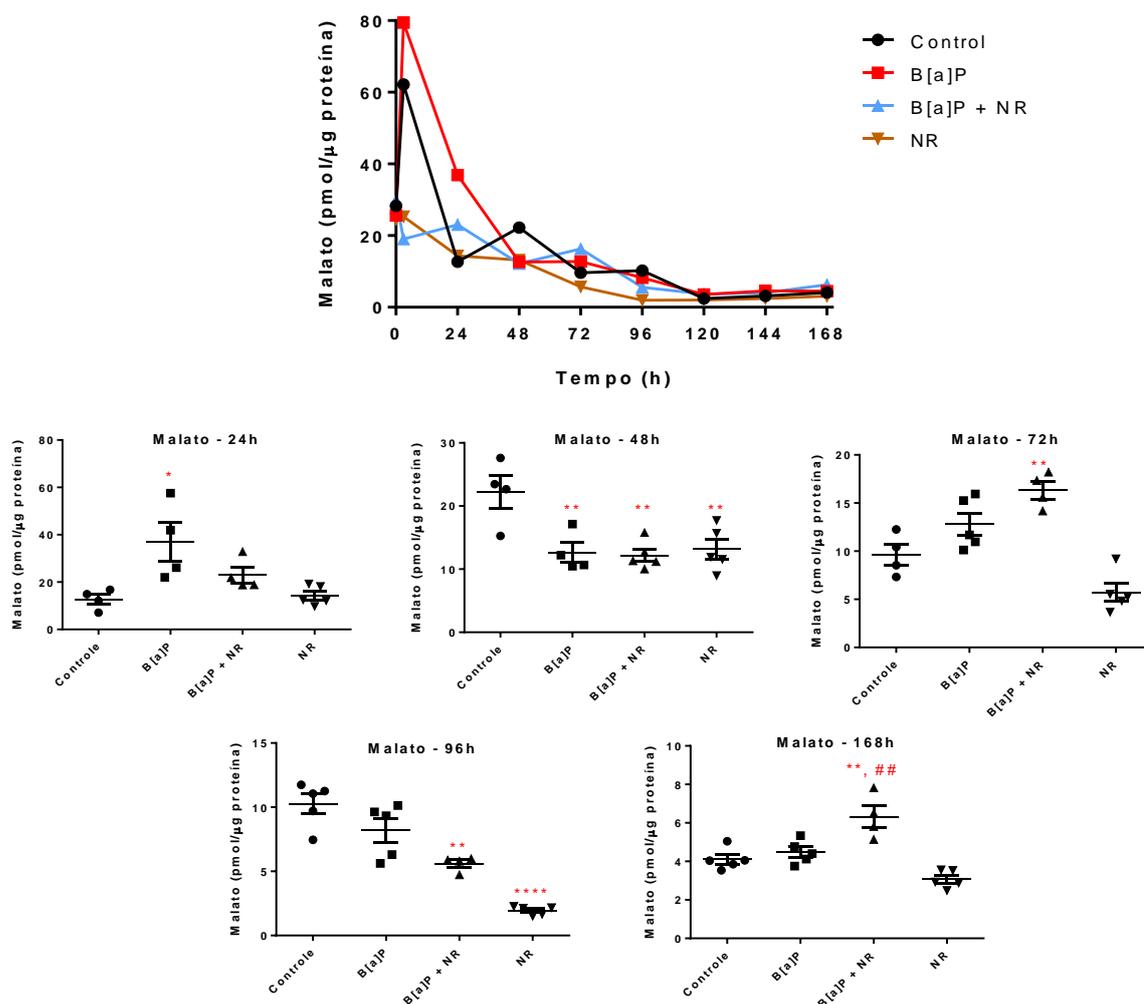
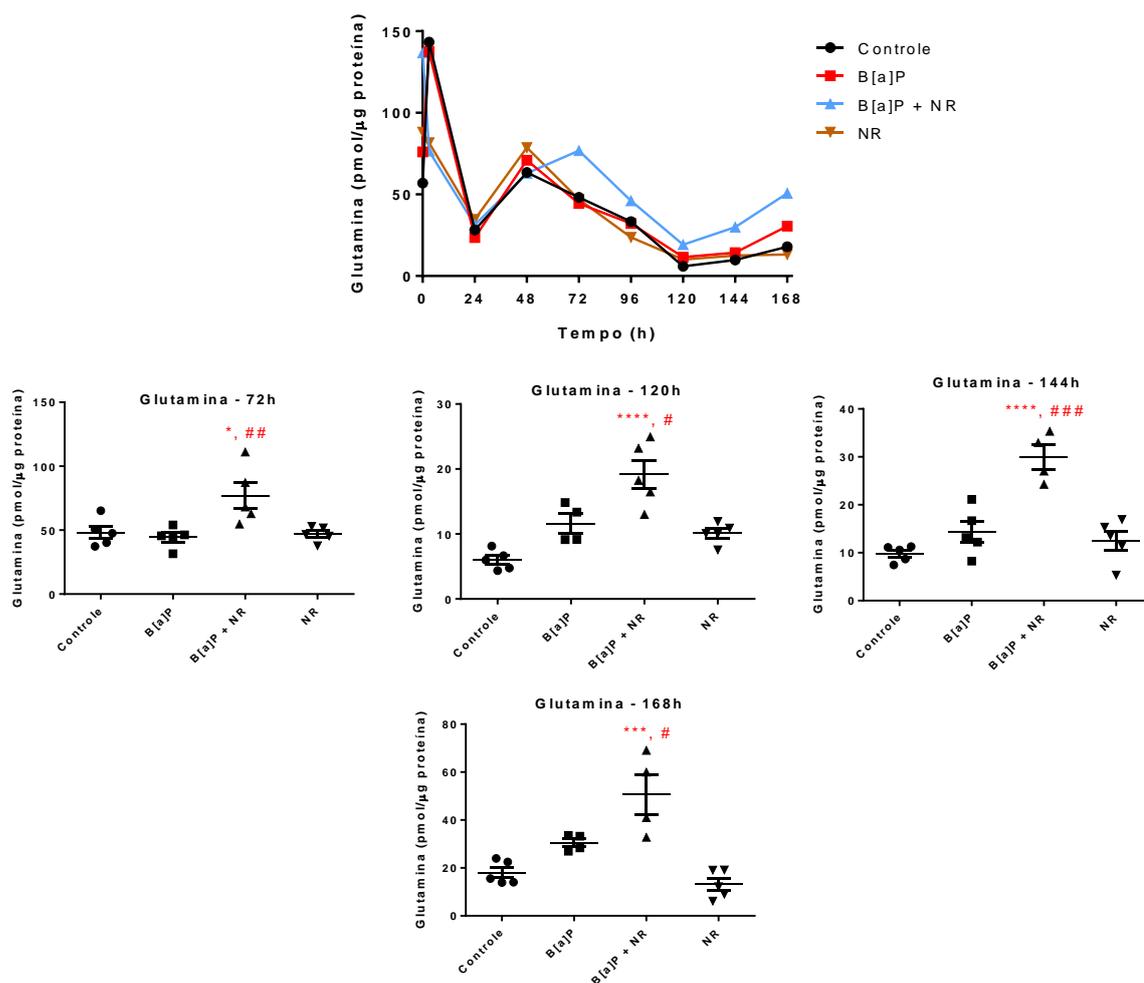


Figura 52. Concentração de malato em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, #####).



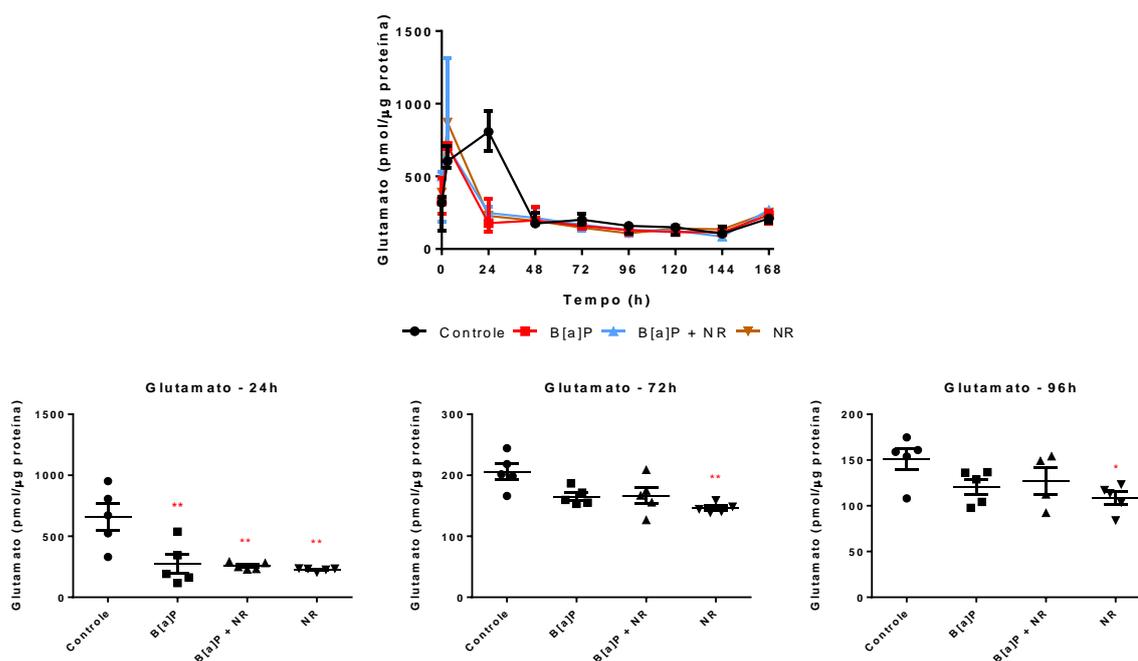


Figura 54. Concentração de glutamato em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****).

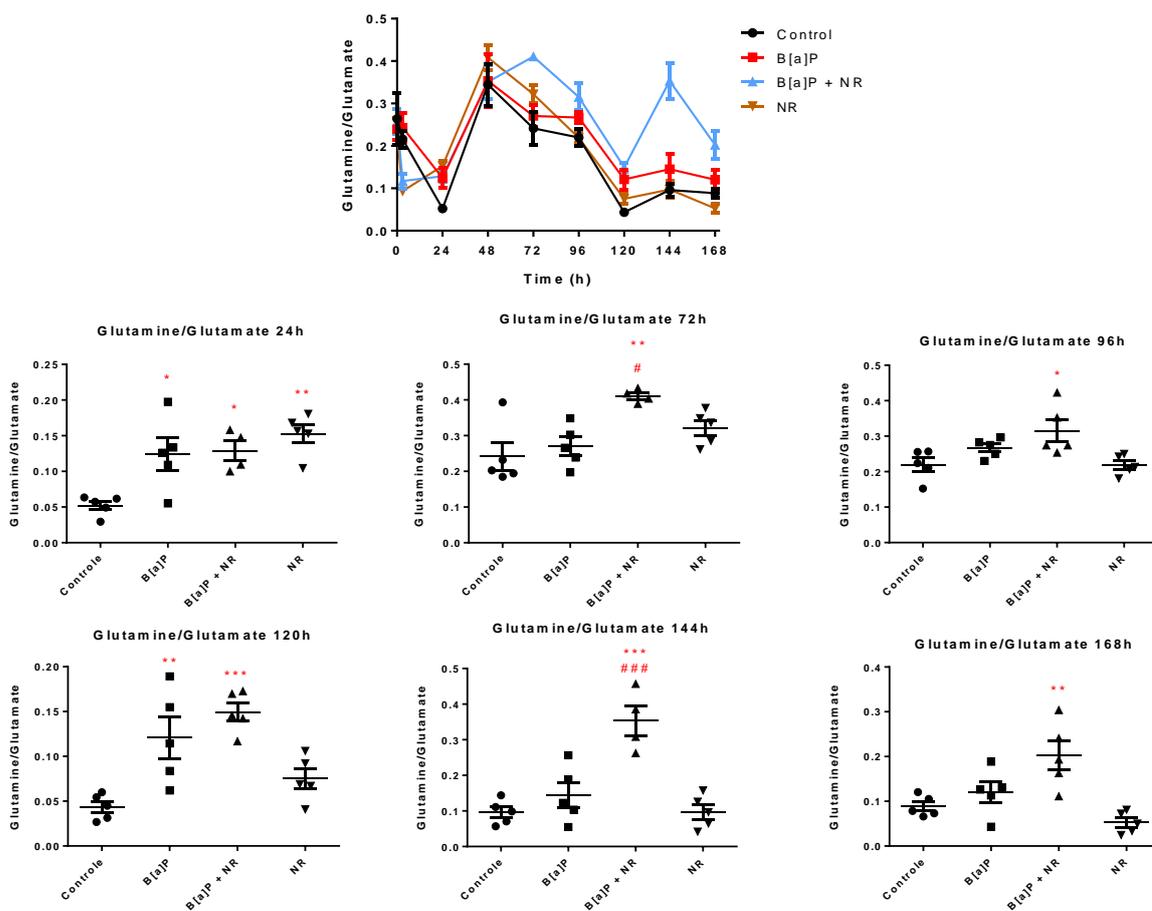


Figura 55. Razão glutamina/glutamato em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).

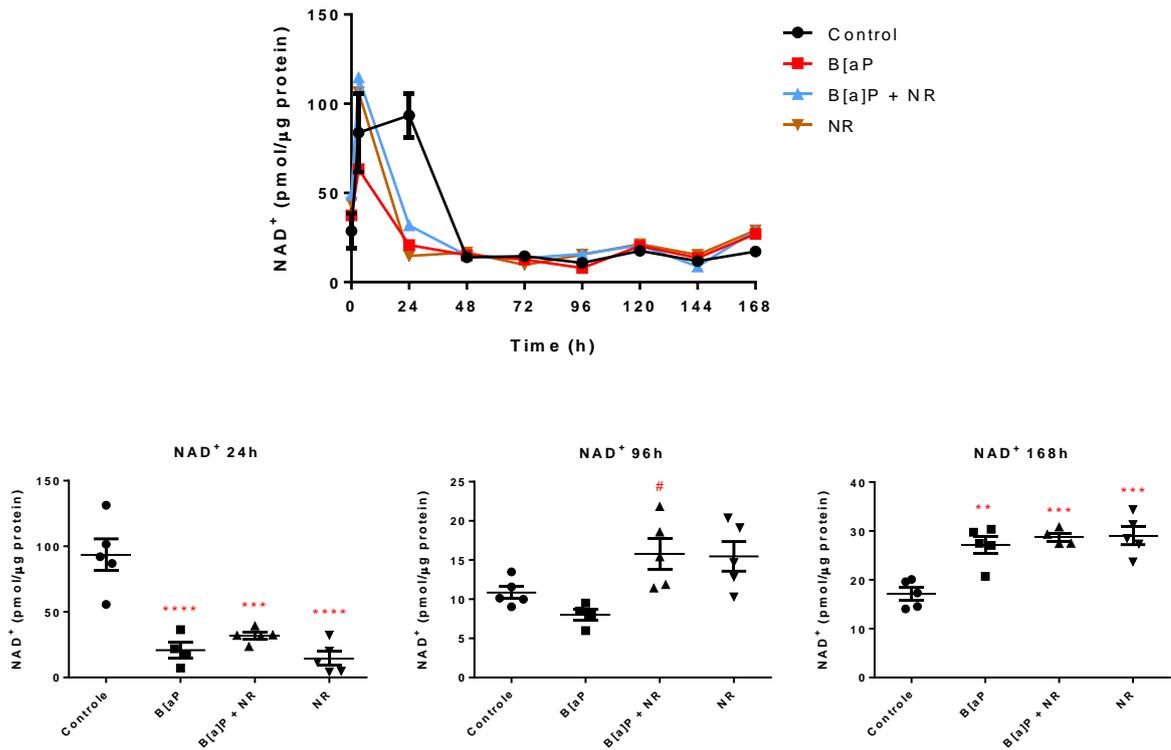


Figura 56. Concentração de NAD⁺ em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média ± erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).

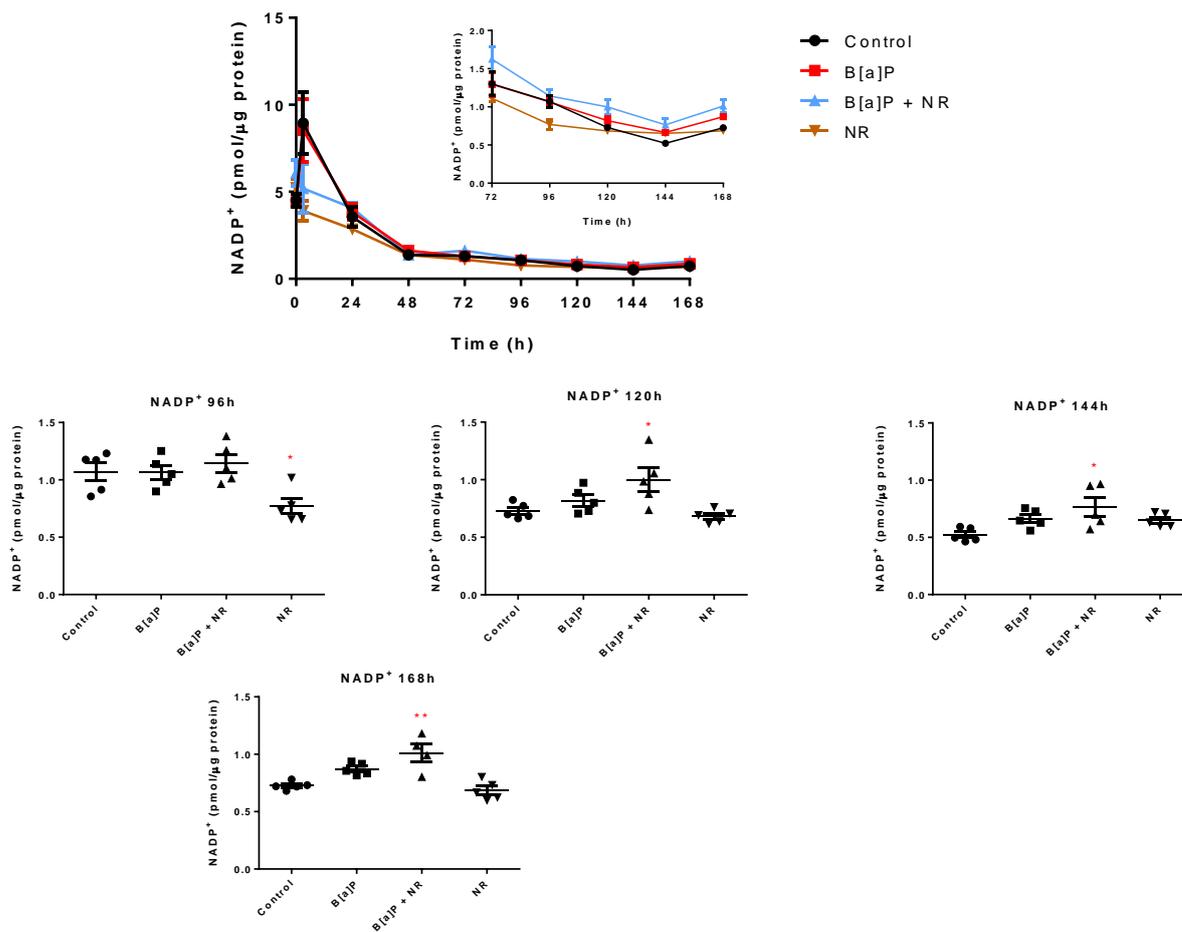


Figura 57. Concentração de NADP⁺ em células BEAS-2B expostas por 0, 3, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****).

No segundo experimento aumentamos o número de metabólitos quantificados. Foram quantificados os metabólitos destacados em vermelho na **Figura 58** (malato, citrato, piruvato, lactato, aspartato, argininosuccinato, asparagina, arginina, fumarato, succinato), 2-L-hidroxiglutarato, glutamina, glutamato, adenosina, nicotinamida, nicotinamida mononucleotídeo, além de AMP, ADP, ATP, NAD⁺ e NADP⁺. NADH e α -cetoglutarato não foram detectados pelo método cromatográficos. As células foram coletadas em 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de exposição a B[a]P na presença e ausência de NR.

Uma visão geral das alterações observadas nas concentrações dos metabólitos quantificados no experimento 2 está apresentada na **Figura 59**.

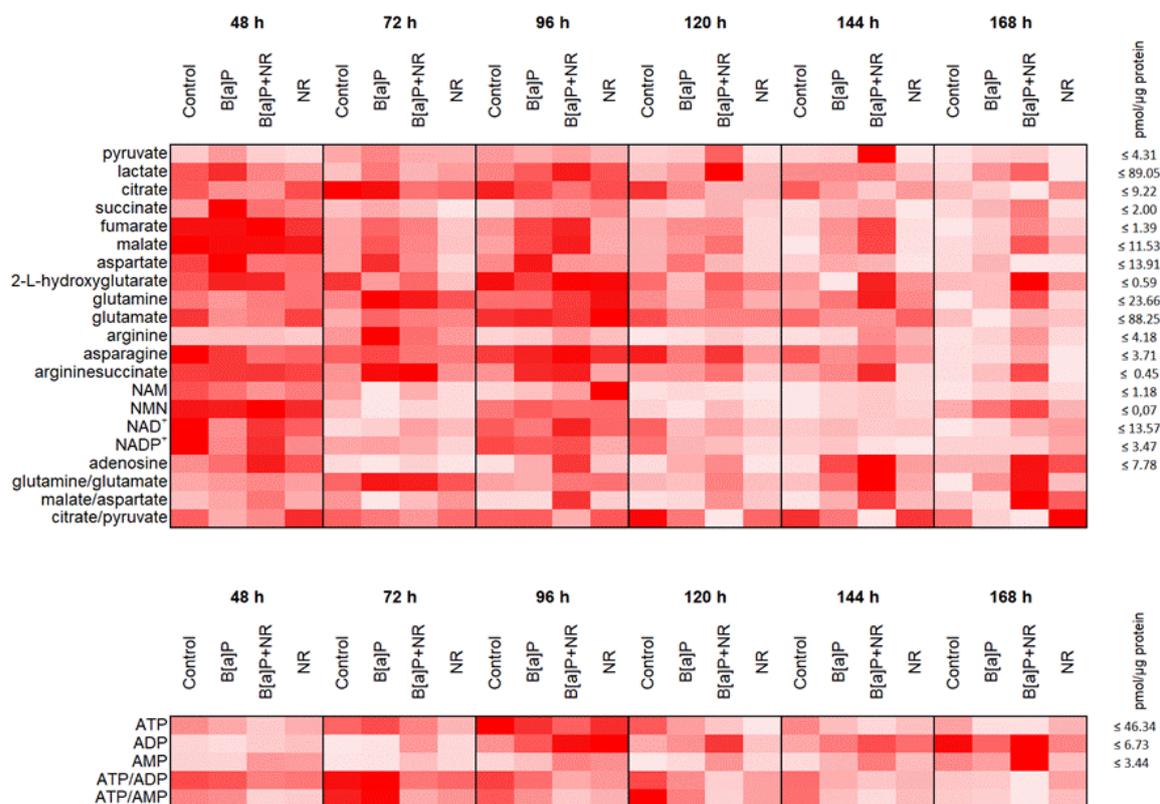


Figura 59. Visão geral das concentrações das moléculas quantificadas nas células BEAS-2B expostas por 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. São apresentadas as médias ao longo do tempo. As maiores concentrações em cada linha são apresentadas na cor vermelha intensa.

Foi realizada a PCA incluindo os dados de succinato, piruvato, fumarato, arginina, citrato, lactato, asparagina, aspartato, 2-L-hidroxioglutarato, malato, argininossuccinato, nicotinamida, nicotinamida mononucleotídeo, NAD⁺, NADP⁺, ATP, ADP e AMP.

Os gráficos de escores são utilizados para demonstrar as variáveis que mais contribuíram para a diferenciação e agrupamento dos pontos. Como apresentado na **Figura 60**, observamos a separação entre os grupos nos períodos de 120, 144 e 168 h de exposição, com destaque para a separação do grupo B[a]P+NR em relação aos demais grupos.

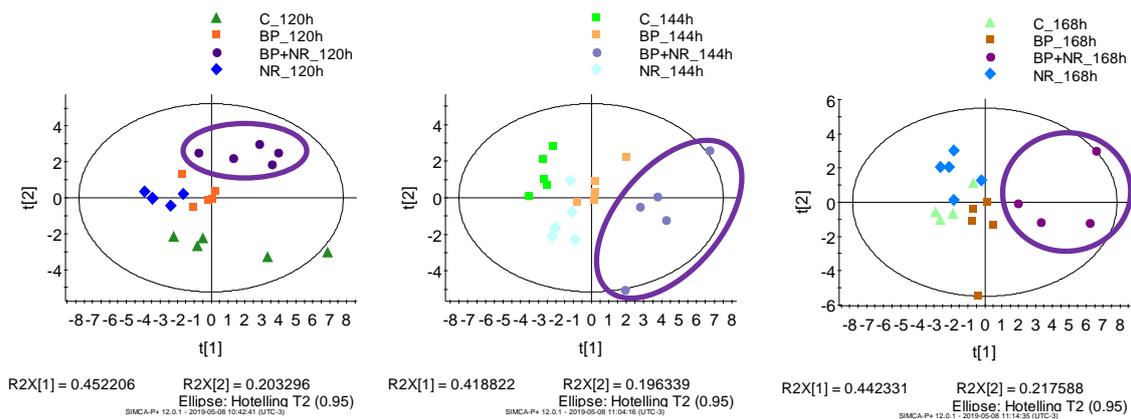


Figura 60. PCA utilizando as concentrações de succinato, piruvato, fumarato, arginina, citrato, lactato, asparagina, aspartato, 2-L-hidroxiglutarato, malato, argininosuccinato, nicotinamida, nicotinamida mononucleotídeo, NAD^+ , $NADP^+$, ATP, ADP e AMP das células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle.

Verificamos que nas células expostas a B[a]P+NR há menor entrada de piruvato (via piruvato desidrogenase) no ciclo de Krebs, resultando em menores concentrações de citrato (**Figura 61**) e maiores concentrações de piruvato e lactato (**Figuras 62 e 63**). Os dados do coeficiente de correlação (r) em 168 h (**Figura 64**) mostram que as correlações de piruvato com citrato ($r = -0,05$) e lactato ($r = 0,69$) nas células expostas a B[a]P+NR se invertem em comparação às correlações observadas nas células expostas a B[a]P (correlação entre piruvato e citrato, $r = 0,95$; correlação entre piruvato e lactato, $r = -0,46$).

As células expostas a B[a]P+NR também apresentaram as maiores concentrações de malato (**Figura 65**), sem aumento paralelo de aspartato (**Figura 66**), o que resultou em grande aumento da razão malato/aspartato (**Figura 67**). Nas células expostas a B[a]P, as concentrações de malato e aspartato aumentaram de modo que a razão malato/aspartato não se alterou em relação ao controle. Essa observação juntamente com a observação do estresse energético exacerbado nas células expostas a B[a]P+NR (**Figuras 68 e 69**) nos permitem sugerir a ocorrência de um bloqueio do *shuttle* malato-aspartato seletivamente tóxico para as células expostas a B[a]P+NR. Paralelamente essas células apresentaram aumento das concentrações de arginina (**Figura 70**), asparagina (**Figura 71**) e argininosuccinato (**Figura 72**) (produtos formados a partir do aspartato no citoplasma) em comparação com as células expostas a B[a]P. Maiores concentrações de fumarato (**Figura 73**) e succinato (**Figura 74**) também foram detectadas nas células expostas a B[a]P+NR. Após 168 h foram observados aumentos das concentrações de NAD^+ (**Figura 75**) e $NADP^+$ (**Figura 76**) nas células expostas a NR. As

concentrações de adenosina apareceram mais aumentadas nas células expostas a B[a]P+NR no período de 96 a 168 h (**Figura 77**). No período de 120 a 168 h foram detectadas concentrações aumentadas de NMN no grupo B[a]P+NR (**Figura 78**) e de NAM (**Figura 79**) nos grupos B[a]P e B[a]P+NR. Após 144 e 168 h somente as células expostas a B[a]P+NR apresentaram concentrações aumentadas de 2-L-hidroxiglutarato (**Figura 80**). A razão glutamina/glutamato aumentou nas células expostas a B[a]P+NR no período de 120 a 168 h (**Figura 81**).

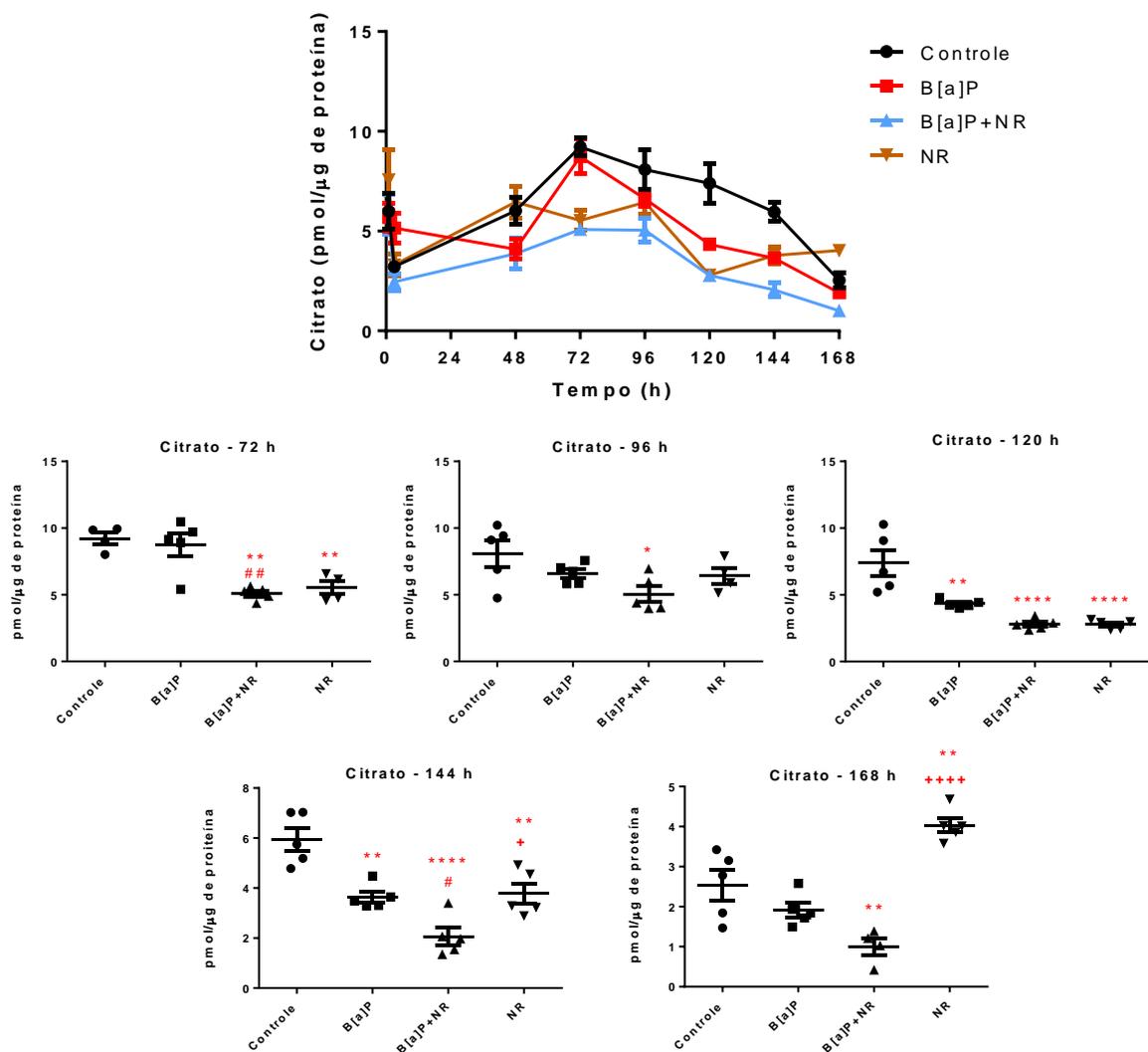


Figura 61. Concentração de citrato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinal de soma indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

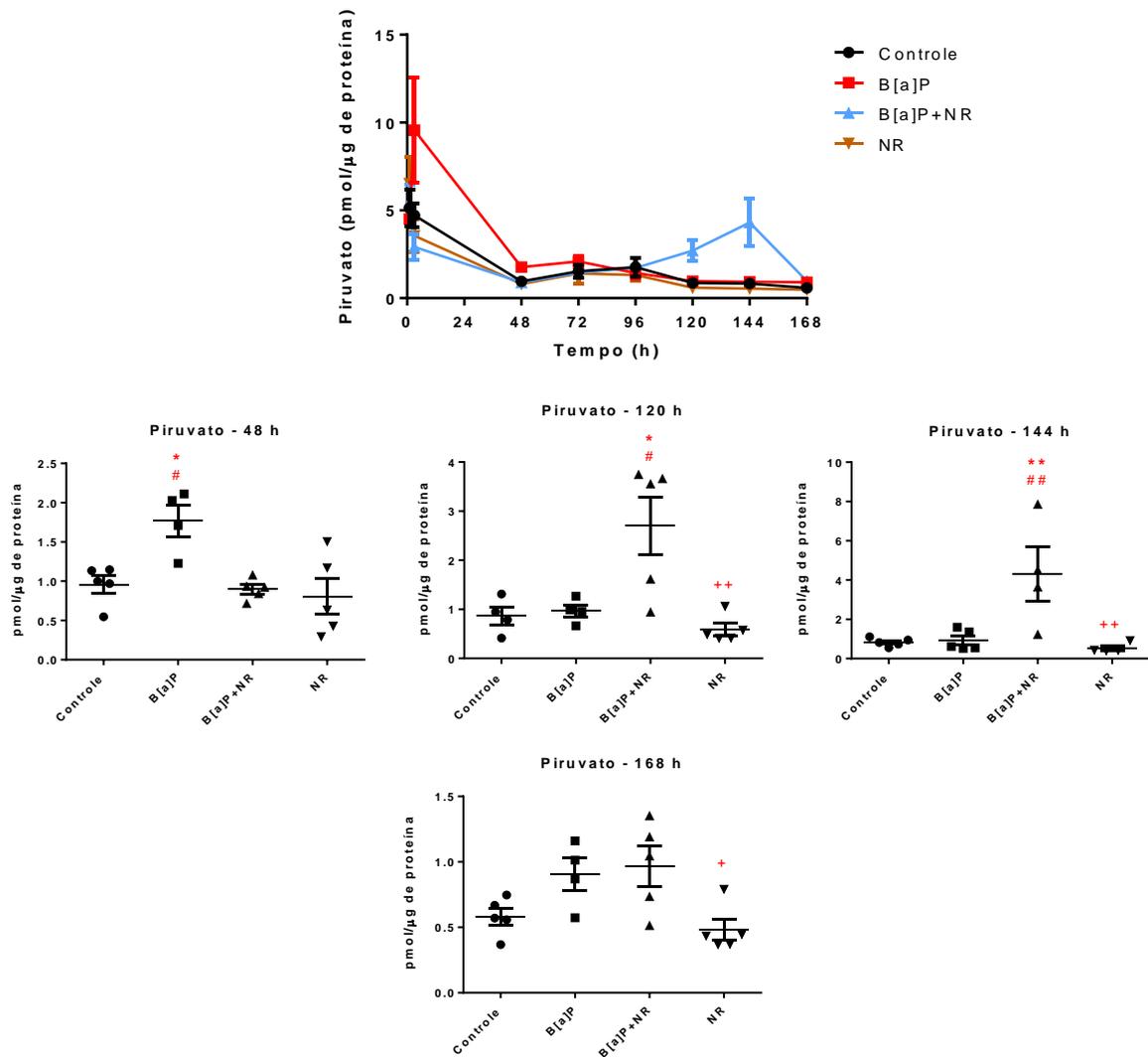


Figura 62. Concentração de piruvato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo a indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +).

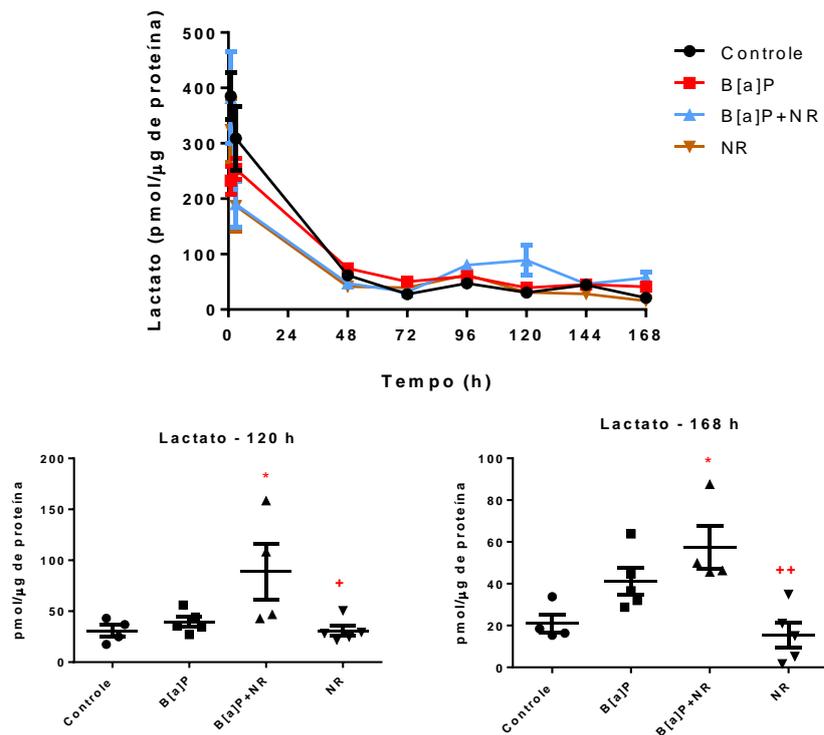


Figura 63. Concentração de lactato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++).

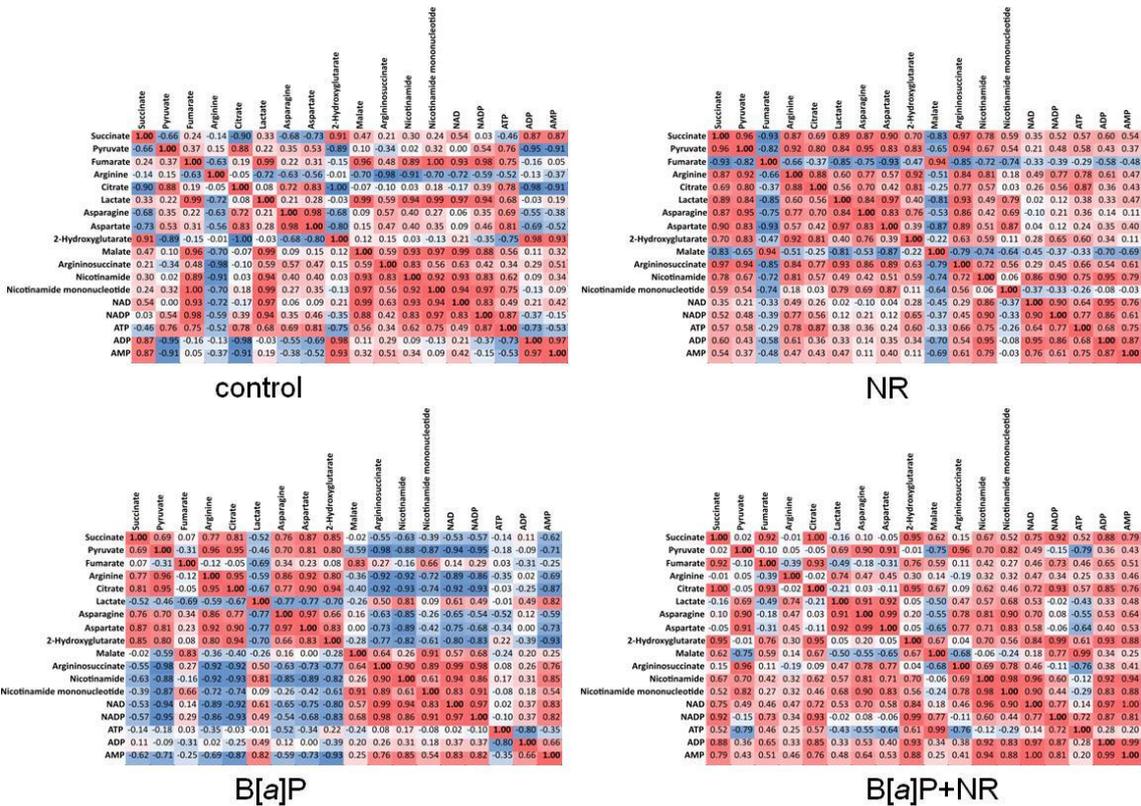


Figura 64. Correlações entre as moléculas (azul, negativa; vermelha, positiva) das células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle.

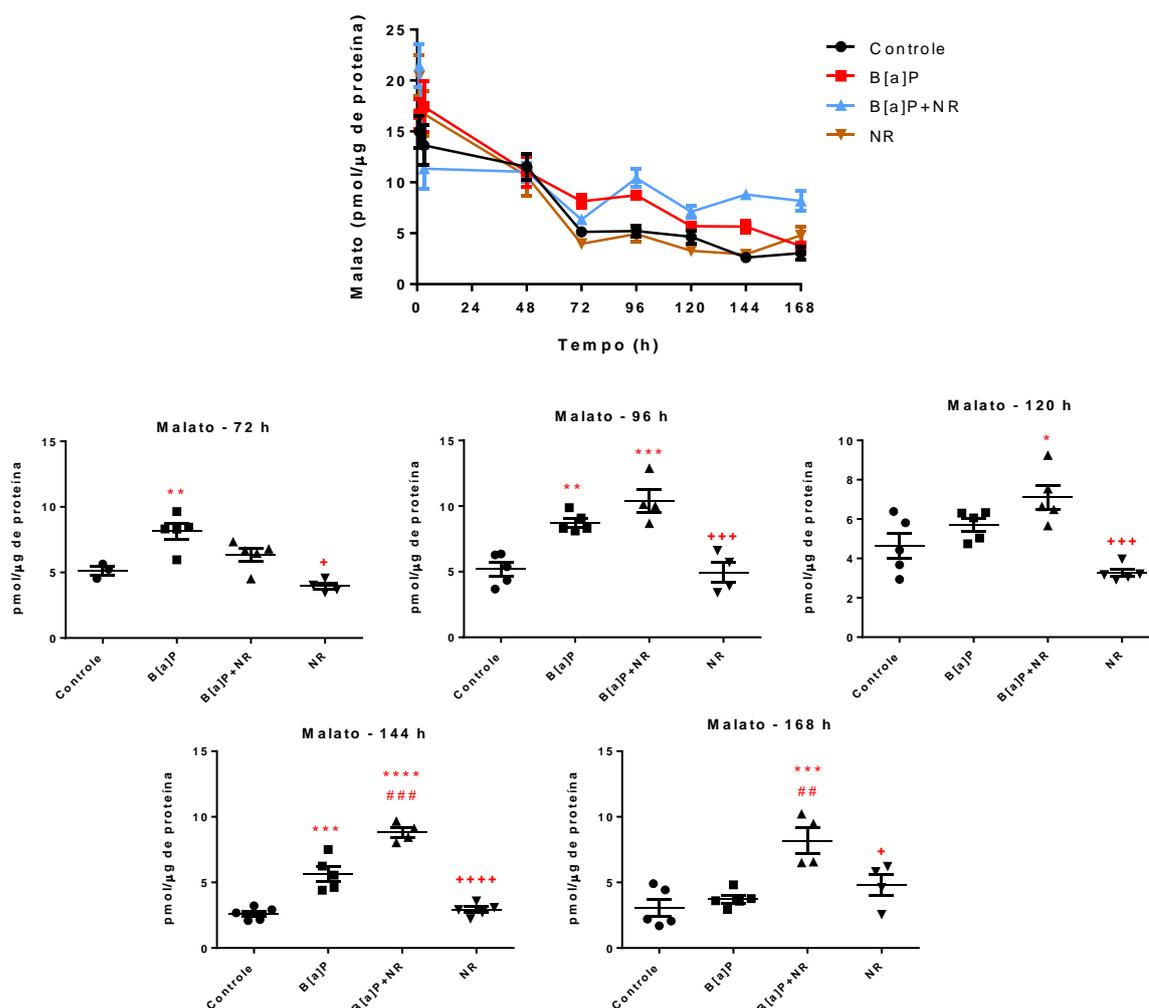


Figura 65. Concentração de malato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,001$, ***; $p < 0,0001$, ****).

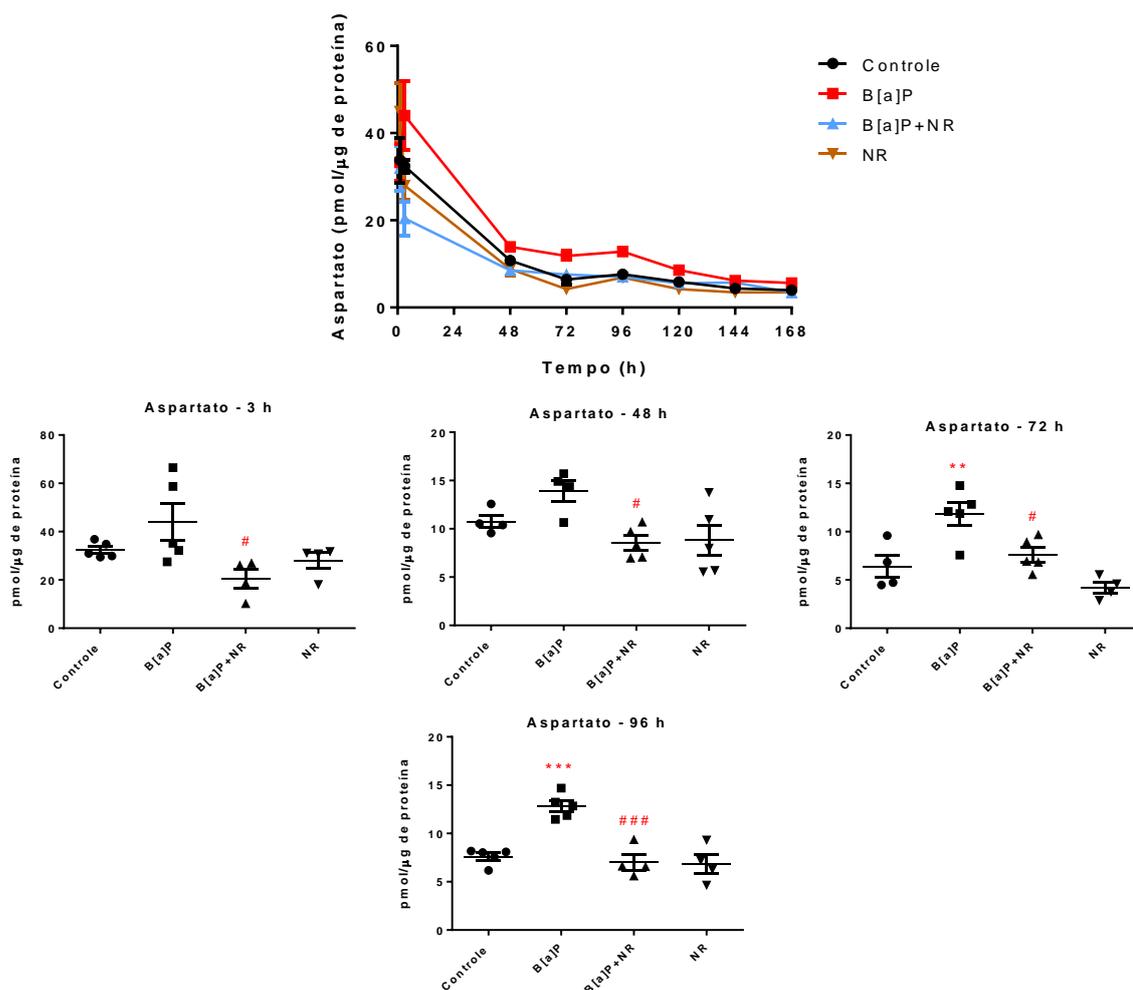


Figura 66. Concentração de aspartato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, #####).

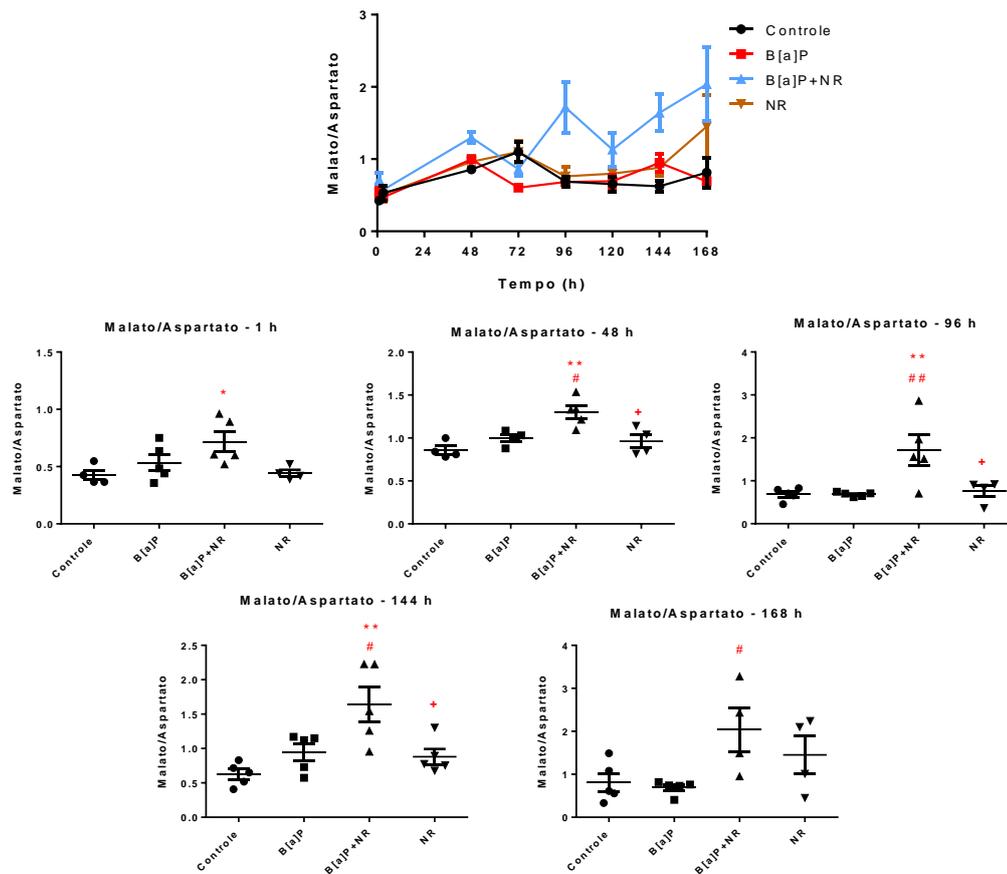


Figura 67. Razão malato/aspartato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##).

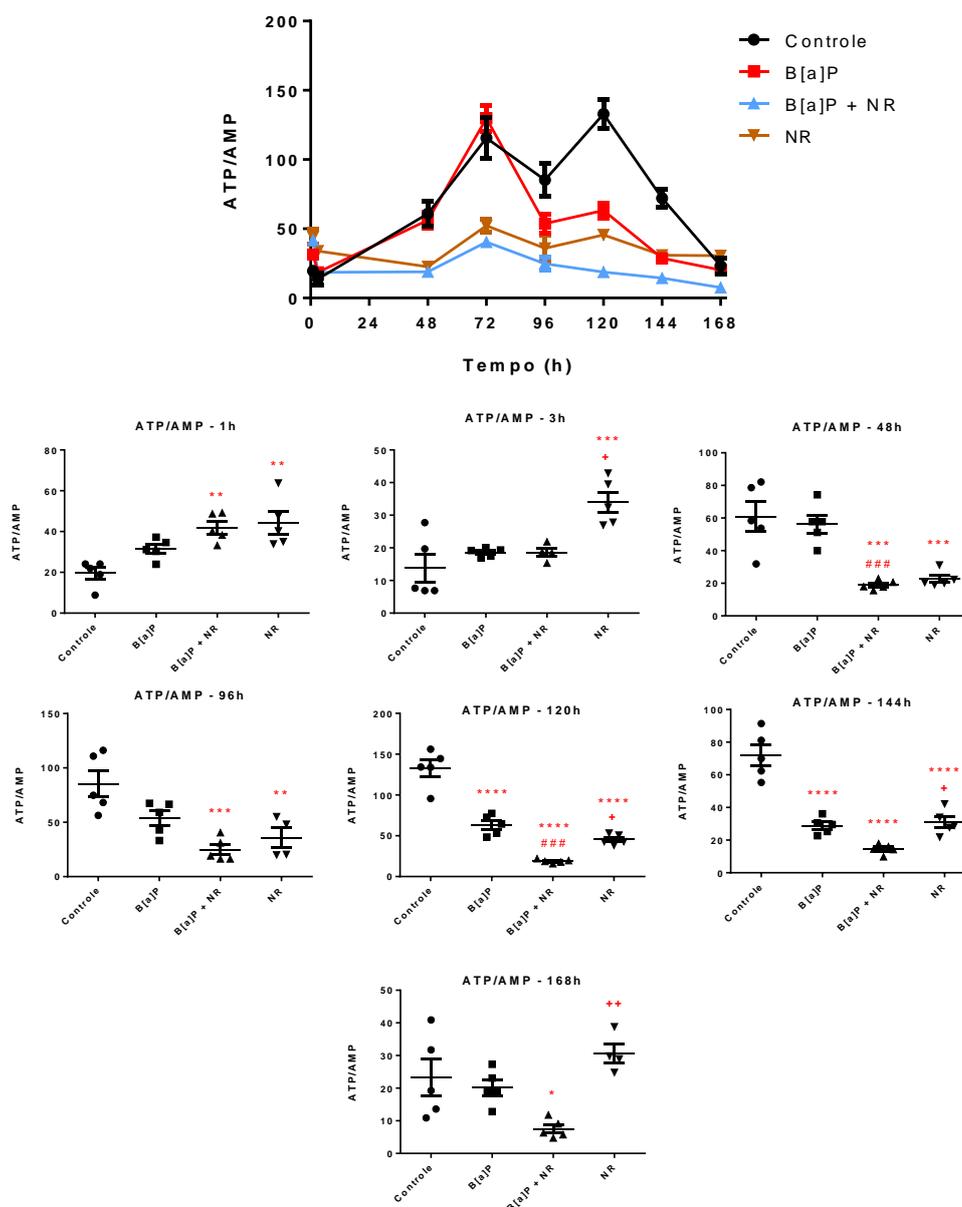


Figura 68. Razão ATP/AMP em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++).

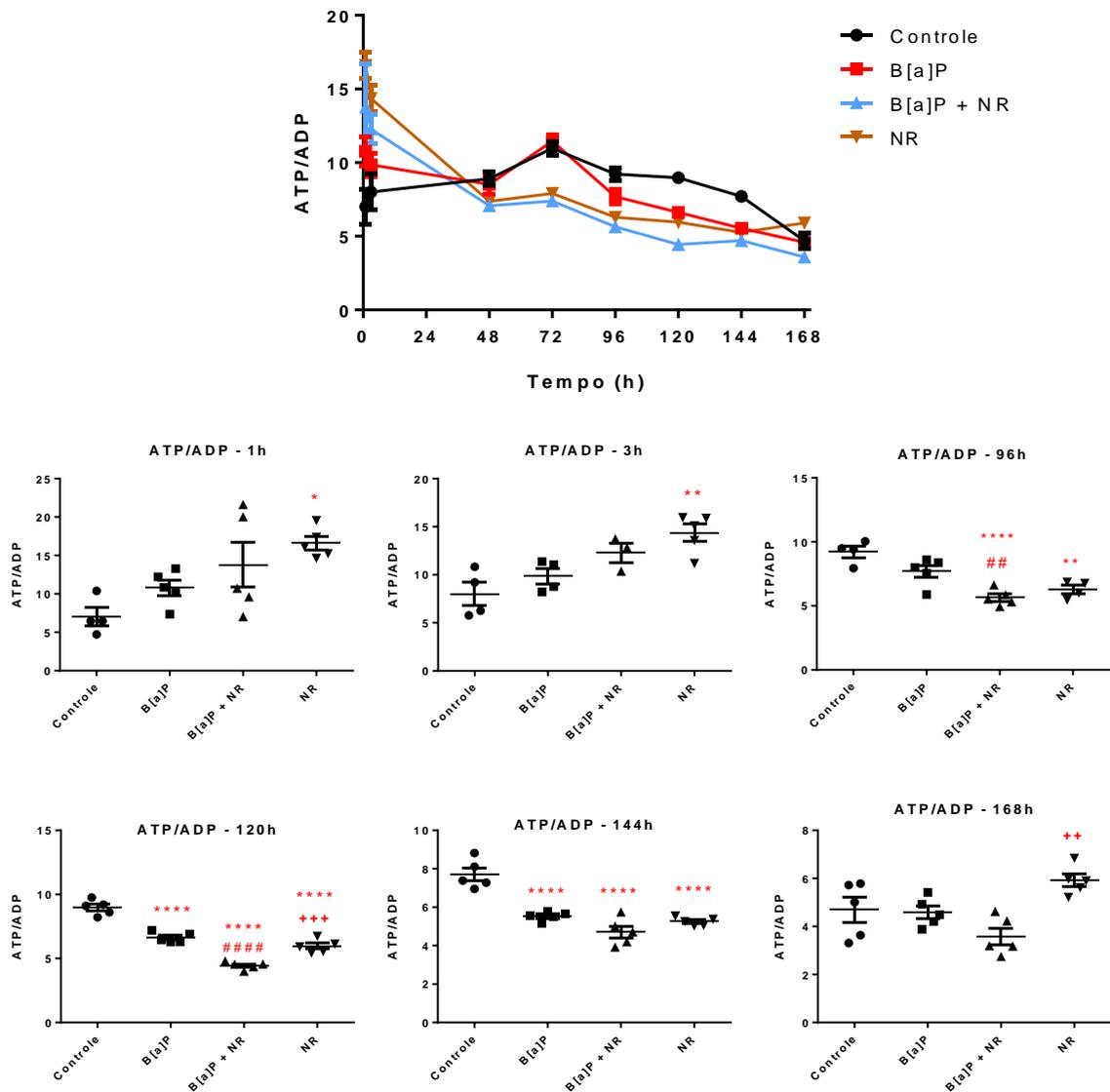


Figura 69. Razão ATP/ADP em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,01$, +++).

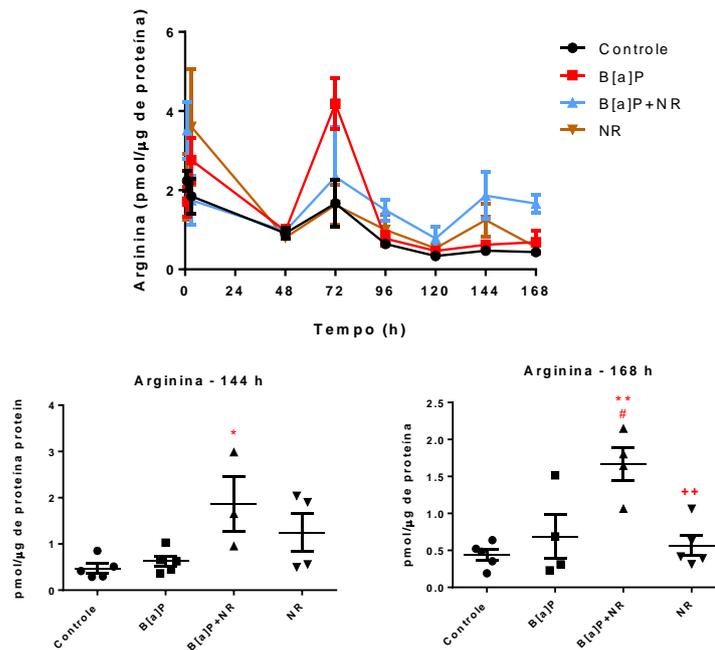


Figura 70. Concentração de arginina em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++).

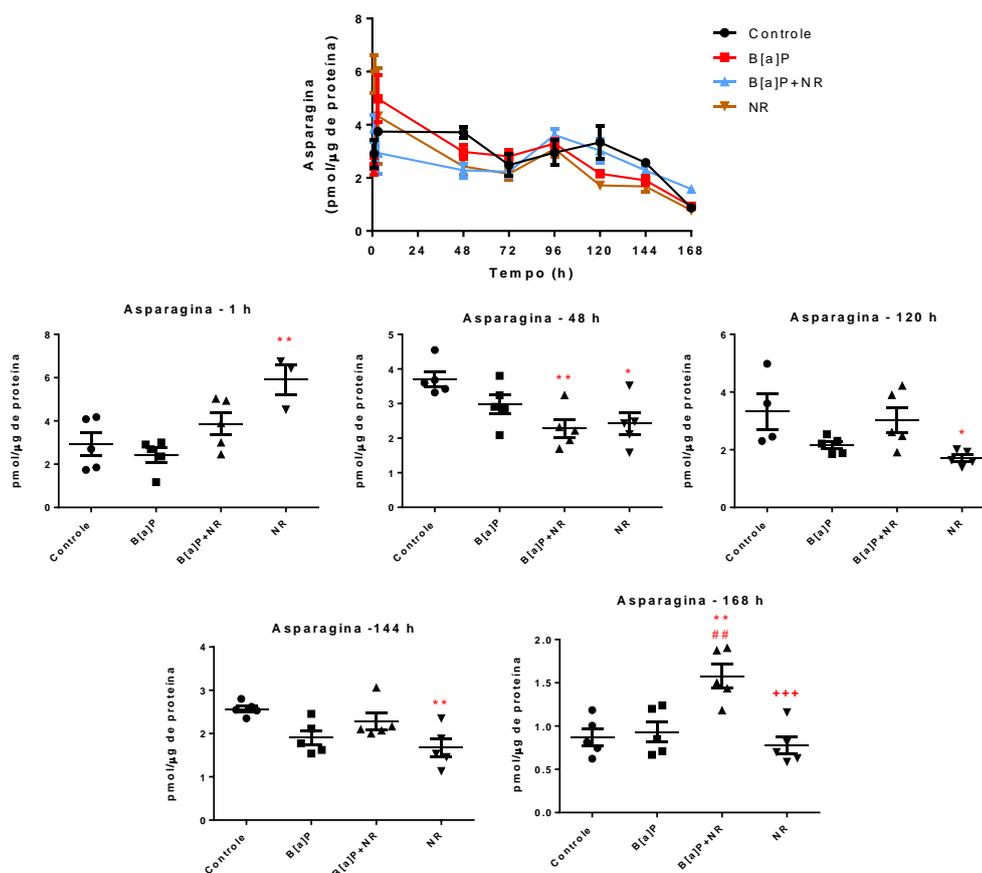


Figura 71. Concentração de asparagina em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++).

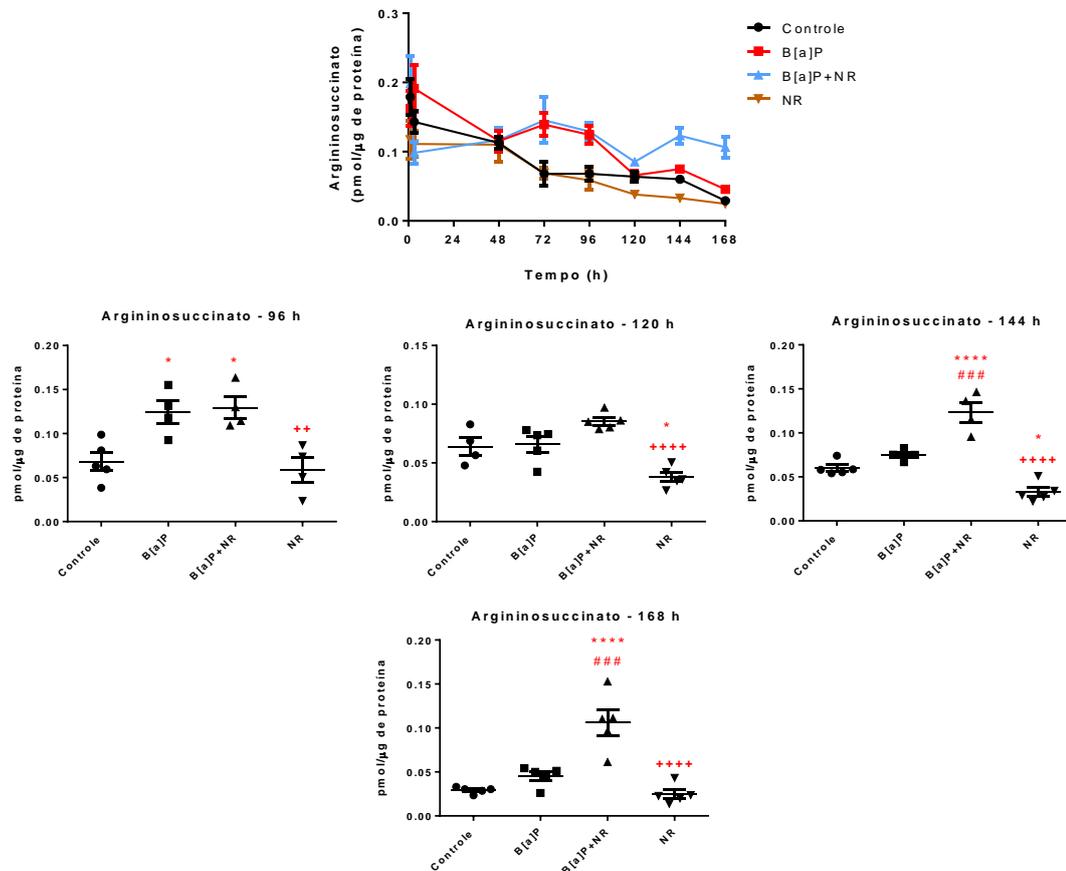


Figura 72. Concentração de argininosuccinato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

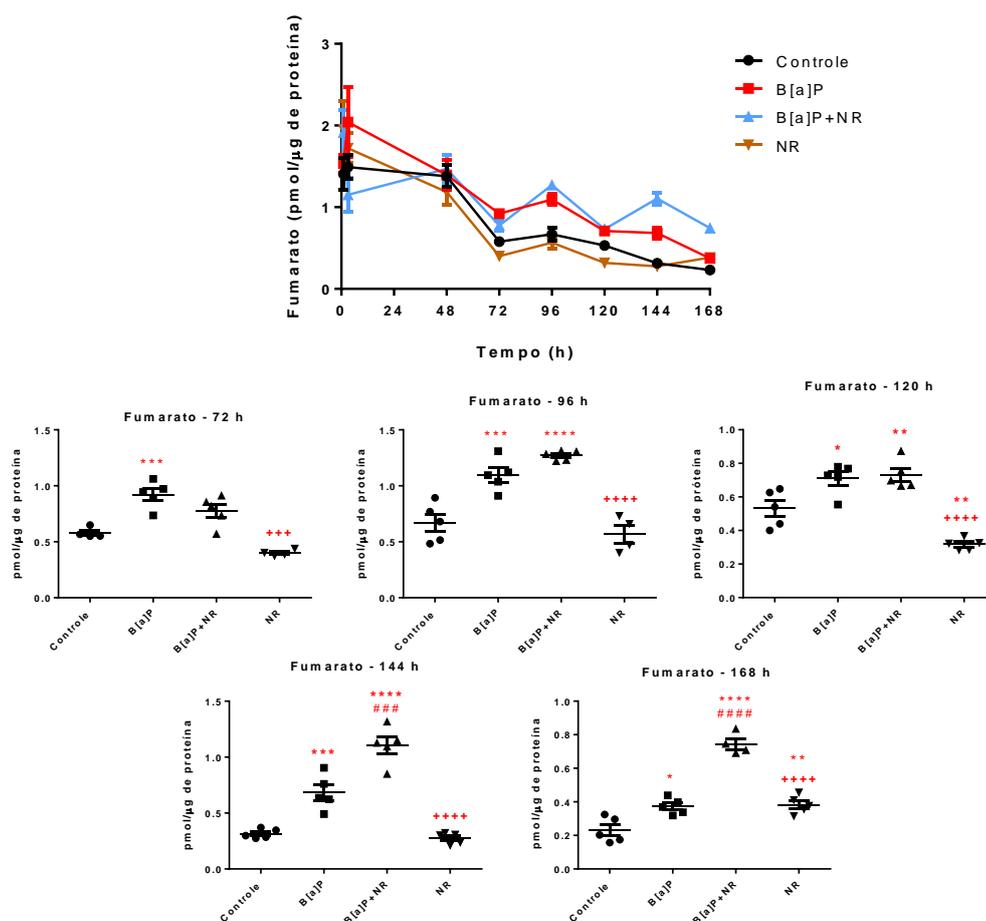


Figura 73. Concentração de fumarato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

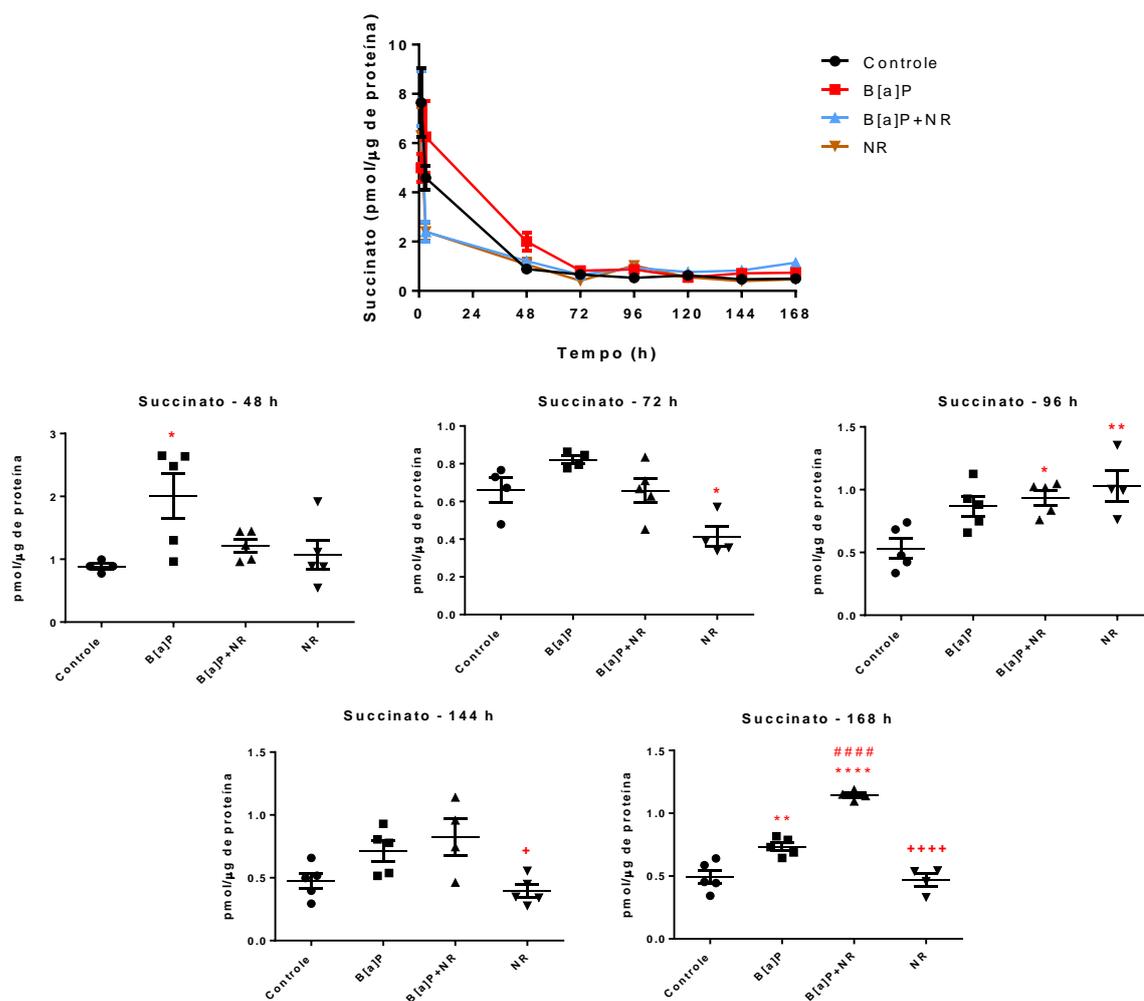


Figura 74. Concentração de succinato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

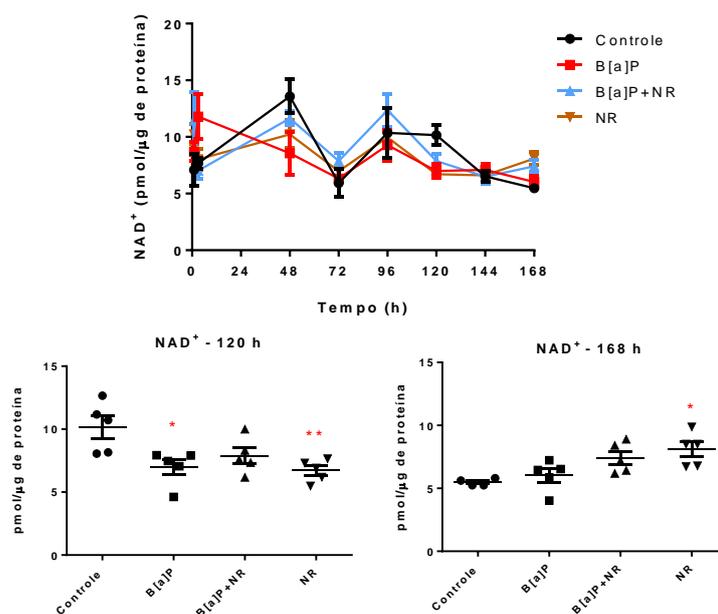


Figura 75. Concentração de NAD⁺ em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média ± erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **).

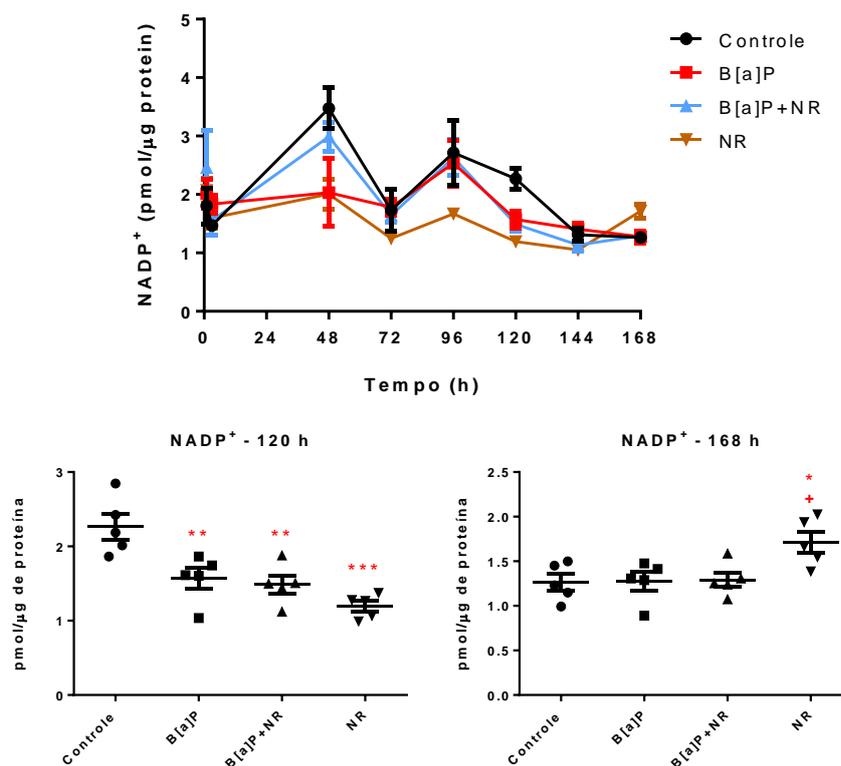


Figura 76. Concentração de NADP⁺ em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média ± erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), e sinal de positivo indica as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +).

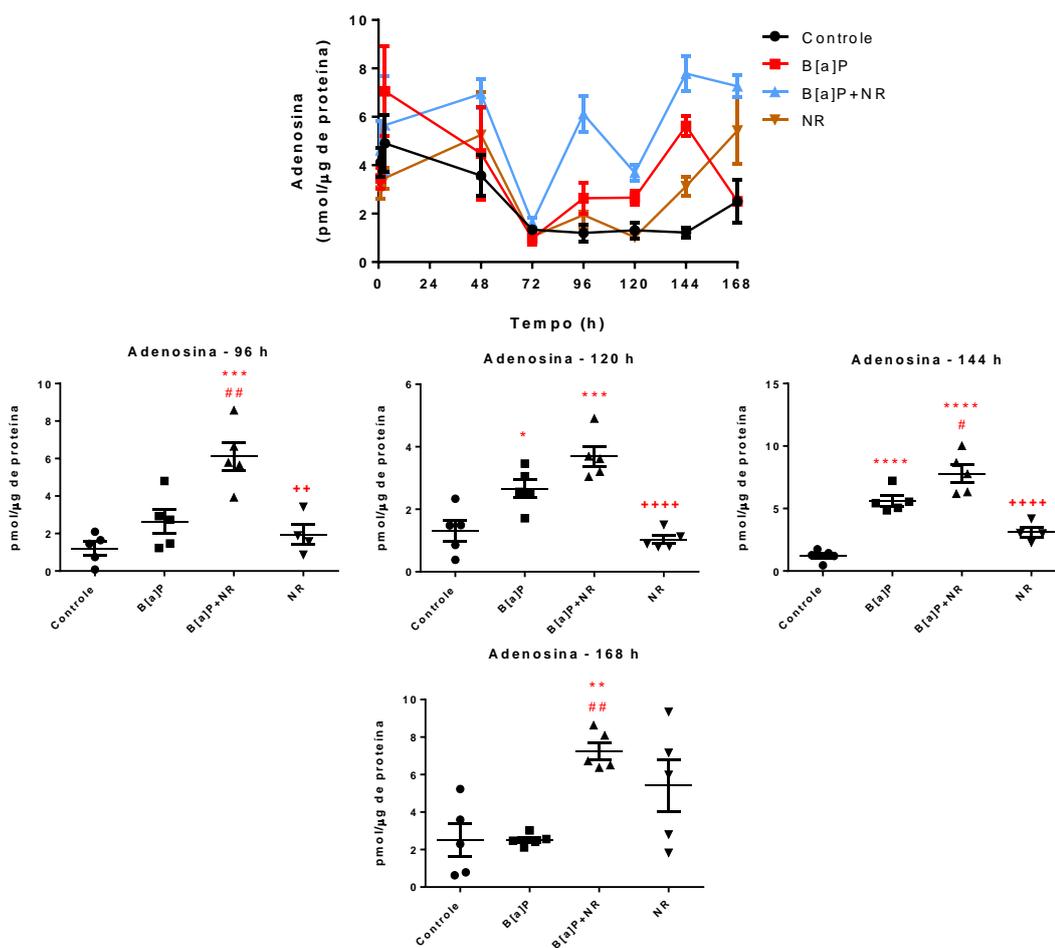


Figura 77. Concentração de adenosina em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

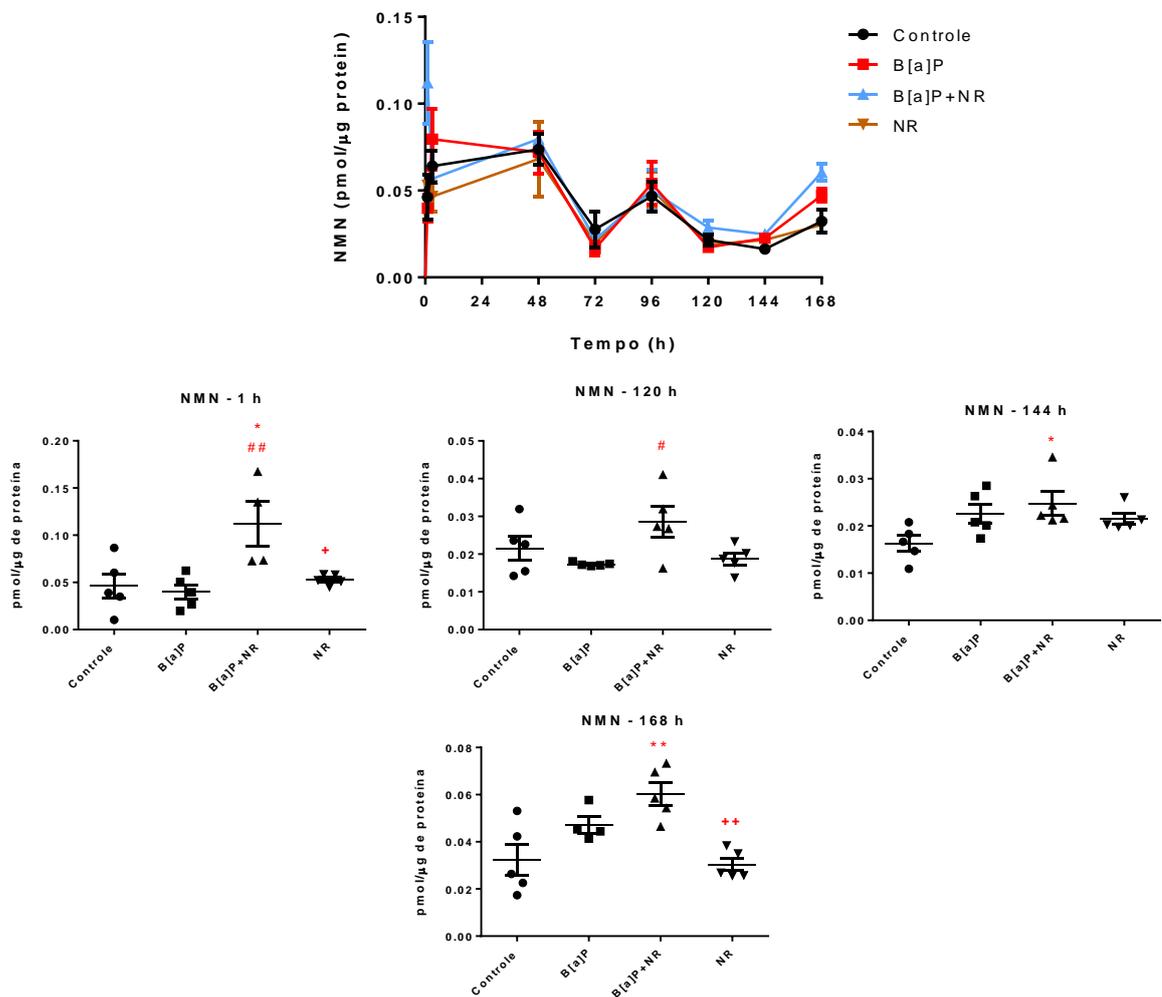


Figura 78. Concentração de NMN em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##).

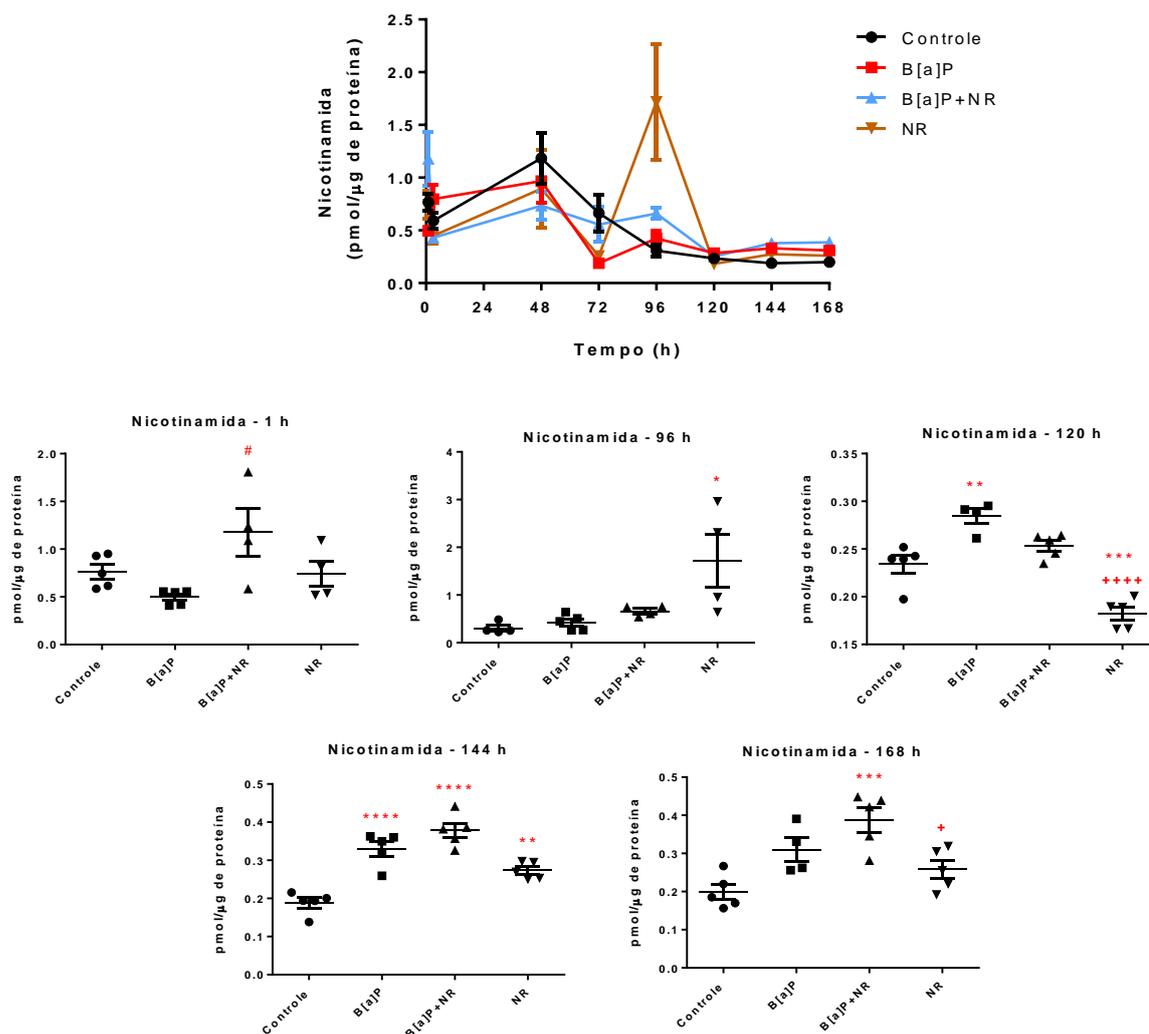


Figura 79. Concentração de nicotinamida (NAM) em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilha indica a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #), sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

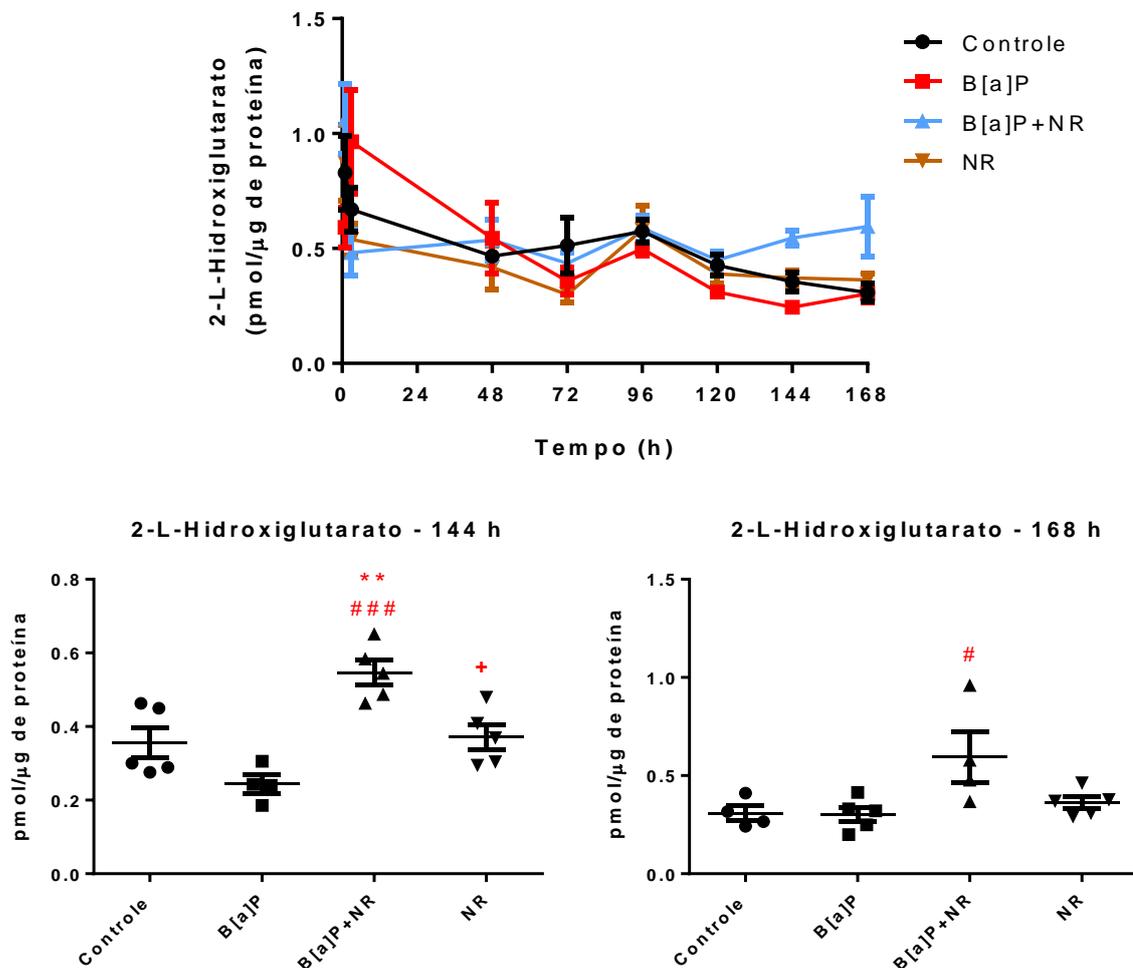


Figura 80. Concentração de 2-L-hidroxi-glutarato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###;), e sinal de positivo indica a diferença entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +).

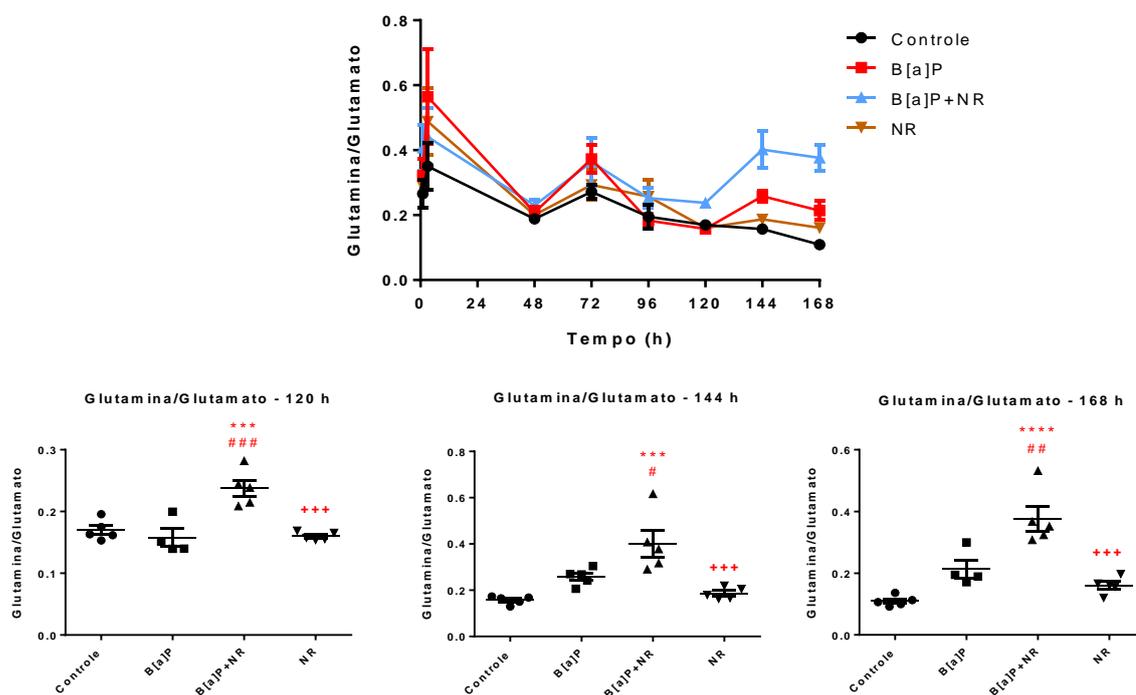


Figura 81. Concentração glutamina/glutamato em células BEAS-2B expostas por 1, 3, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. São apresentados os níveis ao longo do tempo e, separadamente, os níveis em cada período em que foram detectadas alterações significativas. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++).

O conjunto de dados de alterações metabólicas nos permite concluir que o efeito protetor da NR nesse modelo não se deve à reativação do ciclo de Krebs. Ao contrário, NR na presença do carcinógeno B[a]P provoca forte inibição do metabolismo celular voltado à geração de energia. Esse efeito metabólico resulta na ativação de vias que aceleram a entrada das células em apoptose, como podemos observar nas análises dos tipos de morte celular. Os metabólitos conhecidos como oncometabólitos (fumarato, succinato, 2-L-hidroxi-glutarato) foram detectados em maiores concentrações nas células expostas a B[a]P+NR em comparação com o grupo exposto a B[a]P em diferentes momentos. Tal fato, juntamente com a observação da proteção oferecida pela NR contra a transformação induzida por B[a]P, nos leva a pensar que não necessariamente concentrações elevadas desses metabólitos têm papel decisivo na indução da transformação. O aumento das concentrações desses metabólitos na tumorigênese pode indicar alterações no metabolismo energético que, dependendo da intensidade e duração, podem contribuir para a transformação ou a morte das células.

Algumas alterações específicas nos chamaram a atenção e nos auxiliam a desvendar os mecanismos pelos quais a NR propicia a entrada em apoptose das células expostas a B[a]P. A diminuição mais acentuada da concentração de citrato, acompanhada por maiores aumentos das concentrações de piruvato e lactato nas células expostas a B[a]P+NR indicam diminuição da entrada de piruvato no ciclo de Krebs via piruvato desidrogenase (**Figura 58**). Ao mesmo tempo observou-se maior aumento das concentrações de malato nessas células, que apresentaram grande aumento da razão malato/citrato. Essas alterações metabólicas são características de células transformadas (SULLIVAN et al., 2016). Citrato é necessário para a síntese de ácidos graxos e, diante da menor conversão de piruvato a acetil-CoA pela piruvato desidrogenase, sua concentração pode ser mantida pelo maior consumo de glutamina pela célula transformada. Como apresentado na **Figura 82**, glutamina pode servir como fonte alternativa de carbono para o ciclo de Krebs, alimentando a síntese de ácidos graxos via carboxilação redutiva, uma reação reversa da isocitrato desidrogenase que usa NADPH para reduzir α -cetoglutarato para citrato (ALTMAN et al., 2016). No caso das células expostas a B[a]P+NR observou-se maior aumento da concentração de glutamina e da razão glutamina/glutamato. O aumento da razão glutamina/glutamato se deve ao aumento das concentrações de glutamina, pois não houve alteração das concentrações de glutamato entre os grupos. O aumento da concentração intracelular de glutamina indica a ocorrência de aumento de sua captação pelas células ou ainda a diminuição de seu consumo por diferentes vias metabólicas importantes para a sobrevivência

celular, como a síntese de lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos (**Figura 82**). Pode-se esperar que a inibição do consumo de glutamina por células em processo de transformação resulte em prejuízo de sua sobrevivência.

A síntese de aspartato pode depender do fluxo de glutamina pelo ciclo de Krebs (**Figura 82**) e da transaminação de glutamato na matriz mitocondrial (**Figura 83**), e tem papel fundamental na síntese de purinas e pirimidinas (ALTMAN et al., 2016). Observamos que as células expostas a B[a]P+NR apresentaram menores concentrações de aspartato em comparação com as células expostas a B[a]P. Somente as células expostas a B[a]P apresentaram maiores concentrações de aspartato em relação ao controle. Tal fato indica que as células expostas a B[a]P sofrem modulação metabólica que leva ao aumento da síntese de aspartato e, na presença de NR, essa modulação é inibida. Além do seu papel na síntese de nucleotídeos, aspartato faz parte do *shuttle* malato-aspartato (**Figura 58**), de importância crucial para que os elétrons das moléculas de NADH geradas no citosol possam ser transportados para a matriz mitocondrial (na forma de malato), sendo transferidos para NAD^+ e gerando NADH na matriz mitocondrial, que pode então entrar na cadeia de transporte de elétrons para a produção de ATP (FRENCH, 2015). Células que apresentem seu metabolismo alterado de modo a dependerem mais do NADH gerado no citosol para obtenção de energia tornam-se dependentes da alta atividade do *shuttle* malato-aspartato para sobrevivência (KIM, 2018). As células expostas a B[a]P tiveram aumento das concentrações de malato e aspartato de modo que a razão malato/aspartato não se alterou em relação ao grupo controle. Enquanto isso, as células expostas a B[a]P+NR apresentaram aumento da razão malato/aspartato, em virtude do aumento das concentrações de malato não acompanhado de aumento das concentrações de aspartato. Essa alteração pode ser resultado tanto da inibição da conversão de glutamina para glutamato pela glutaminase, quanto da inibição da transaminase glutâmica oxaloacética (GOT2), que catalisa a transferência de nitrogênio GLS do glutamato para oxaloacetato, gerando aspartato na matriz mitocondrial, que pode ser transportado para o espaço intermembranas para completar o *shuttle* ou gerar outros aminoácidos (asparagina, argininosuccinato, arginina) e nucleotídeos no citosol (**Figura 58**). Glutamina ao entrar na célula via transportadores como o SLC1A5 indicado na **Figura 82**, é convertida a glutamato por GLSs mitocondriais. Glutamato pode ser convertido a α -cetoglutarato por dois mecanismos: catálise via glutamato desidrogenase (GLUD), que libera amônio e α -cetoglutarato, ou via aminotransferases (ex., GOT) que catalisam a transferência de nitrogênio do glutamato para

produção de α -cetoglutarato e outro aminoácido, como aspartato, sem liberação de amônio. A via utilizada depende da necessidade metabólica, biossintética e de redução de estresse da célula. GLUD pode ser ativada alostericamente por ADP e, portanto, em situação de estresse energético para restabelecer a produção de ATP. Por outro lado, células epiteliais mamárias em rápida divisão em cultura e células de câncer de mama humano apresentaram aumento da expressão de aminotransferases e diminuição da expressão de GLUD, o que favorece a síntese de precursores biossintéticos para o crescimento (ALTMAN et al., 2016).

Estudos transcriptômicos demonstram que o AhR pode atuar como fator de transcrição de genes envolvidos no metabolismo de glicose, lipídios e aminoácidos. Dentre esses genes estão MYC, HIF, PI3K/AKT e TP53 (HARDONNIÈRE et al., 2017). Nesse mesmo sentido, um estudo comprovou que a ativação de AhR aumentou a expressão de MYC em células de tumor gástrico expostas ao B[a]P. Além disso, a exposição a contaminantes ambientais pode acentuar a resposta de HIF em condições de hipóxia (BORTOLI et al., 2018). A ativação de AhR por B[a]P levou a alterações associadas com reprogramação metabólica em células epiteliais de fígado de rato (50 nM de B[a]P, 48 h), tendo sido a primeira demonstração de que B[a]P induz o efeito Warburg. A reprogramação metabólica foi associada à sobrevivência celular, alterações fenotípicas e migração (HARDONNIÈRE et al., 2016).

A reprogramação metabólica implica em obtenção de energia principalmente a partir de NADH gerado no citosol, enquanto o ciclo de Krebs fica mais voltado à síntese de precursores biossintéticos para favorecer o crescimento celular. Nessa situação, a inibição do *shuttle* malato-aspartato pode desencadear um estresse energético que direciona as células à morte.

Foi verificado que a inibição de glutaminase 1 (GLS1) foi muito efetiva na redução do crescimento de NSCLC e resultou em quase total regressão do crescimento de NSCLC em modelo animal de xenotransplante (KIM, 2018). O efeito foi atribuído à menor disponibilidade de glutamato para o *shuttle* malato-aspartato, com consequente estresse energético e morte celular (KIM, 2018). É interessante notar que células normais que utilizam o ciclo de Krebs para obtenção de energia não sofrem os efeitos tóxicos dessa inibição, o que pode ser altamente seletivo para células do câncer (KIM, 2018). Também foi demonstrado que a inibição de glutaminase protege contra a transição epitélio-mesenquimal necessária para invasão e metástase de tumores (ALTMAN et al., 2016).

No modelo de células BEAS-2B expostas a B[a]P e NR observamos a ocorrência de estresse energético exacerbado no grupo incubado com B[a]P+NR, assim como maior taxa de

entrada em apoptose dessas células. Células expostas somente a NR foram menos sensíveis aos efeitos tóxicos, havendo seletividade citotóxica da NR para as células expostas a B[a]P.

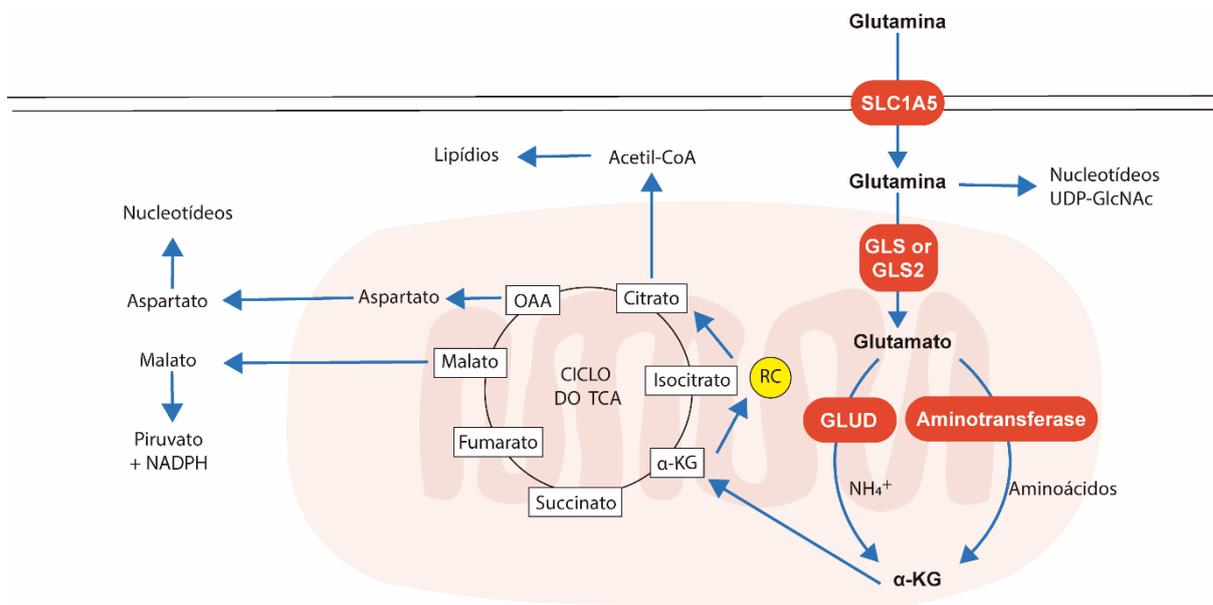


Figura 82. Destinos metabólicos da glutamina (Figura retirada de ALTMAN et al., 2016).

Chamou-nos também a atenção o fato de as células expostas a B[a]P+NR apresentarem as maiores concentrações de adenosina. Adenosina faz parte das estruturas de AMP, ADP, ATP, RNA, coenzimas como NAD e FAD (flavina adenina dinucleoídeo), mensageiros secundários como cAMP, e é um metabólito de vias bioquímicas como a via de transmetilação (BOISON, 2013). Condições de estresse levam ao aumento das concentrações de adenosina por meio da quebra dos nucleotídeos de adenina. Adenosina, por sua vez, exerce *feedback* negativo sobre a demanda metabólica das células, resultando em restabelecimento da homeostase energética. O aumento das concentrações de adenosina pode ocorrer por desfosforilação de AMP via 5'-nucleotidase ou por quebra de S-adenosil-homocisteína (SAH) via SAH-hidrolase na via de transmetilação (DNA metiltransferases, por exemplo, transferem o grupo metila de S-adenosilmetionina para citosina no DNA, liberando SAH que é quebrada para adenosina e homocisteína via SAH-hidrolase). As principais vias de remoção da adenosina são a sua desaminação para inosina via adenosina deaminase (alto K_m) ou a sua fosforilação para AMP via adenosina quinase (ADK, baixo K_m). Foi verificado que pequenas alterações na atividade de ADK resultam em grandes alterações das concentrações de adenosina. ADK atua como

sensor do estado energético e equilíbrio bioenergético da célula e como um gatilho determinando concentrações de adenosina para ajustar a demanda metabólica à energia disponível. Pode ser inibida por adenosina (μM), altas concentrações de AMP (acima de 5 mM), ADP e ativada por baixas concentrações de adenosina (25 – 300 nM), AMP em concentrações abaixo de 5 mM e MgATP, dentre outros fatores. A suplementação de células com adenosina tem efeito citotóxico. Células de câncer de mama humano (MCF-7) expostas a adenosina sofreram apoptose por via intracelular, independente da ativação de receptores de adenosina. Foi sugerido que o efeito citotóxico seja dependente da fosforilação da adenosina para AMP (via ADK) seguida da ativação da via apoptótica intrínseca/mitocondrial. Citotoxicidade da adenosina também foi verificada em células de câncer gástrico humano, com ativação da via apoptótica intrínseca pela ativação de AMPK (estudos revisados por BOISON, 2013). Verificamos em nossas análises a existência de correlação entre os níveis de adenosina e AMP nas células dos períodos de 96 a 168 h de incubação (**Figura 83**). As células expostas a B[a]P+NR são as que apresentaram maiores concentrações de AMP com o aumento das concentrações de adenosina (melhor correlação). Dentro dos grupos expostos a B[a]P ou NR observamos principalmente o aumento das concentrações de adenosina sem o correspondente aumento das concentrações de AMP. Quando os grupos B[a]P e NR são removidos da correlação, o valor de r passa para 0,7630.

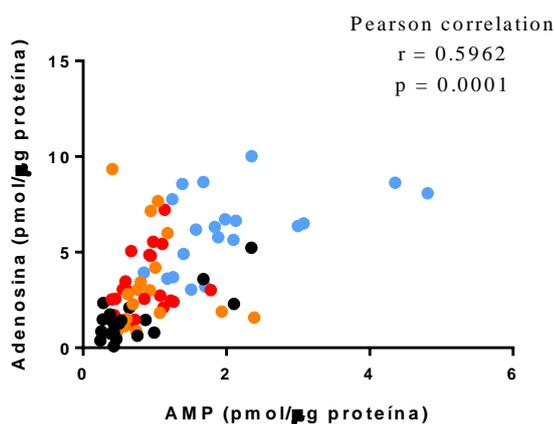


Figura 83. Correlação de Pearson entre concentrações de adenosina e AMP das células BEAS-2B expostas por 96, 120, 144 e 168 h a B[a]P (pontos vermelhos), B[a]P+ NR (pontos azuis), NR (pontos laranja) e grupo controle (pontos pretos).

É interessante notar que o aumento das concentrações de adenosina desloca a reação da SAH-hidrolase para a síntese de SAH, que é um potente inibidor de metiltransferases, incluindo DNA metiltransferases (BOISON, 2013). Nas análises das concentrações totais de 5-mC no DNA das células, verificamos reiteradamente que B[a]P induz hipermetilação do DNA, efeito não observado nas células expostas a B[a]P+NR, que foram as que apresentaram concentrações mais altas de adenosina. Há, portanto, a possibilidade da existência de uma relação entre os efeitos da NR no balanço energético das células expostas a B[a]P e a proteção contra a hipermetilação do DNA induzida por B[a]P.

Verificamos ainda que as células suplementadas com NR só apresentaram pequeno aumento das concentrações de NAD⁺ após 168 h de exposição. Essa observação pode ser explicada pelo fato de NAD⁺ participar de diversos processos intracelulares, sendo rapidamente consumido pelas células em fase de crescimento e proliferação. Após 168 h a demanda pode diminuir em virtude de as células entrarem na fase estacionária do crescimento. Observamos o mesmo para as concentrações de NADP⁺.

Por outro lado, no período de 120 a 168 h de exposição foram detectadas concentrações aumentadas de nicotinamida mononucleotídeo (NMN) no grupo B[a]P+NR e de nicotinamida nos grupos B[a]P e B[a]P+NR. Observamos a existência de correlação entre as concentrações de nicotinamida e NMN (**Figura 84**).

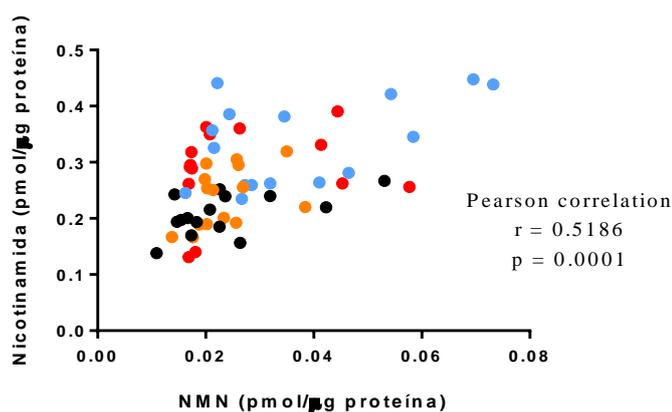
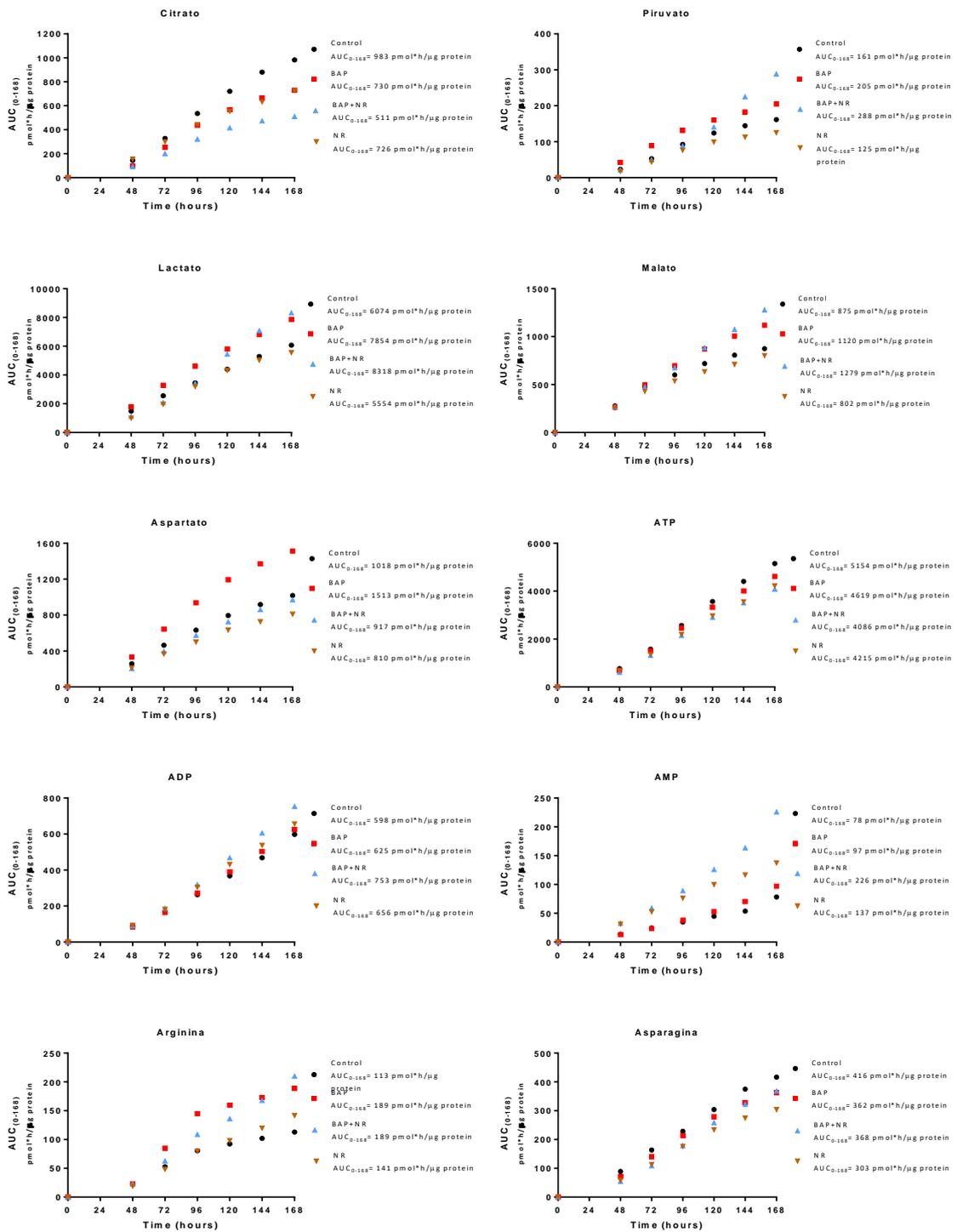
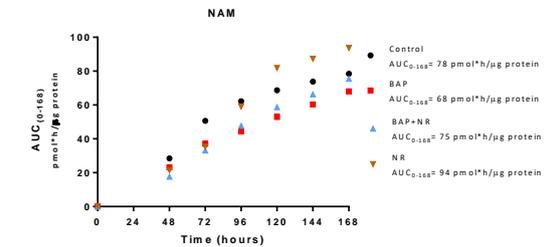
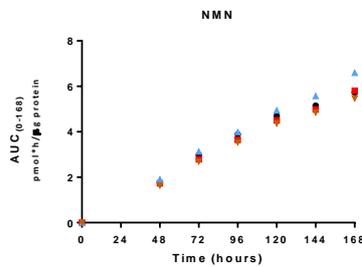
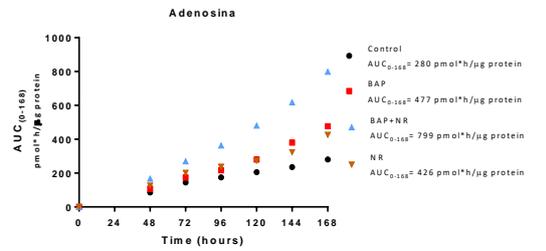
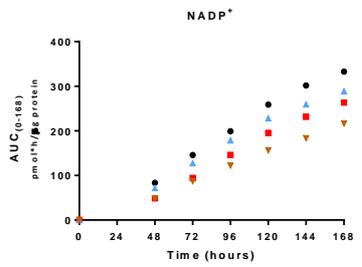
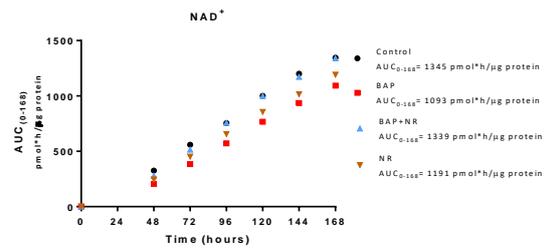
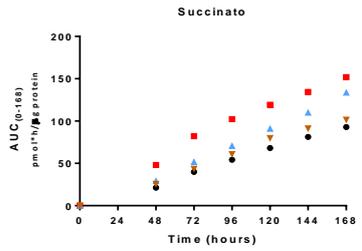
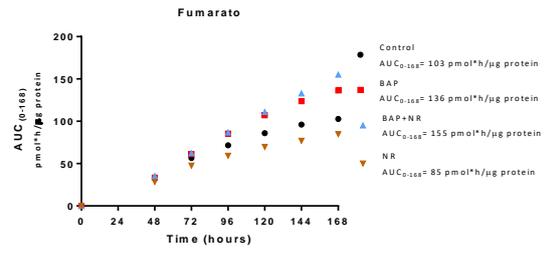
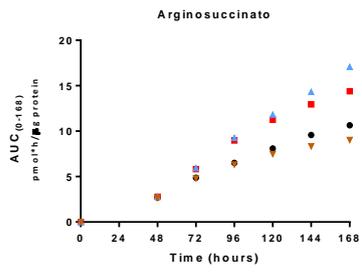


Figura 84. Correlação de Pearson entre concentrações de nicotinamida e nicotinamida mononucleotídeo (NMN) das células BEAS-2B expostas por 120, 144 e 168 h a B[a]P (pontos vermelhos), B[a]P+NR (pontos azuis), NR (pontos laranja) e grupo controle (pontos pretos).

Como apresentado na **Figura 7**, NMN é o produto direto da fosforilação de NR pela NR quinase. Assim, eram esperadas maiores concentrações de NMN nos grupos suplementados com NR, o que ocorreu somente para o grupo B[a]P+NR, possivelmente devido ao maior *turnover* concomitante de nicotinamida gerada nas reações que consomem NAD⁺. Nicotinamida é um dos produtos das reações catalisadas por PARPs, sirtuínas e cADPribose sintetases, sendo esperado seu aumento nos grupos expostos a B[a]P, o que foi observado.

Os dados das concentrações de metabólitos foram tratados para obtenção da AUC₍₀₋₁₆₈₎, conforme descrito no item 4.4.14 de Material e Métodos. Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 85** e evidenciam as diferenças apontadas nas análises mencionadas acima.





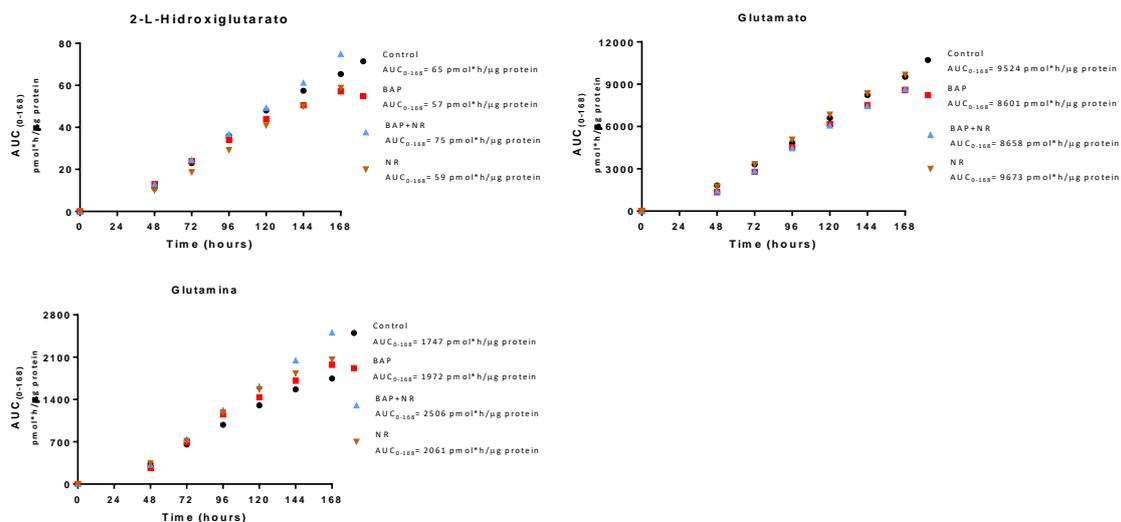


Figura 85. Área cumulativa sob a curva das moléculas quantificadas nas células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle ao longo de 168 h. Após obtenção da AUC₍₀₋₁₆₈₎ foi realizada análise estatística entre todos os grupos (controle *versus* B[a]P; controle *versus* B[a]P+NR; controle *versus* NR; B[a]P *versus* B[a]P+NR; B[a]P *versus* NR; B[a]P+NR *versus* NR) utilizando o *t test* pareado.

Os dados de AUC₍₀₋₁₆₈₎ evidenciam as alterações metabólicas observadas nas células expostas aos B[a]P e B[a]P+NR em relação ao dados do grupo controle e NR. A potencialização dos efeitos no metabolismo celular nas células expostas B[a]P+NR também fica evidente.

Os dados obtidos por meio de análise estatística (*t teste*) reafirmam que existem alterações metabólicas durante todo o período de incubações nas células incubadas com B[a]P, B[a]P+NR, NR em relação ao grupo controle. Além disso, para todas as análises comparativas foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$, exeto na comparação entre B[a]P *versus* B[a]P+NR para as concentrações de NAD⁺), o que reforça que as diferentes incubações modulam a produção e/ou consumo desses intermediários celulares.

Estudos de metabolômica de câncer de pulmão publicados no período de 2009 a 2018 foram recentemente revisados (TANG et al., 2019). Nesses estudos, observou-se que o perfil de análise metabólica de indivíduos com câncer de pulmão apresenta alterações significativas em relação a indivíduos saudáveis, e o perfil desses metabólitos também foi relacionado ao estágio de desenvolvimento do tumor. Foram identificados 213 potenciais biomarcadores, distribuídos entre diversas vias metabólicas. Dentre as vias identificadas, três foram selecionadas para um maior detalhamento, em virtude do impacto na análise realizada:

biossíntese de valina, leucina e isoleucina, metabolismo de glicina, serina e treonina, e metabolismo de alanina, aspartato e glutamato (via de maior impacto na análise topológica feita no MetaboAnalyst) (TANG et al., 2019). Dentre os metabólitos na via do metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, foi verificado em diferentes estudos que aspartato, glutamina, glutamato, alanina e piruvato ocorrem em concentrações aumentadas em diferentes matrizes biológicas de pacientes com câncer de pulmão em comparação ao controle (TANG et al., 2019).

5.11. Quantificação de proteínas totais

Para quantificar as proteínas totais das células BEAS-2B, após os períodos de exposição, utilizamos o método de Bradford, como descrito em 4.4.18 de Material e Métodos. Os resultados são apresentados na **Figura 86**. Observa-se que as quantidades de proteínas a partir de 72 h de incubação com B[a]P atingem o platô. Paralelamente, observa-se que nas células incubadas com B[a]P+NR existe redução da quantidade de proteínas totais ao longo do tempo. Esses dados reforçam que existe redução do número de células na co-suplementação. No entanto, as quantidades de proteínas do grupo NR apresentam-se bem semelhantes ao grupo controle. Esses dados condizem com os obtidos nos ensaios do cristal violeta (**Figura 19**).

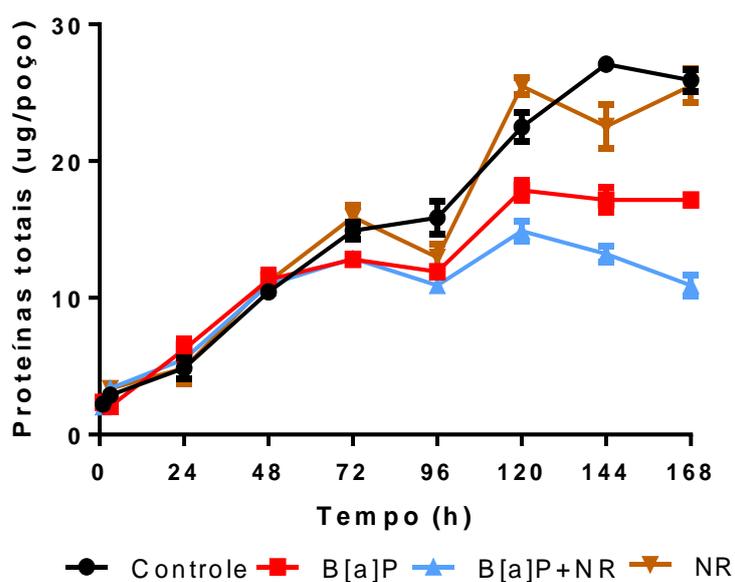


Figura 86. Proteínas totais de células BEAS-2B ao longo das 168 h de incubações com B[a]P (1 μ M), B[a]P (1 μ M) + NR (1 μ M), NR (1 μ M) e do grupo controle. As análises foram feitas em intervalos de 24 h durante 7 dias, utilizando o método de Bradford. Os resultados representam a média \pm erro padrão de quintuplicata experimental.

5.12. Análise da lipoperoxidação

A quantificação de MDA em sistemas biológicos é um importante parâmetro para avaliar o estresse redox (ANTUNES et al., 2008). Assim, foi realizada a quantificação de MDA no meio de crescimento das células após 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h das incubações. A quantificação de MDA foi feita por HPLC-DAD após reação de derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina como descrito em 4.4.17 de Material e Métodos. Foi observada indução de lipoperoxidação nas células expostas a B[a]P (aumento das concentrações de MDA no meio de cultura) e proteção contra a geração de MDA nas células expostas a B[a]P+NR para o período de 72 a 120 h de exposição (**Figura 87**). A proteção contra a lipoperoxidação ocorreu apesar de todas as alterações metabólicas, estresse energético e morte celular induzidos nas células expostas a B[a]P+NR.

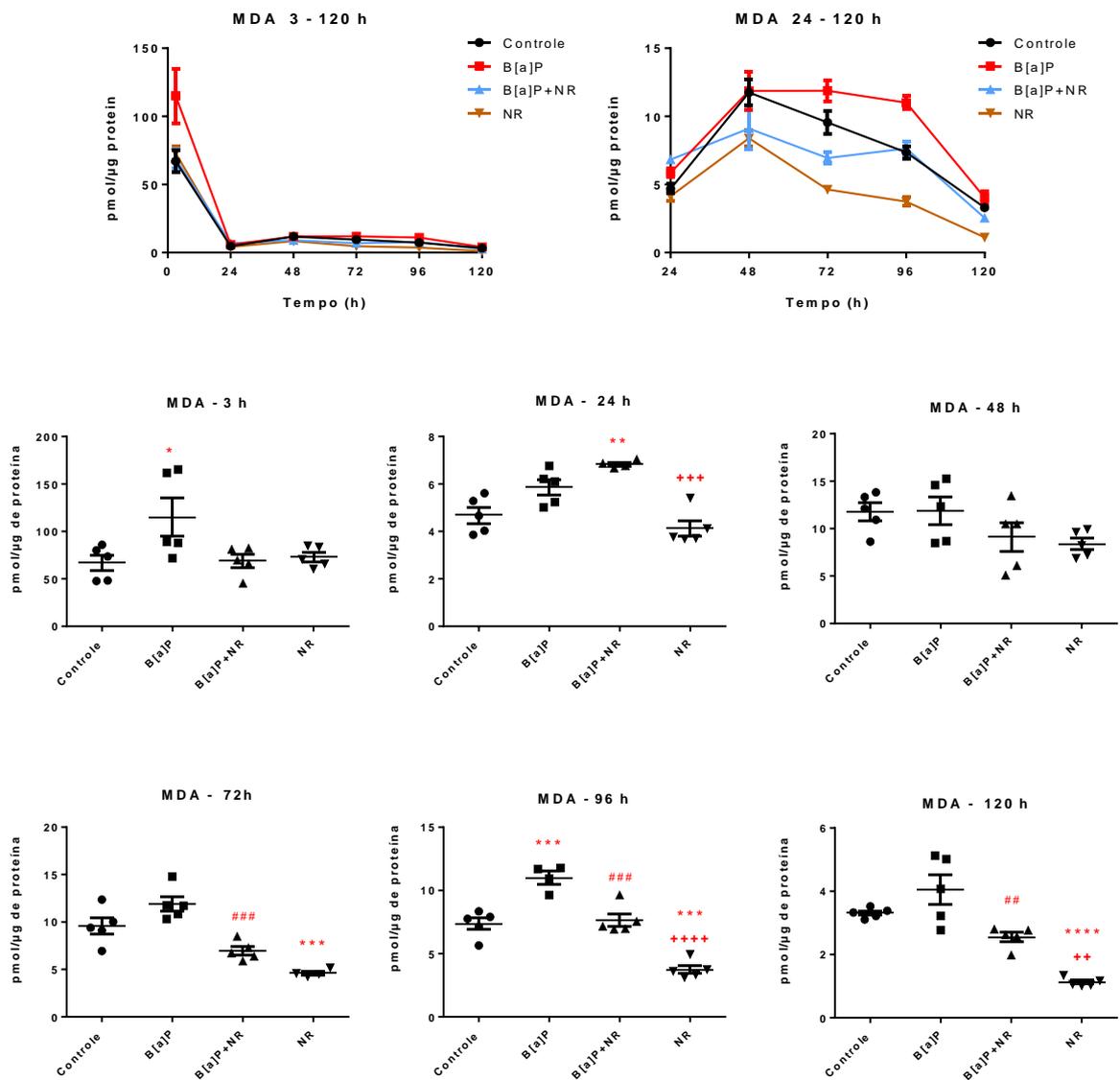


Figura 87. Concentrações de malonaldeído no meio de crescimento das células BEAS-2B expostas por 3, 24, 48, 72, 96 e 120 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. Os resultados

representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++; $p < 0,001$, +++; $p < 0,0001$, ++++). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas.

Os dados das concentrações de MDA no meio de cultura foram tratados para obtenção da área cumulativa sob a curva ($AUC_{(0-120)}$) conforme descrito em 4.4.14 de material e métodos. Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 88** e evidenciam as diferenças de lipoperoxidação apontadas nas análises descritas acima.

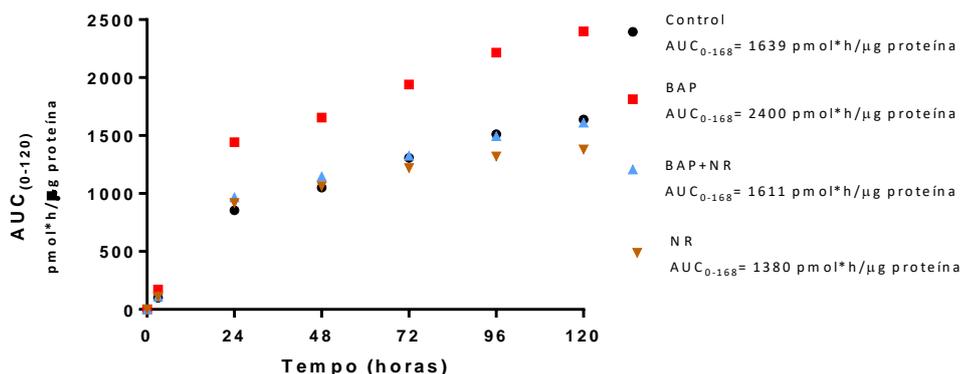


Figura 88. $AUC_{(0-120)}$ de MDA nas células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle ao longo de 120 h. Após obtenção da $AUC_{(0-120)}$ foi realizada análise estatística entre todos os grupos (controle *versus* B[a]P; controle *versus* B[a]P+NR; controle *versus* NR; B[a]P *versus* B[a]P+NR; B[a]P *versus* NR; B[a]P+NR *versus* NR) utilizando o *t test* pareado.

A produção de ROS está intimamente ligada a diferentes efeitos biológicos, e em condições de desbalanço entre a geração de ROS e o sistema antioxidante é observada indução de estresse redox. Na exposição de camundongos ao B[a]P (20 e 40 mg/kg), 1 vez por semana, durante 8 semanas, foi observado aumento significativo das concentrações de MDA, com concomitante diminuição das concentrações de glutathiona (GSH) e glutathiona-S-transferase (GST) em homogenato de fígado. O aumento das concentrações de MDA é utilizado como indicativo de sérios danos a membranas celulares e inibição de várias enzimas e funções celulares.

Nesse mesmo estudo foram observadas alterações hematológicas, como linfocitose no início do experimento, seguida de leucopenia, linfopenia e neutropenia ao término do estudo. A α -feto-proteína foi usada como biomarcador de transformação maligna, e suas concentrações aumentaram nos animais expostos a B[a]P em comparação ao grupo controle (HEGAZY et al., 2012).

Células de tecido cervical de camundongos fêmeas expostas ao B[a]P (dose única de 12,5 e 25 mg/kg) também apresentaram aumento do estresse redox por meio da análise de MDA, ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e enzimas antioxidantes. O conteúdo de MDA, GSH, atividade de SOD, catalase, glutathione peroxidase (GPx) e GST aumentaram significativamente no colo do útero após 24, 48 e 72 h de exposição ao B[a]P (GAO et al., 2011).

No estudo *in vitro* utilizando células BEAS-2B expostas por 24 h a B[a]P (5 μ M), nanopartículas de sílica (SiNPs, 5 μ M) e B[a]P+SiNPs, foi observado aumento significativo das concentrações de MDA. Por outro lado, as atividades de SOD e GSH-Px diminuíram significativamente após a exposição isolada e a co-exposição a SiNP e B[a]P. Além disso, foi observada parada do ciclo celular e aumento da população de células em G2/M. Concomitantemente foi observado aumento da multinucleação e da fragmentação de DNA por meio do ensaio cometa nas células expostas ao B[a]P e em co-exposição a SiNP. Esses resultados demonstram sincronia entre a perturbação no estado redox, processo de fragmentação do DNA e ativação dos mecanismos de apoptose nas diferentes exposições (WU et al., 2016).

Os dados aqui obtidos são condizentes com os descritos em diversos outros trabalhos, onde a exposição de células ao B[a]P causa elevação das concentrações de aldeídos oriundos do processo de peroxidação lipídica, paralelamente ao aumento da formação de ROS e de adutos de DNA (GAO et al., 2011; HEGAZY et al., 2012; WU et al., 2016). Além disso, observamos inibição de crescimento, parada de ciclo celular e morte por apoptose das células expostas a B[a]P e B[a]P+NR. No entanto, diferentemente de outros estudos, maior indução de morte foi observada nas células expostas a B[a]P+NR, que não apresentaram as maiores concentrações de MDA.

5.13. Atividade de PARP1

A atividade de enzimas dependentes de NAD^+ pode variar em função das condições metabólicas das células e do estresse genotóxico causado por diversos xenobióticos. A ativação de mecanismos de reparo envolve vários processos de sinalização, incluindo as reações de ADPribosilação catalizadas pelas PARPs. PARP1, como descrito anteriormente, é um dos componentes da via BER (TAO et al., 2009). Neste sentido, avaliamos a atividade da enzima nas incubações com B[a]P, B[a]P+NR, NR e células controle nos períodos de 120 e 168 h, conforme descrito no item 4.4.16 de Material e Métodos.

Observamos que B[a]P aumentou a atividade enzimática de PARP1 em 120 e 168 h de exposição, quando comparada ao grupo controle (**Figura 89**). A exposição das células BEAS-2B a B[a]P+NR também aumentou a atividade da enzima em 120 e 168 h, sendo que o aumento foi maior do que nas células expostas a B[a]P em 168 h. As células incubadas somente com NR não apresentaram diferenças significativas na atividade de PARP1 em relação ao grupo controle. Esses resultados mostram que a suplementação com NR aumenta a atividade de PARP1 em condições de estresse.

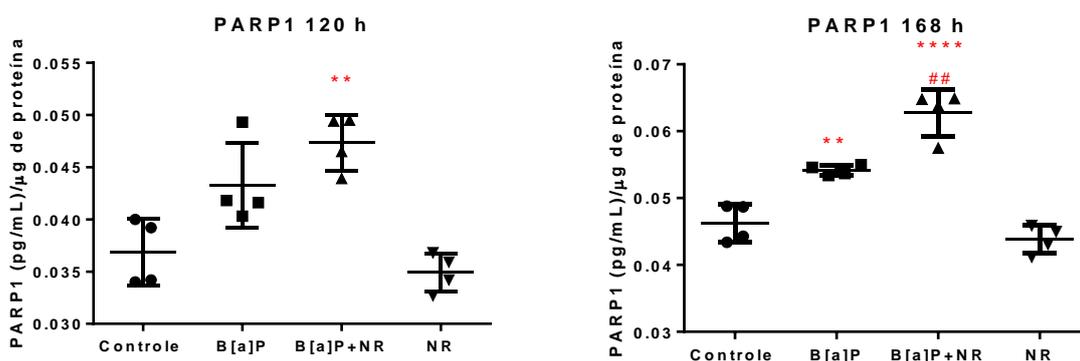


Figura 89. Atividade de PARP1 em células BEAS-2B expostas por 120 e 168 h a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata experimental. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####).

A formação de adutos BPDE-DNA é entendida como um dos primeiros eventos no processo de iniciação de tumores causados pelo B[a]P. Além disso, os efeitos tóxicos em células alvos também podem ser originados do estresse redox resultante do processo de biotransformação do B[a]P, que aumenta a geração de ROS como, por exemplo, $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Todos esses processos contribuem para instabilidade genômica e desempenham importante papel na carcinogênese pulmonar induzida por B[a]P (ZHU et al., 2014).

O ciclo celular apresenta pontos de regulação (os denominados *checkpoints*) que atuam regulando a progressão do ciclo. Pontos de regulação na fase G1/S impedem a replicação do DNA danificado, enquanto pontos de regulação em G2/M inibem a segregação dos cromossomos durante a mitose. Da mesma forma que enzimas de fase I e de fase II são ativadas pelo B[a]P, alguns alvos moleculares como p53, survivina e PARPs também são ativados pelo estresse redox e genotóxico causado pelo carcinógeno (ZHU et al., 2014).

As proteínas PARPs atuam em diversos processos de sinalização, incluindo replicação e reparo de danos ao DNA, diferenciação celular, expressão gênica e apoptose. Em função disso, PARPs são alvos de estudos para tratamento de tumores (ZHU et al., 2014).

A exposição de células BEAS-2B a B[a]P (5 μ M por 24 h) causou parada de ciclo celular e indução de estresse redox. Paralelamente, as concentrações de PARP1 e p-p53 (forma ativa de p53) aumentaram significativamente, sendo que o aumento da expressão enzimática foi

acentuado quando as células foram suplementadas concomitantemente com curcumina e vitamina E (vit E). O co-tratamento das células BEAS-2B com curcumina e vit E também reduziu a geração de ROS e a expressão de CYP1A1 e CYP1B1, além da concentração de adutos BPDE-DNA. Houve restauração das concentrações de survivina nas coincubações e a proporção BAX/Bcl-2 foi normalizada nos co-tratamentos com vit E. Esse conjunto de informações evidencia a relação entre a citotoxicidade induzida por B[a]P e a indução de danos ao DNA, parada do ciclo celular, formação de ROS, modulação de enzimas metabolizadoras e expressão/ativação de p53, PARP1, survivina e BAX/Bcl-2. Nesse contexto, a suplementação com curcumina e vit E foi eficaz contra os efeitos adversos de B[a]P nas células pulmonares (ZHU et al., 2014).

A exposição a B[a]P (10 μ M, 48 h) causou morte celular por necrose precedida de ativação de PARP, depleção de NAD⁺, e subsequente esgotamento de ATP em células HEPG2 (Lin e Yang, 2008). A incubação das células HEPG2 com altas concentrações de NAD⁺ (5 mM) após a exposição a B[a]P elevou as concentrações intracelulares de NAD⁺ e impediu a morte celular. Além disso, a adição de piruvato (5 mM) conseguiu restaurar a produção de ATP e impedir a morte. No entanto, este mesmo efeito não foi observado na suplementação das células com glutamato (5 mM) e glutamina (5 mM). Esses resultados elucidam o envolvimento de alterações metabólicas na morte induzida por B[a]P (LIN; YANG, 2008).

O papel de PARP1 na estabilidade genômica foi demonstrado em camundongos e em linhagens de células deficientes de PARP1, o que levou a respostas anormais a agentes genotóxicos. Também foi demonstrado que PARP1 é fator de sobrevivência após o estresse genotóxico e de ativação da via de BER (TAO et al., 2009). A deficiência de PARP1 (usando o shRNA) em células de epitélio brônquico humano (16HBE) expostas a B[a]P (1, 15 e 30 μ M, 24 h) afetou a eficiência do reparo e as concentrações de lesões no DNA. Como esperado, as células shPARP1 foram mais sensíveis aos danos de DNA induzidos pelo B[a]P. Além disso, as porcentagens relativas de reparo foram inferiores nas células deficientes em PARP1 (TAO et al., 2009).

A exposição de células HeLa ao metabólito ativo do B[a]P (BPDE, 0,01 - 10 μ M) induziu aumento da formação de polímeros de ADPribose e diminuição das concentrações de NAD⁺ de maneira dose e tempo dependente. Paralelamente, foi observado que o silenciamento de PARP normalizou as concentrações de NAD⁺, mas induziu maior estresse genotóxico nesse grupo de células. Concomitantemente, foram observadas alterações na fase S e G2/M do ciclo

celular. Juntos esses resultados apontam que lesões não removidas de BPDE-DNA desencadeiam estresse replicativo. Adicionalmente, a exposição de células deficientes em PARP ao BPDE causou quebras de dupla fita. Essas análises foram realizadas em estudos microscópicos de colocalização utilizando marcação com 53BP1 (do inglês *p53-binding protein 1*) e da forma fosforilada da histona H2AX (λ -H2AX) (FISCHER et al., 2018).

5.14. Análises de expressão gênica

Procurando entender se a exposição das células BEAS-2B ao B[a]P na presença e ausência de NR poderia levar a alterações na atividade de proteínas sensíveis ao balanço NAD^+/NADH , avaliamos indiretamente a atividade da proteína CtBP por meio da análise da expressão de genes cujas transcrições são inibidas por CtBP.

Foram quantificadas as expressões dos genes *CDH1* (codifica E-caderina), *CDKN2A* (codifica p16(ink4a)), *PTEN* (codifica PTEN) e *SEMA3F* (codifica semaforina 3F) após 48, 120 e 168 h de exposição a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle (item 4.4.19 de Material e Métodos). Verificamos que após 120 h e 168 h (**Figuras 90 a 94**) houve aumento significativo da expressão de E-caderina, PTEN, semaforina 3F e p16(ink4a) no grupo B[a]P+NR em comparação aos outros grupos. Esses genes são importantes supressores tumorais, e essa observação está de acordo com a proteção observada contra a transformação induzida por B[a]P.

De modo geral o maior aumento da expressão dos genes supressores tumorais descritos acima nas células expostas a B[a]P+NR nos indica a possibilidade de ocorrência de uma resposta via diminuição da atividade de CtBP no contexto de alterações metabólicas e estresse energético desencadeado nesse grupo de exposição. Na **Figura 90** é apresentada uma visão

geral da modulação da expressão gênica nas diferentes incubações e o detalhamento da expressão de cada gene com as respectivas análises estatísticas são apresentados nas **Figuras 91 a 94**.

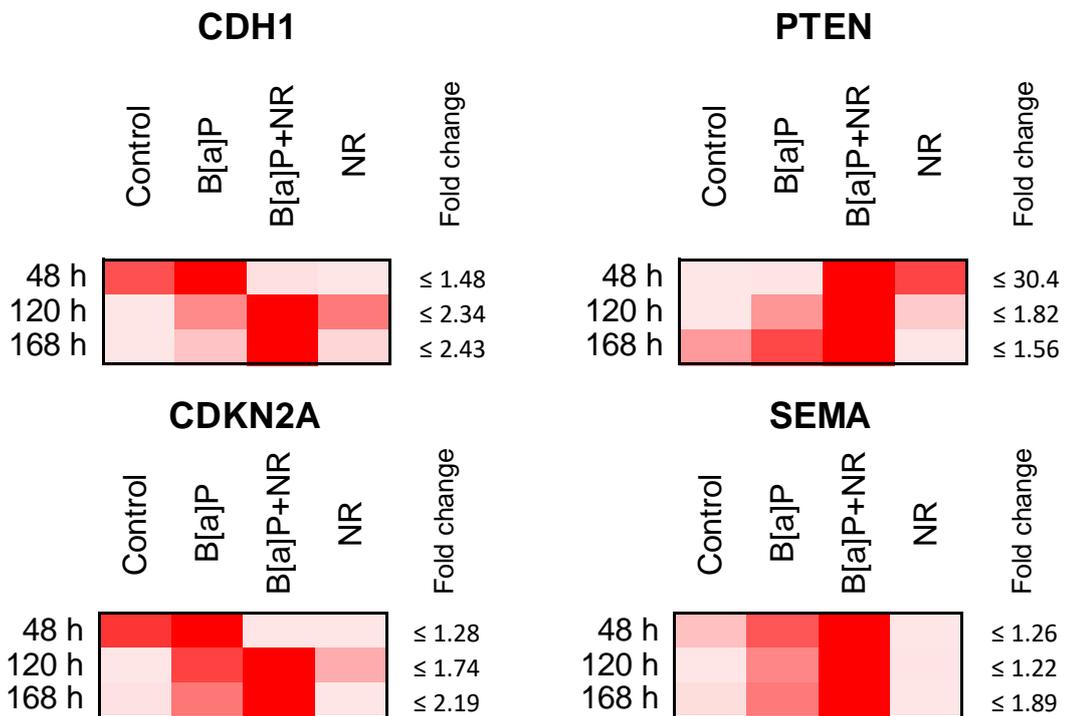


Figura 90. Visão geral das expressões de genes regulados pelo correpressor transcricional CtBP nas células BEAS-2B expostas por 48, 120 e 168 h a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle. São apresentadas as médias ao longo do tempo. As maiores expressões gênicas em cada linha são apresentadas na cor vermelha intensa.

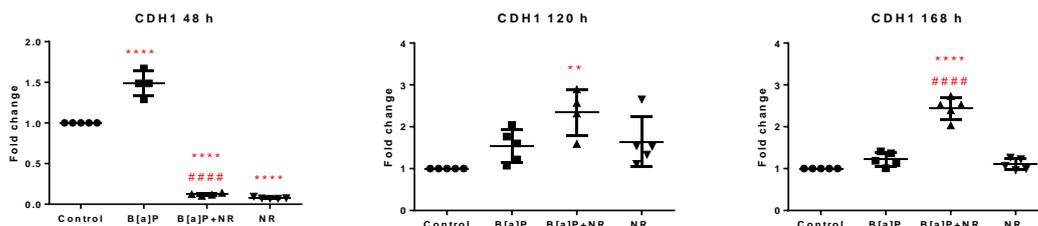


Figura 91. Expressão gênica de *CDHI* (E-caderina) nas células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle por 48, 120 e 168 h. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental, onde a expressão relativa de mRNA foi obtida por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene normalizador a β -actina. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas.

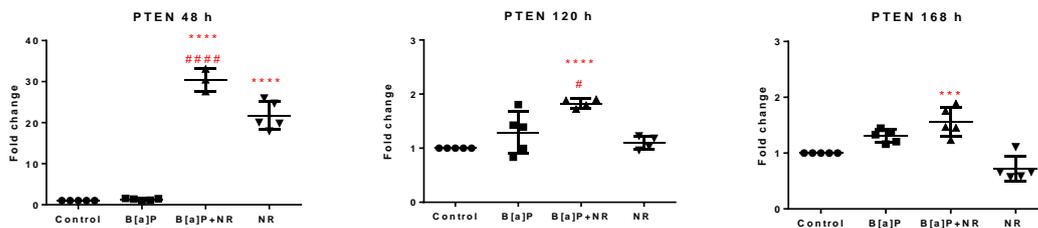


Figura 92. Expressão gênica da fosfatase PTEN nas células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle por 48, 120 e 168 h. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental, onde a expressão relativa de mRNA foi obtida por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene normalizador a β -actina. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas.

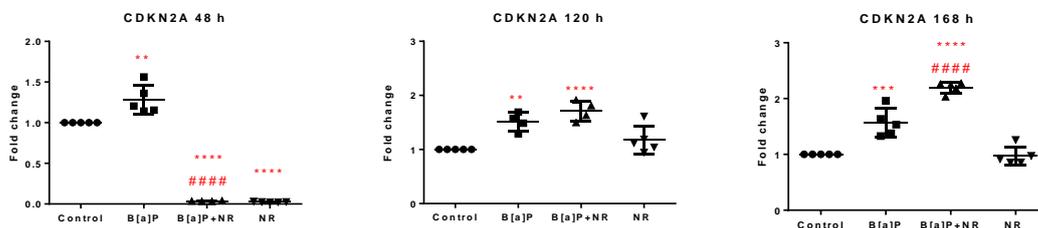


Figura 93. Expressão gênica de *CDKN2A* [p16(ink4a)] nas células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle por 48, 120 e 168 h. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental, onde a expressão relativa de mRNA foi obtida por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene normalizador a β -actina. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p <$

0,01, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas.

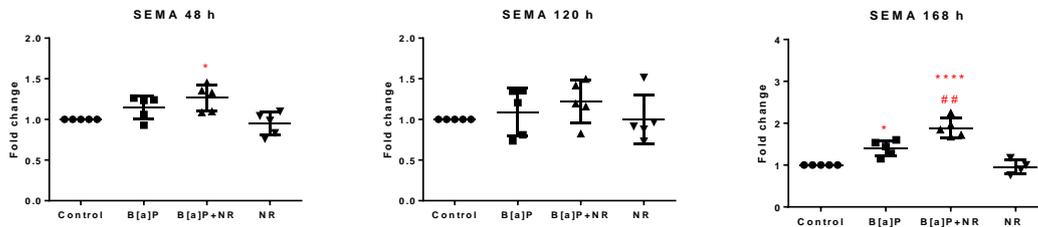


Figura 94. Expressão gênica de semaforina 3F nas células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle por 48, 120 e 168 h. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e ou quintuplicata experimental, onde a expressão relativa de mRNA foi obtida por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene normalizador a β -actina. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas.

O desenvolvimento de carcinoma geralmente envolve a EMT e aquisição de resistência a apoptose. EMT é um processo onde células epiteliais adquirem características de células mesenquimais, como motilidade que propicia migração e invasão. A transição decorre de alterações de expressões gênicas, como perda de expressão de genes específicos de células epiteliais e ganho de expressão de genes de células mesenquimais. Sabe-se, portanto que a EMT é um importante evento que controla o desenvolvimento e a progressão de tumores (CHEN et al., 2017). Neste sentido, o mecanismo de regulação negativa de genes epiteliais (E-caderina) durante a EMT tem sido foco de estudos. Observou-se que três tipos de repressores (ZEB1, ZEB2 e E2A) têm sido implicados na repressão de células mesenquimais e de certos carcinomas. Células *knockout* para CtBP foram hipersensíveis a apoptose, e muitos genes epiteliais e pro-apoptóticos foram reprimidos pela reexpressão de CtPB. A análise por microarray (combinada a RT-PCR e *Western blot*) de fibroblastos embrionários de camundongos *knockout* para CtBP sofreram de fato regulação positiva para genes epiteliais (E-caderina) e pró-apoptóticos como PERP (do inglês, *p53-effector related to pmp-22*), PUMA

(do inglês, *p53 upregulated modulator apoptosis*), p21, PTEN, IGF-BPs, NOXA, BAX, p73, todos regulados por p53. Estes resultados sugerem que CTBP coordena a expressão de genes epiteliais e pró-apoptóticos, contribuindo potencialmente para a EMT e malignidade (GROOTECLAES et al., 2003).

A carcinogênese pulmonar induzida pelo B[a]P envolve vários processos celulares, incluindo a EMT (CHEN et al., 2017). O fator 1 de transcrição BHLH da família Twist (Twist1) é essencial para o processo de diferenciação embrionária durante condições fisiológicas. Alterações na expressão de Twist1 são associadas ao surgimento de diversos tipos de tumores, incluindo câncer de pulmão, tumores gástricos, próstata, cólon retal e câncer de mama. Twist1 também pode induzir EMT. A inibição da expressão de Twist1 em células de câncer de pulmão inibiu a proliferação celular, metástase, ativou a senescência e suprimiu o processo de EMT. Células de adenocarcinoma de pulmão (A549) expostas a B[a]P (1 µM, por 24, 48 e 72 h; 1, 2 e 4 semanas) apresentaram aumento na migração de modo tempo dependente. Concomitantemente foi observado que B[a]P induziu regulação positiva de marcadores mesenquimais (N-caderina e vimentina) e regulação negativa de marcadores epiteliais (E-caderina). O *knockout* de Twist1 nas células expostas por 4 semanas a B[a]P reduziu a expressão de N-caderina e vimentina e aumentou a expressão de E-caderina. Morfologicamente as células apresentaram características epiteliais após o silenciamento de Twist1. Esses resultados mostraram que B[a]P induz EMT de células A549 por meio da regulação de Twist1 (CHEN et al., 2017).

As semaforinas são uma família de proteínas que apresentam ampla distribuição celular e são subclassificadas de acordo com a sua localização, incluindo proteínas transmembrana (tipo 1, 4, 5 e 6), proteínas secretoras (tipo 2 e 3) e proteínas ancoradas a glicofosfatidilinositol (tipo 7). No processo de transformação celular foi observada redução da expressão de SEMA3F em diversos tipos de tumores. A atividade antiproliferativa e antiangiogênica de SEMA3F é resultado da interação com neurofilina 1 e 2, e pode ser regulada por alterações epigenéticas. O papel de SEMA3F foi relatado em câncer de mama e cólon retal. É enfatizado que a diminuição da atividade de SEMA3A, SEMA3B e SEMA3F é um marcador de mal prognóstico de sobrevivência em pacientes. A expressão de SEMA3F também foi monitorada em um estudo piloto de câncer de endométrio, tendo sido observada redução na expressão da proteína nos tecidos tumorais em relação a tecidos saudáveis. Nesse contexto, é observado que em muitas doenças

neoplásicas existe redução da expressão de SEMA3F, o que se traduz em aumento proliferativo e pró-angiogênico (DZIOBEK et al., 2019).

CDKN2 codifica a proteína p16(INK4) que é um supressor tumoral que desempenha importante papel na via do retinoblastoma (RB1). p16 atua inibindo as quinase dependente de ciclina (CDKs), portanto, sua função é desacelerar o ciclo celular, por meio da inativação de CDK4 e CDK6 e da interação com a ciclina D1. Na ausência de p16, a ciclina D1 forma um complexo com CDKs 4 e 6, que é inativa a proteína do retinoblastoma (pRb). No estado hipofosforilado, a pRb impede a progressão do ciclo celular ao formar um complexo com o fator de transcrição E2F. No entanto, quando fosforilada, ocorre a dissociação do complexo, resultando na inativação de genes alvos de E2F, promovendo a progressão do ciclo celular. O aumento de P16 causa inativação do complexo ciclina D1/CDK4/6 e bloqueio da progressão do ciclo celular (LOBATO, 2011). Tem se observado que a desregulação de CDK4/6 e perda de p16 leva a aumento da proliferação e resulta em desenvolvimento de tumores (HAZRA et al., 2004). A inativação de p16 foi relatada em até 63% dos casos de NSCLCs, sendo um dos genes mais frequentemente alterados nessa doença (SANCHEZ-CESPEDES et al., 2001).

PTEN (do inglês, *phosphatase tensin homolog*) é uma proteína tirosina fosfatase envolvida no crescimento celular, apoptose, progressão do ciclo celular, motilidade e diferenciação. Mutações, inativação e diminuição da expressão de PTEN foram identificadas em diversos tipos de neoplasias, incluindo o câncer de pulmão, tumores renais, hepatocelulares e ameloblastomas. Os carcinomas de pulmão apresentam uma expressão diminuída da proteína PTEN (LIU et al., 2010).

PTEN é o gene mais frequentemente mutado após o gene TP53. A via PI3K/AKT é a principal via em que PTEN exerce sua função antioncogênica. PTEN codifica uma proteína que desfosforila PIP3 para PIP2, impedindo assim a sinalização via PI3K/AKT. Como resultado da atividade de PTEN observa-se parada do ciclo celular em G1 e indução de apoptose. Diversos genes têm sido associados à formação de tumores, incluindo a fosfatase PTEN e hTERT (do inglês, *human telomerase reverse transcriptase*). A superexpressão de PTEN em células de adenocarcinoma de pulmão inibiu profundamente o crescimento, promoveu apoptose, causou parada do ciclo celular em G1. Efeitos opostos foram observados utilizando o siRNA, além de um aumento de AKT e da proteína hTERT (LU et al., 2016).

As expressões gênicas de nicotinamida fosforribosiltransferase e nicotinamida ribosídeo quinase sofreram alterações após diferentes períodos de exposição a B[a]P, B[a]P+NR e NR

(Figura 95 e Figura 96). Nas primeiras 48 h foi detectado aumento de expressão dos genes de ambas as enzimas nos grupos B[a]P+NR e NR. Esses dados mostram que existe uma resposta inicial à maior disponibilidade de NR nesses grupos de exposição.

A expressão gênica de NRK1 permaneceu aumentada em 48, 120 e 168 h de exposição a B[a]P+NR, sendo inclusive maior do que a observada para os grupos B[a]P e NR. Quanto à expressão gênica de NAMPT, apesar de ter sido detectado aumento em 48 h nas células expostas a B[a]P+NR e NR, foi observada normalização em 120 e 168 h.

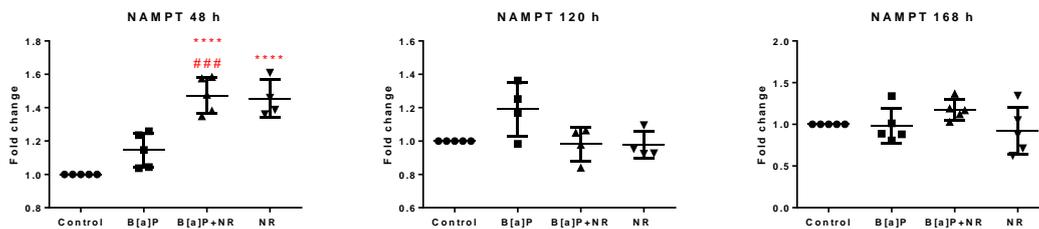


Figura 95. Expressão gênica de NAMPT nas células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle por 48, 120 e 168 h. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata e/ou quintuplicata experimental, onde a expressão relativa de mRNA foi obtida por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene normalizador a β -actina. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas.

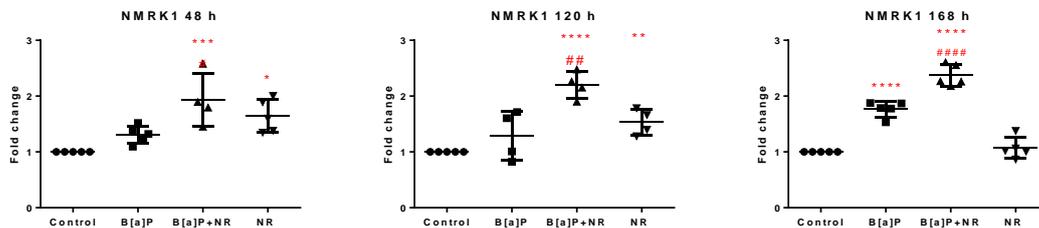


Figura 96. Expressão gênica de NMRK1 (NRK1) nas células expostas a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle por 48, 120 e 168 h. Os resultados representam a média \pm erro padrão de uma quadruplicata experimental, onde a expressão relativa de mRNA foi obtida por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo o gene normalizador a β -actina. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus*

B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####). Para cada replicata experimental foram feitas três replicatas técnicas.

Como descrito anteriormente a manutenção de concentrações estáveis de NAD^+ nas células é possível devido à existência de vias de salvamento da nicotinamida, sendo redirecionada para síntese de NAD^+ , e devido à existência de vias de biossíntese de NAD^+ a partir precursores presentes na dieta (STEIN; IMAI, 2012; VERDIN, 2015).

NAMPT catalisa a primeira reação que converte NAM em NMN, um intermediário chave para biossíntese de NAD^+ . A expressão e atividade de NAMPT são reguladas pelas concentrações intracelulares de NAD^+ . NAMPT é uma fosforribosiltransferase do tipo II, que é altamente conservada e expressa em quase todos os tecidos e células, sugerindo um papel vital para a função normal das células. NAMPT possui isoformas citosólicas e nucleares e tem papel vital na manutenção intracelular de NAD^+ e homeostase energética. A deficiência de vitamina B3 (niacina - ácido nicotínico, NAM e NR fazem parte desse grupo) e triptofano leva à doença denominada pelagra. Evidências crescentes mostram que alterações na geração e consumo de NAD^+ são comuns a diversas doenças (YACU et al., 2018).

NAMPT atraiu interesse significativo não apenas na bioquímica, mas em outras áreas, como metabolismo, sistema imune e câncer (GARTEN et al., 2009). Vários estudos demonstram que a superexpressão de NAMPT contribui para o desenvolvimento de tumores, tornando NAMPT um potencial alvo para o tratamento de tumores (YACU et al., 2018). O aumento da expressão de NAMPT foi relatado em câncer colorretal e associado a aumento da angiogênese, ativando ERK 1/2 (do inglês, *extracellular signal regulated kinase*) via indução de VEGFR e produção de MMP 2/9. Além disso, NAMPT induziu a proliferação e formação de tubos capilares de células endoteliais de veia umbilical (HUVECs) de modo dose e tempo dependente (YACU et al., 2018).

A inibição farmacológica de NAMPT usando o inibidor Daporinad (também denominado FK-866) resultou em depleção de NAD^+ , sendo que células que dependem predominantemente dessa via de síntese de NAD^+ podem entrar em apoptose (Yacu et al., 2018). FK-866 demonstrou efeitos anti-metastáticos e anti-angiogênicos em modelo de células de carcinoma renal. Além disso, em modelo de carcinoma mamário de camundongos, o inibidor também causou atraso no crescimento do tumor e aumento da radiosensibilidade. Essas alterações foram acompanhadas da redução das concentrações de NAD^+ , pH e metabolismo

energético (GARTEN et al., 2009). Estudos clínicos de fase I sugerem que o medicamento tem boa tolerância e pode ser uma importante abordagem para o tratamento de SCLC (DESAUTELS et al., 2015).

Foram avaliados os efeitos de FK-866 na glicólise, via das pentoses-fosfato, ciclo de Krebs e biossíntese de serina em células de câncer de ovário (A2780) e células de câncer colorretal (HCT116). Ficou evidenciado que a inibição de NAMPT causa atenuação da glicólise no passo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, devido à redução da disponibilidade de NAD^+ para a enzima. O bloqueio da glicólise causou acúmulo de intermediários da via glicolítica, promovendo o aumento de intermediários da via das pentoses fosfato. A atenuação da glicólise também afetou o fluxo de carbono para biossíntese de serina e o fluxo normal do ciclo de Krebs. Juntos esses resultados estabelecem que o bloqueio da glicólise no passo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é o ponto chave resultante da inibição de NAMPT, e é responsável pela inibição da produção de ATP, perturbação metabólica, com subsequente inibição do crescimento tumoral. Esses resultados também sugerem que concentrações alteradas de metabólitos intracelulares podem ser utilizadas como biomarcadores farmacodinâmicos para avaliar inibidores de NAMPT na clínica (TAN et al., 2013 e 2015).

Outros inibidores específicos de NAMPT, como metilnitronitrosoguanidina (MNNG) e obatoclax (tambem conhecido como GMX1777) exibem efeitos anti-tumorais semelhantes aos de FK-866. Um efeito quimiossensibilizante também foi observado empregando MNNG em células de leucemia (THP1 e K562) (GARTEN et al., 2009). A ação como pró-farmaco de GMX1777, associado à radioterapia, demonstrou eficácia terapêutica em câncer de cabeça e pescoço em modelos de camundongos (YACU et al., 2018). No entanto, no contexto clínico é importante considerar que o uso de inibidores de NAMPT pode acarretar efeitos adversos, uma vez que NAMPT é essencial para a homeostase de células normais. A exclusão total de NAMPT, por exemplo, resultou em aumento da letalidade embrionária, além de degeneração muscular e perda de visão por alterações na retina em modelos de camundongos NAMPT deficientes (YACU et al., 2018).

Em 2004 uma nova via de biossíntese de NAD^+ foi caracterizada após a identificação da NRK1 em leveduras e subsequente identificação dos homólogos NRK1 e NRK2 em humanos. Na etapa inicial, NRK catalisa a fosforilação de NR a NMN, que posteriormente é convertida a NAD^+ pela NMNAT. Evidências crescentes dos efeitos benéficos do uso de precursores de NAD^+ e, em particular, NR e NMN, levaram ao apontamento de NRKs como

possíveis alvos farmacológicos. Além disso, dados recentes sugerem que NRK2 desempenha papel na adaptação a estresse metabólico e energético, o que vai além da sua importância em termos de metabolismo de NAD⁺ (YACU et al., 2018). Um estudo demonstrou que células de músculo esquelético dependem principalmente de NAMPT, NRK1 e NRK2 para biossíntese de NAD⁺. A inibição de NAMPT nesse modelo levou ao esgotamento de NAD⁺, o que pôde ser recuperado utilizando os precursores NR e NMN, em um processo dependente de NRK1 e NRK2 (FLETCHER et al., 2017). Isótopos estáveis foram utilizados para avaliação do fluxo metabólico de NR e NMN. Os resultados mostraram que células de mamíferos convertem NMN extracelular em NR para captação e síntese de NAD⁺ (RATAJCZAK et al., 2016).

Nossos resultados demonstram que as células BEAS-2B expressam os genes que codificam a NRK1 e NAMPT e isso indica que NR pode ser metabolizada pelas células, gerando continuamente NAD⁺. Outra importante observação refere-se às concentrações de NMN, que estão aumentadas no grupo B[a]P+NR (**Figura 78**). Como descrito anteriormente, NMN é o produto direto da fosforilação de NR pela NRK. Desse modo, observa-se que a maior expressão gênica de NRK1 no grupo B[a]P+NR pode ter contribuído para o aumento de NMN.

5.15. Análise da atividade de SIRT1

Sete subtipos de sirtuínas já foram identificados em humanos e são classificados em função da sua localização celular. SIRT1, SIRT 6 e SIRT 7 estão presentes no núcleo, SIRT3 SIRT4 e SIRT5 são encontradas preferencialmente na mitocôndria, SIRT1 e SIRT5 foram também identificadas no citoplasma, assim como SIRT2. No entanto, SIRT2 tem a capacidade de se translocar para o núcleo durante a mitose. Atualmente, está bem estabelecido que sirtuínas têm papel em diferentes processos celulares, como senescência, resposta ao estresse, viabilidade, diferenciação, metabolismo, apoptose e sobrevivência (ZHAO et al., 2019).

A atividade de SIRT1 foi avaliada após 24, 72, 120, 144 e 168 h de exposição das células BEAS-2B a B[a]P, B[a]P+NR, NR e grupo controle (**Figura 97**). Não foram observadas alterações em 24 e 72 h, mas em 120 e 144 h houve aumento da atividade de SIRT1 nos grupos B[a]P e B[a]P+NR em relação ao controle. Após 168 h observamos grande aumento da

atividade de SIRT1 no grupo B[a]P, mas grande diminuição da atividade nos grupos B[a]P+NR e NR.

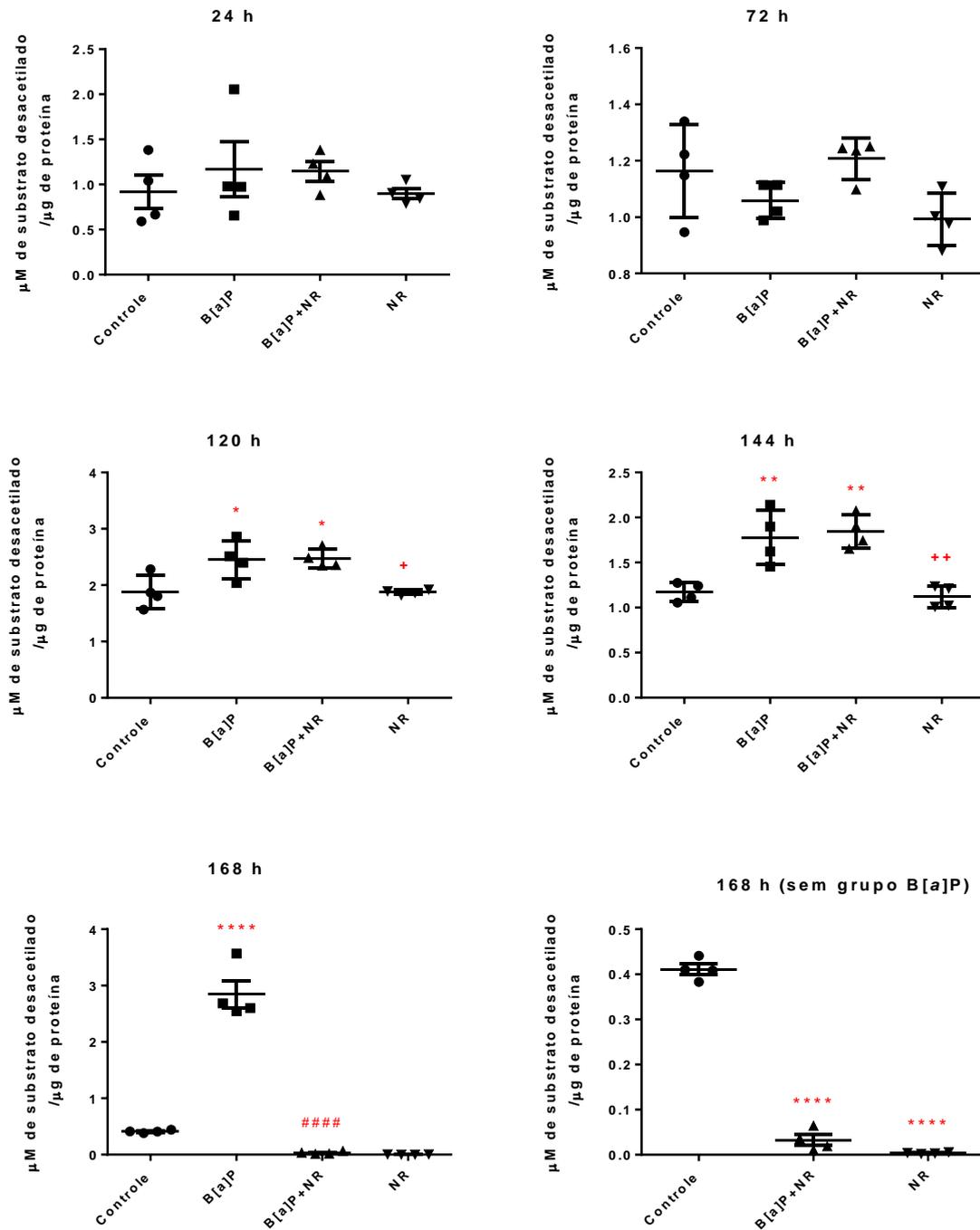


Figura 97. Atividade de SIRT1 em células BEAS-2B expostas por 24, 72, 120, 144 e 168 h a B[a]P, B[a]P+ NR, NR e grupo controle. Os resultados representam a média \pm erro padrão médio de quadruplicata técnica. Análise estatística: *one-way* ANOVA com teste de

comparações múltiplas de Sidak, em que os asteriscos indicam a significância das diferenças entre os grupos expostos *versus* grupo controle ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,01$, ***; $p < 0,0001$, ****), cerquilhas indicam a significância das diferenças entre o grupo B[a]P *versus* B[a]P+NR ($p < 0,05$, #; $p < 0,01$, ##; $p < 0,001$, ###; $p < 0,0001$, ####), e sinais de positivo indicam as diferenças entre o grupo B[a]P+NR *versus* NR. ($p < 0,05$, +; $p < 0,01$, ++).

As sirtuínas também desempenham importante papel na carcinogênese e manutenção do fenótipo maligno. SIRT1 promove o crescimento e proliferação celular em vários tipos de tumores, incluindo câncer de tireóide e câncer colorretal. Sua inibição farmacológica ou por meio de RNA de interferência (RNAi) reduziu o crescimento celular e restaurou a atividade de p53. SIRT1 também possui capacidade de desacetilar outros substratos, como FOXO3A, RB1, KU70 e E2F1, facilitando o crescimento celular. A expressão positiva de SIRT1 foi relacionada à modulação de KRAS em células de adenocarcinoma de pulmão. O nível de expressão de SIRT1 foi relacionado ao estágio do tumor, metástase linfonodal e redução da sobrevida em pacientes com carcinoma gástrico. A regulação negativa de SIRT1 atenuou a migração e invasão de células de câncer de próstata (ZHAO et al., 2019). O aumento da expressão de SIRT1 foi observado em outros tipos de tumores, incluindo câncer de pulmão, câncer de cólon, leucemia mielóide, e alguns tipos de câncer de pele não melanoma (LU et al., 2015; ZHAO et al., 2019).

Dados da literatura mostram que B[a]P aumenta a expressão de SIRT1 nas células BEAS-2B e no tecido pulmonar de camundongos. A expressão aumentada de SIRT1 foi relacionada à invasão, migração e transformação maligna após a exposição ao carcinógeno (LU et al., 2015).

Assim, a observação de que NR após 168 h reduziu a atividade de SIRT1, mesmo nas células expostas a B[a]P, está de acordo com a proteção observada contra a transformação induzida por B[a]P. Além disso, SIRT1 é responsável por modular o processo de transformação maligna por meio da atividade antiapoptótica, que ajuda as células em condições de estresse genotóxico e redox a sobreviverem (ZHAO et al., 2019). Observamos maior estresse redox e maior porcentagem de células viáveis no grupo exposto a B[a]P, em comparação ao grupo exposto a B[a]P+NR. A maior atividade de SIRT1 no grupo B[a]P após 168 h pode ter contribuído para a resistência das células ao estresse e a subsequente formação de colônias em *soft-agar*.

Sabe-se que intermediários do metabolismo são utilizados como cofatores enzimáticos. Um exemplo é a proteína quinase ativada por AMP (AMPK). A ativação de AMPK em função do aumento da razão AMP/ATP é descrita na literatura. AMPK ativa nicotinamida fosforribosiltransferase (NAMPT), que catalisa a reação de salvamento de NAD⁺ a partir de nicotinamida. NAD⁺ ativa, dentre outras enzimas, sirtuínas e PARPs. É possível que o contexto no qual essas enzimas são moduladas direcione as células no sentido de adaptação metabólica (o que observamos nas incubações somente com NR) ou morte (o que observamos nas incubações com B[a]P+NR) (CANTÓ; AUWERX, 2012). É interessante notar que membros da família de fatores de transcrição FOXO quando desacetilados por SIRT1 aumentam a autofagia (CANTÓ; AUWERX, 2012). Entretanto, a simples coexistência de FOXOs e SIRT1 no núcleo, na ausência de estresse energético e oxidativo, é insuficiente para que interajam. FOXOs são fosforilados por AMPK na presença de estresse energético e é possível que essa modificação aumente suas chances de desacetilação por SIRT1 e os efeitos decorrentes. FOXOs são reguladores chave do metabolismo lipídico, resistência a estresse, e apoptose (CANTÓ; AUWERX, 2012). O PGC-1 α também tem sua atividade regulada por fosforilação via AMPK e desacetilação por SIRT1. PGC-1 α é um importante regulador do metabolismo oxidativo e biogênese mitocondrial (CANTÓ; AUWERX, 2012).

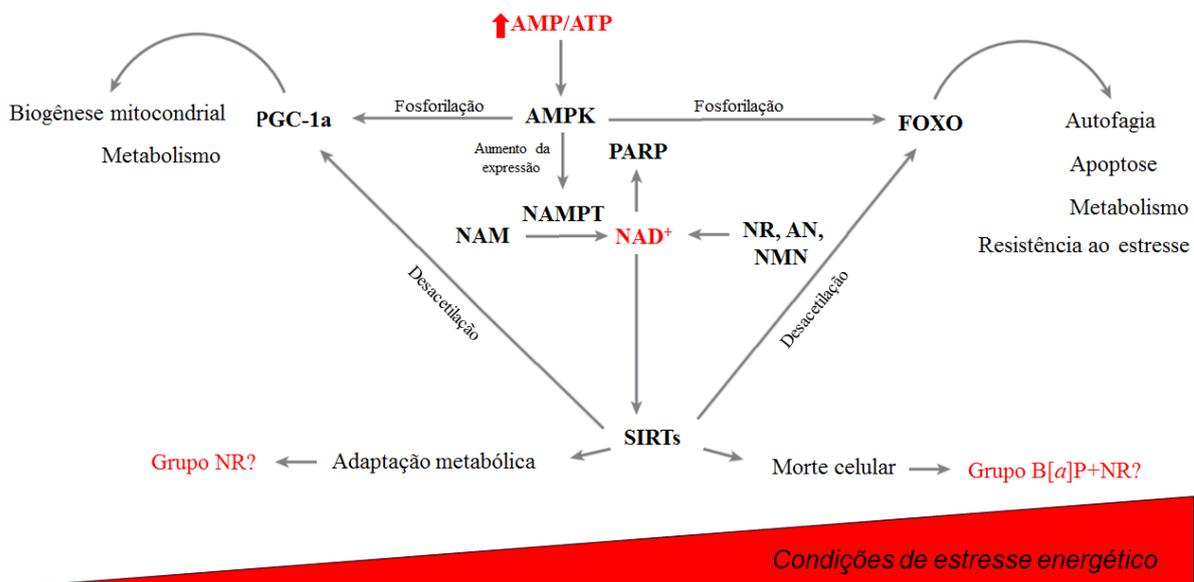


Figura 98. Modulação de processos celulares devido ao aumento da razão AMP/ATP e subsequente ativação de AMPK em condições de estresse energético.

6. CONCLUSÃO

NR em baixa concentração no meio de cultura (1 μM) induziu estresse energético em células BEAS-2B expostas a B[a]P (1 μM) ao longo do período de uma semana de co-incubação, aumentando seletivamente a taxa de apoptose dessas células. Protegeu contra a transformação celular induzida por B[a]P e impediu completamente a formação espontânea de colônias das células controle em *soft-agar*. Os dados de metabolômica direcionada a alvos específicos (“*targeted metabolomics*”) obtidos nessa tese, indicam que NR diminuiu o metabolismo de glutamina nas células expostas a B[a]P, o que ocorre em paralelo com a diminuição das concentrações de citrato e aspartato, aumento da razão malato/aspartato, diminuição das razões ATP/AMP e ATP/ADP e aumento das concentrações de adenosina. As alterações se enquadram na hipótese de inibição do *shuttle* malato-aspartato, cuja atividade é necessária para a sobrevivência de células que sofrem o efeito Warburg (alta dependência de NADH citosólico para geração de ATP). NR adicionalmente protegeu as células contra o estresse redox, a hipermetilação do DNA e o aumento da atividade de sirtuína 1 (SIRT1) induzidos por B[a]P, além de aumentar a expressão de genes supressores tumorais (E-caderina, PTEN, semaforina 3F, p16(ink4a)) que podem ser reprimidos por CtBP (proteína ligante de NADH que atua como sensor redox e traduz a condição metabólica da célula para o controle da expressão gênica). Foi ainda observada maior atividade de PARP1 nas células expostas a B[a]P+NR em comparação aos demais grupos. Os resultados obtidos mostram que NR se contrapõe a ou exacerba alterações bioquímicas induzidas por B[a]P, diminuindo a chance de transformação carcinogênica das células BEAS-2B.

7. PERSPECTIVAS

O modelo de indução de transformação das células BEAS-2B por B[a]P e intervenção com NR revelou alterações moleculares e bioquímicas que podem estar envolvidas no processo carcinogênico. O efeito protetor da NR contra a transformação induzida por B[a]P foi sustentado pela modulação de diversos efeitos celulares desencadeados pela exposição ao B[a]P. Um avanço significativo da compreensão dos mecanismos envolvidos tanto no processo de transformação como no de quimioprevenção virá dos estudos em modelo 3D, já planejados no grupo de pesquisa. O painel de metabólitos quantificados nesta tese será expandido para incluir mais metabólitos da via do metabolismo de alanina, aspartato e glutamato e vias a ela conectadas (metabolismo de glicina, serina e treonina; metabolismo de nicotina e nicotinamida; biosíntese de arginina; metabolismo de purinas; metabolismo de pirimidinas; glicólise; metabolismo de β -alanina; metabolismo de glutamina e glutamato; metabolismo de histidina). A escolha por essas vias veio da observação de que aspartato é um metabólito que se encontra frequentemente aumentado em estudos de metabolômica de câncer. Nesta tese foi evidenciado o aumento da concentração de aspartato somente nas células expostas a B[a]P, com normalização nas células expostas a B[a]P+NR. Com as análises em modelo 3D, o grupo de pesquisa espera identificar painéis de metabólitos alterados em diferentes estágios do processo de carcinogênese e sua modulação sob a intervenção da NR, com maiores chances de translação para a clínica. Faz parte do plano de prosseguimento da linha de pesquisa do grupo a quantificação do painel expandido de metabólitos em amostras obtidas de pacientes com câncer de pulmão antes e após a quimioterapia.

8. REFERÊNCIAS

ANDERSEN, S. et al. Overexpression of the HIF Hydroxylases PHD1, PHD2, PHD3 and FIH are individually and collectively unfavorable prognosticators for NSCLC survival. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23847, 2011.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 7, de 2007 de janeiro de 2007. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2007/rdc0002_15_01_2007.html. Acessado em 18 de outubro de 2020.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 274, de 2005 de janeiro de 2005. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0274_22_09_2005. Acessado em 18 de outubro de 2020.

ALTMAN, B. J.; STINE, Z. E.; DANG, C. V. From Krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p. 619–634, 2016.

AHMAD, J. Diabetes and Endocrinology. **Dis Markers**, v. 30, p. 235-43, 2011.

ANTUNES, V. M. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 44, n. 1, p. 279-287, 2008.

AUGUSTO, O. Radicais livres bons, maus e naturais, **Oficina de Textos**, 2006.

BARTA, J. A.; POWELL, C. A.; WISNIVESKY, J. P. Global Epidemiology of Lung Cancer, **Annals of Global Health**, v. 85, n.1, p. 1-8, 2019.

BAYLEI, G. et al. Effects of chlorophyllin of AFB1 pharmacokinetics in human subjects. **Cancer Research**, v. 68, n. 9, p. 1-12, 2008.

BAYRAKTAR, G.; KREUTZ, M. R. Neuronal DNA methyltransferases: epigenetic mediators between synaptic and gene expression? **The Neuroscientist**, v. 24, n. 2, p. 171–185, 2017.

BELINSKY, S. A. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 1, p. 707-17, 2004.

BENDER, J. DNA methylation and epigenetics. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 41-68, 2004.

BERGE, G. et al. Analysis of resveratrol as lung cancer chemopreventive agent A/J mice exposed to benzo[a]pyrene. **British Journal of Cancer**, v. 91, n. 1, p. 1380-1383, 2004.

BERNARDO, D. L. et al. Carcinogenicidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p. 789-794, 2016

BETTIN, S.M.; FRANCO, D.W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 234-8, 2005.

BIANCHINI, F. et al. Inverse correlation between alcohol and lymphocyte levels of 8-hydroxyguanosine in humans. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 1, p. 885-90, 2001.

BIDMON, C.; FRISCHIMANN, M.; PISCHETSRIEDER, M. Analysis of DNA-bound advanced glycation end-products by LC and mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1, n. 1, p. 851-58, 2007.

BIEGANOWSKI, P.; BRENNER, C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. **Cell**, v. 117, n. 1, p. 495-502, 2004.

BITTERMAN, K. J. et al. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 45099–45107, 2002.

BOISON, D. Adenosine kinase: Exploitation for therapeutic gain. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 3, p. 906–943, 2013.

BOBROVNIKOVA-MARJON, E.; HUROV, J. B. Targeting metabolic changes in cancer: novel therapeutic approaches. **Annual Review of Medicine**, v. 65, n. 1., p. 157-70, 2014.

BOROWICZT, S. et al. The Soft Agar Colony Formation Assay. **Journal of Visualized Experiments**, v. 92, n. 1, p. 1-6, 2014.

BORTOLI, S. et al. Nrf2 and AhR in metabolic reprogramming after contaminant exposure. **Current Opinion in Toxicology**, v. 8, p. 34–41, 2018.

BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 394–424, 2018.

BREYER, V. et al. Analysis and biological relevance of advanced glycation end-products of DNA in eukaryotic cells. **The FEBS Journal**, v. 275, n.1, p. 914-25, 2008.

BROOKES, P. S. et al. Malonate as a ROS product is associated with pyruvate carboxylase activity in acute myeloid leukaemia cells. **Free Radical Biological & Medicine**, v. 41, n. 1, p. 41-5, 2006.

BUROW, M. E. et al. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor α -induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. **Cancer Research**, v. 58, n. 21, p. 4940-4946, 1998.

CACHON, B. F. et al. Proinflammatory effects and oxidative stress within human bronchial epithelial cells exposed to atmospheric particulate matter (PM_{2.5} and PM_{>2.5}) collected from Cotonou, Benin. **Environmental Pollution**, v. 185, n. 1, p. 340-351, 2014.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L. Oxidatively Generated Damage to the Guanine Moiety of DNA: Mechanistic Aspects and Formation in Cells. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 1, p. 1075-1083, 2008.

CAINO, M. C. et al. Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol Promotes Checkpoint Activation and G₂/M Arrest in Human Bronchoalveolar Carcinoma H358 Cells. **Molecular Pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 744-750, 2007.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 1, p. 85-95, 2011.

CANTÓ, C.; AUWEREX, J. Targeting SIRT1 to improve metabolism: all you need is NAD⁺?. **Pharmacology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 166–187, 2012.

CANTÓ, C. et al. The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. **Cell Metab.** v. 15, p. 838-847, 2012.

CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – benzo[a]pireno: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 67, n. 1, p.1-27, 2008.

CHEN, X. et al.. Benzo[a]pyrene enhances the EMT-associated migration of lung adenocarcinoma A549 cells by upregulating Twist1. **Oncology Reports**, v. 38, n.1, p. 2141-47, 2017.

CHEN, S.; SANG, J.; ZHENG, Y. The expression of prolyl hydroxylases domain enzyme are up-regulated and negative correlated with Bcl-2 in non-small cell lung cancer. **Molecular and Cell Biochemistry**, v. 358, n.1, p. 257-63; 2011.

CHIA, N. et al. Hypothesis: Environmental regulation of 5-hydroxymethylcytosine by oxidative stress. **Epigenetics**, v. 6, n. 1, p. 853-6, 2011.

CHINNADURAI, G. The transcriptional corepressor CtBP: a foe of multiple tumor suppressors. **Cancer Research**, v. 69, n.1, p. 731-4, 2009.

CLARHAUT, J. et al. ZEB-1, a repressor of the semaphorin 3F tumor suppressor gene in lung cancer cells. **Neoplasia**, v. 11, n. 2, p. 157-166, 2009.

COMA, S. et al. Id2 promotes tumor cell migration and invasion through transcriptional repression of Semaphorin 3F. **Cancer Research**, v. 70, n. 9, p. 3823–3832, 2010.

CONDE F. J. et al. Optimization of a sampling method to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from incomplete biomass combustion. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, n. 1, p. 287-94, 2004.

CONZE, D. B.; CRESPO-BARRETO, J.; KRUGER, C. L. Safety assessment of nicotinamide riboside, a form of vitamin B3. **Human & Experimental Toxicology**, v. 35, n. 11, p. 1149–1160, 2016.

CYR, A.R.; DOMANN, F. E. The redox basis of epigenetic modifications: from mechanisms to functional consequences. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n.1, p. 551-89; 2011.

DAHL C.; GRONBAEK K.; GULDBERG P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 1, p. 831-6, 2011.

DAI, Q.; HE, C. Preparation of DNA containing 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine modification through phosphoramidites with TBDMS as 5-hydroxymethyl protecting group. **Current Protocols Nucleic Acid Chemistry**, Chapter 4: Unit 4.47, p. 1-18, 2011.

DAMIANI, L. A. et al. Carcinogen-Induced Gene Promoter Hypermethylation Is Mediated by DNMT1 and Causal for Transformation of Immortalized Bronchial Epithelial Cells. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 9005-9014, 2008.

DEBERARDINIS, R. J. et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 11–20, 2008.

DELLOYE-BOURGEOIS et al. Microenvironment-Driven Shift of Cohesion/Detachment Balance within Tumors Induces a Switch toward Metastasis in Neuroblastoma. **Cancer Cell**, v. 32, n. 1, p. 427–443, 2017.

DEMAREST, T. G. et al. NAD⁺ Metabolism in Aging and Cancer, **Annual Review of Cancer Biology**, v. 3, n. 1, p. 105-130, 2019.

DENISON, M. S. et al. Analysis of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Signal Transduction Pathway. **Current Protocols in Toxicology**, Chapter 4, Unidade 4.8, 2002.

DESAUTELS, D. N. et al. Effect of FK866, NAMPT inhibitor, on small cell lung cancer cell lines. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 1, p. 1-8, 2015.

DI, L. J. et al. Transcriptional regulation of BRCA1 expression by a metabolic switch. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 17, n. 1, p. 1406-14; 2010.

DING, J., et al. Cyclin D1 Induction by Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/MAPK- and p70s6k-dependent Pathway Promotes Cell Transformation and Tumorigenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 48, p. 33311–33319, 2009.

DOI, A. et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. **Nature Genetics**, v. 41, n. 1, p. 1350-3, 2009.

DZIOBEK et al. Changes in Expression Pattern of SEMA3F Depending on Endometrial Cancer Grade - Pilot Study. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 727-732, 2019.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency, Integrated Risk Information System: Toxicological Review of Benzo[a]pyrene, p. 1-234, 2017.

FARMACOPEIA Brasileira. 6 ed. São Paulo: Atheneu, parte I, 2019.

FANG, E. F. et al. NAD⁺ in Aging: Molecular Mechanisms and Translational Implications. **Trends In Molecular Medicine**, v. 23, n.; 1, p. 899-916, 2017.

FEDOTCHEVA, N. I.; SOKOLOV, A. P.; KONDRASHOVA, M. N. Nonezymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 1, p. 56-64, 2006.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. **Cold Spring Harbo Protocols**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2016.

FERECATU, I. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor. **Particle and Fibre Toxicology**. V. 7, n. 18, p. 1-14, 2010.

FISCHER, J. M. F. et al. PARP1 protects from benzo[a]pyrene diol epoxide-induced replication stress and mutagenicity. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 1, p. 1323–1340, 2018.

FLETCHER et al. Nicotinamide riboside kinases display redundancy in mediating nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in skeletal muscle cells. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 1, p. 819-832, 2017.

FLETCHER, R. S.; LAVERY, G. G. The emergence of the nicotinamide riboside kinases in the regulation of NAD⁺ metabolism. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 61, n. 3, p. 107–121, 2018.

FOUQUEREL, E.; SOBOL, R. W. ARTD1 (PARP1) activation and NAD(+) in DNA repair and cell death. **DNA Repair**, v. 23, n. 1, p. 27-32, 2014.

FRENCH, B. D. The Proposed Effects of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) Supplementation on Energy Metabolism. **American Journal of Sports Science and Medicine**, v. 3, n. 5, p. 96–107, 2015.

GAO, M. et al. Induction of oxidative stress and DNA damage in cervix in acute treatment with benzo[a]pyrene. **Mutation Research**, v. 719, n. 1, p. 52–59, 2011.

GARCÍA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic drinks and the identification of their potential sources. **Food Additive Contamination**, v. 22, n. 9, p. 791-7, 2005.

GARTEN, A. et al. Nampt: Linking NAD biology, metabolism, and cancer. **Trends Endocrinology and Metabolism**, p. 20, n. 3, p. 130–138, 2009.

GIANELL, V. et al. Benzo(a)pyrene air concentrations and emission inventory in Lombardy region, Italy. **Atmospheric Pollution Research**, v. 4, n. 3, p. 257-266, 2013.

GIATROMANOLAKI, A. et al. Expression of prolyl-hydroxylases PHD-1, 2 and 3 and of the asparagine hydroxylase FIH in non-small cell lung cancer relates to an activated HIF pathway. **Cancer Letters**, v. 262, n. 1, p. 87-93, 2008.

GODOI, A. F. et al. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. **Journal Chromatography A**, v. 1027, n. 1, p. 49-53, 2004.

GROOTECLAES, M. et al. C-terminal-binding protein corepresses epithelial and proapoptotic gene expression programs. **Cell Biology**, PNAS, v. 100, n. 8, p. 456, 2003.

GUO, T.; EISELE, D. W.; FAKHRY, C. The potential impact of prophylactic human papillomavirus vaccination on oropharyngeal cancer. **Cancer**, v. 122, n. 15, p. 2313–2323, 2016.

GUSTAFSON, A. M. et al. Airway PI3K pathway activation is an early and reversible event in lung cancer development. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 26ra25, 2010.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARDONNIÉRE K. et al. Role for the ATPase inhibitory factor 1 in the environmental carcinogen-induced Warburg phenotype. **Scientific Reports**, v.7, n. 1, p. 195, 2017.

HARDONNIERE K. et al. The environmental carcinogen benzo[a]pyrene induces a Warburg-like metabolic reprogramming dependent on NHE1 and associated with cell survival, **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30776, 2016.

HAZRA, A. et al. Benzo[a]pyrene Diol Epoxide-Induced 9p21 Aberrations Associated with Genetic Predisposition to Bladder Cancer; **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 41, n. 1, p. 330–338, 2004.

HE, S. et al. Camptosorus sibiricus rupestris aqueous extract prevents lung tumorigenesis via dual effects against ROS and DNA damage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 220, n. 1, p. 44–56, 2018.

HECHT, S. S. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. **International Journal of Cancer**. 131:2724-32; 2012.

HEGAZY et al. Effects of benzo[a]pyrene on blood components, tumor markers, and oxidative status in mice. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 136–145, 2012.

HEIDEN, M. G. V.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 1, p. 1029-33, 2009.

HERBELÉ, G. Estudo in silico de inibidores de SIRT1. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2011.

HITCHLER, M. J.; DOMANN, F. E. Metabolic defects provide a spark for the epigenetic switch in cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 1, p. 115-27, 2009.

HUSSAIN, S.P. et al. Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. **Cancer Research**, v. 61, n. 17, p. 6350–6355, 2001.

IACOMINO, G. et al. Effects of histone deacetylase inhibitors on p53^{CDC/Cdc20} expression in HT29 cell line. **Journal of Cellular Biochemistry**, 99. 1122-1131, 2006.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans: Polynuclear Aromatic Compounds, 32, v.100, Lyon, France, 2012.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans: Polynuclear Aromatic Compounds, 32, IARC, Lyon, 1983.

INAMURA, K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification, **Frontiers in Oncology**, v. 7, n. 193, p. 1-7, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. Estatísticas de câncer do Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao>. Acessado em: 20/01/21

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. Estatísticas de câncer do Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/perguntas-frequentes/para-que-servem-vacinas-contr-o-hpv#:~:text=A%20vacina%20bivalente%20est%C3%A1%20aprovada,infec%C3%A7%C3%B5es%20ou%20les%C3%B5es%20j%C3%A1%20existentes>. Acessado em: 20/01/21.

ITO, S. et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. **Nature**, v. 466, n. 1, p. 129-33; 2010.

JANG, S.; KANG, H. T.; HWANG, E. S. Nicotinamide-induced mitophagy event mediated by high NAD⁺/NADH ratio and sirt1 protein activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 1, p. 19304-19314, 2012.

JIM, Z.; LIM, L. DNA methylation in human diseases. **Genes and Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2018.

JEFFY, B. D. et al. Disruption of cell cycle kinetics by benzo[a]pyrene: inverse expression patterns of BRCA-1 and p53 in MCF-7 cells arrested in S and G2. **Neoplasia**, v. 2, n. 1, p. 460-470, 2000.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 1, p. 69-90, 2011.

JIANG, C. -L. et al. Air pollution and DNA methylation alterations in lung cancer: A systematic and comparative study. **Oncotarget**, Vol. 8, n. 1, p. 1369-1391, 2017.

JUBERT, C. et al. Effects of Chlorophyll and Chlorophyllin on Low-Dose Aflatoxin B1 Pharmacokinetics in Human Volunteers. **Cancer Prevention Research**, v. 2, n. 12, p. 1015–1022, 2009.

KHAN, N. A. et al. Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 6, p. 721-31, 2014.

KLEINOW et al. Bioavailability and Biotransformation of Benzo(a)pyrene in an Isolated Perfused In Situ Catfish Intestinal Preparation, v. 106, n. 3, p. 155-166, 1998.

KIM, S. Cancer Energy Metabolism: Shutting Power off Cancer Factory. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 26, n. 1, 39-44, 2018.

KLAUNIG, J. E. et al. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 254, n. 1, p. 86-99, 2011.

KO, C. et al. Benzo(a)pyrene-induced apoptotic death of mouse hepatoma Hepalcl7 cells via activation of intrinsic caspase cascade and mitochondrial dysfunction; **Toxicology**, v. 199, p. 35–46, 2004.

KOCH-NOLTE, F. et al. Compartmentation of NAD⁺-dependent signalling. **FEBS Letters**, v. 585, n. 1, p. 1651-56, 2011.

KOIVUNEN, P. et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. **The Journal Biological Chemistry**, v. 282, p. 4524-32, 2007.

KOUIDOU, S.; KOVATSI, L.; IOANNOU, A. Seeking the 5th Base of DNA Using Chromatographic Methods of Analysis. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 2268-2281, 2010.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell**, v. 13, n. 6, p. 472-782, 2008.

KUMAR, M. et al. Biological conversion of carcinogenic aflatoxin B1 to AFB1-8,9-epoxide and its potential prevention. *International Journal of Research and Analytical Reviews*, v. 5, n.4, p. 935-946, 2018.

LAMANNA, J. C., CHAVEZ, J. C., PICHIULE, P. Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain. *The Journal Experimental Biology*, v. 207, n. 1, p. 3163-3169, 2004.

LEO, E.E.M; ALTAMIRANO, E.; CAMPOS, M.R.S. Functional Foods and Chemoprevention in Cancer. *Therapeutic Foods*, v. 8, n. 1, p. 1-32, 2018

LIN, D.; TU, Y.; ZHU, L. Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. *Food Chemical Toxicology*, v. 43, n. 1, p. 41-8; 2005.

LIN, T.; YANG, M. S. Benzo[a]pyrene-induced necrosis in the HepG(2) cells via PARP-1 activation and NAD(+) depletion. *Toxicology*, v. 245, n. 1, p. 147-53, 2008.

LIU, L. et al. Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Life Sciences*, v. 86, n. 1, p. 192–198, 2010.

LIU, X. et al. Molecular basis for G2 arrest induced by 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-beta-D-arabino-pentofuranosylcytosine and consequences of checkpoint abrogation. *Cancer Research*, v. 65, n. 15, p. 6874–6881, 2005.

LOBATO, S. Análise da expressão das proteínas P16INK4a, KI67 E MCM7 e da infecção pelo PapilomaVírus Humano (HPV) na progressão das lesões escamosas intraepiteliais do colo uterino. **TESE DE DOUTORADO**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

LODISH et al. *Biologia celular e molecular*. Tradução NASCIMENTO, F. G. et al, ed. 4, Livraria e Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2011.

LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. *Química Nova*, v. 1, n. 5, p. 497-516, 1996.

LOUREIRO, A. P. M.; MASCIIO, P. D.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de dna: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 777-793, 2002.

LU, J. et al. SIRT1 in B[a]P-induced lung tumorigenesis. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 1-17, 2016.

LU, X. et al. PTEN Inhibits Cell Proliferation, Promotes Cell Apoptosis, and Induces Cell Cycle Arrest via Downregulating the PI3K/AKT/hTERT Pathway in Lung Adenocarcinoma A549 Cells. **BioMed Research International**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2016.

LUNDBERG, A. S. et al. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. **Oncogene**, v. 21, n. 29, p. 4577–4586, 2002.

MAGAÑA, A. A. et al. High-performance liquid chromatography determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine, 2'-deoxycytidine, and other deoxynucleosides and nucleosides in DNA digests. **Analytical Biochemistry**, v. 374, p. 378-85, 2007.

MARTENS, C. R. et al. Chronic nicotinamide riboside supplementation is well-tolerated and elevates NAD⁺ in healthy middle-aged and older adults, **Nature Communications**, v. 9, n. 1286, p. 1-9, 2018.

MARTÍNEZ, M., MARSHALL, J. & GIOVANNUCCI, E. Diet and cancer prevention: the roles of observation and experimentation. **Nature Reviews Cancer** v. 8, n. 1, p. 694–703, 2008.

MATHEWS, M. T.; BERK, B. C. PARP-1 inhibition prevents oxidative and nitrosative stress-induced endothelial cell death via transactivation of the VEGF receptor 2. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 28, p. 711-17, 2008.

MEDEIROS, M. H. Exocyclic DNA adducts as biomarkers of lipid oxidation and predictors of disease. Challenges in developing sensitive and specific methods for clinical studies. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 419-425, 2009.

MURATA, M. Inflammation and cancer. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 23, n. 50, p. 1-8, 2018.

NABEL, C. S.; KOHLI, R. M. Molecular biology. Demystifying DNA demethylation. **Science**, v. 333, n. 1, p. 1229-30, 2011.

OH, S. et al. Effects of benzo(a)pyrene on protein expression in Jurkat T-cells; **Proteomics**, v. 4, n. 1, p. 3514–3526, 2004.

OKUMURA, S. et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase: a potent therapeutic target in non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor-gene mutation. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 7, n. 1, p. 49-56; 2011.

OLIVEIRA, T.F. Transformação de células epiteliais bronquiais humanas por benzo[a]pireno: processos metabólicos redox e metilação/desmetilação do DNA. Supervisora: Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro, FCF/USP. Bolsa de Pós-doutorado FAPESP, número do processo: 12/21636-8, vigência 2012-2017.

PAMPLONA, R. Advanced lipoxidation end-products. **Chemico-Biological Interactions**, v. 192, n. 1, p. 14-20, 2011.

PANG, Y. et al. Metabolic activation of benzo(a)pyrene enhanced transformation of human bronchial epithelium cell HBETR. **Journal of Hygiene Research**, v. 38, n. 6, p. 645-8, 2009.

PENN, N. W. et al. The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. **Biochemical Journal**, v. 126, n. 1, p. 781–790, 1972.

POHJOLA, S. K. et al. DNA binding of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human bronchial epithelial cell line treated with diesel and gasoline particulate extracts and benzo[a]pyrene. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 429-38, 2003.

POLJSAK, B. NAD⁺ in cancer prevention and treatment: pros and cons. **Journal Clinical and Experimental Oncology**, v. 5, n. 4, p. 1-18, 2016.

PRIYA, D. K. et al. Protective role of sulforaphane against oxidative stress mediated mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in female Swiss albino mice. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 1, p. 110-7, 2011.

PUPPALA, D.; GAIROLA, C. G.; SWANSON, H. I. Identification of kaempferol as an inhibitor of cigarette smoke-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor and cell transformation. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 639-647, 2007.

RAHMAN, A. M. A. et al. Targeted metabolomics in cultured cells and tissues by mass spectrometry: Method development and validation. **Analytica Chimica Acta**, v. 845, p. 53–61, 2014.

RAJMAN, L., CHWALEK, K., SINCLAIR, D. A. Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence, **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 529:40, 2018.

RAMIREZ, R. D. et al. O-205 Immortalization of normal human bronchial epithelial cells (NHBE) in the absence of viral oncoproteins. **Cancer Research**, v. 64, n. 1, p. 9027-9034, 2004.

RATAJCZAK, J. et al. NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. **NATURE COMMUNICATIONS**, v. 1, n. 13103, p. 1-12, 2016.

RAVICHANDRAN, M.; JURKOWSKA R. Z; JURKOWSKI T. P. Target specificity of mammalian DNA methylation and demethylation machinery. **Org. Biomol. Chem**, v. 1, n. 1, p. 1-18, 2017.

RECK, M. et al. Tissue sampling in lung cancer: a review in light of the MERIT experience. **Lung Cancer**, v. 74, n. 1, p. 1-6, 2011.

REDDEL, R. R. et al. Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells by Infection with SV40 or Adenovirus-12 SV40 Hybrid Virus, or Transfection via Strontium Phosphate Coprecipitation with a Plasmid Containing SV40 Early Region Genes, **Cancer Research**, v. 48, n. 1, p. 1904-1909, 1998.

RISS, T. L., et al. Cell viability assay. **Assay Guidance Manual**, v.1, n. 1, p. 1-25, 2016.

ROBERTSON, K. D.; Wolffe, A. P. DNA methylation in health and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2000.

ROTHHAMMER, V.; QUINTANA, F. J. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. **Nature Reviews**, v. 19, n. 1, p. 184–197, 2019.

RUAN, Q. et al. Quantification of benzo[a]pyrene diol epoxide DNA-adducts by stable isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 1, p. 1369-80, 2006.

SADIKOVIC, B. RODENHISER D. I. Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 216, n. 3, p. 458-468, 2006.

SADIKOVIC, B. et al. Genome-wide H3K9 Histone Acetylation Profiles Are Altered in Benzopyrene-treated MCF7 Breast Cancer Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 1, p. 4051-4060, 2008.

SAMPATH, D. et al. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 151, n. 1, p. 16-31, 2015.

SANCHEZ-CESPEDES, M. et al. Increased Loss of Chromosome 9p21 but not p16 Inactivation in Primary Non-Small Cell Lung Cancer from Smokers1; **Cancer Research**, v. 61, n. 1, p. 2092–2096, 2001.

SANTOS, A. M. et al. Citometria de fluxo: fundamentos e aplicações na pesquisa científica. Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, 137p, 2018.

SANTIDRIAN, A. F. et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase can affect metastatic activity and cell adhesive functions by regulating integrins in breast cancer. **DNA Repair**, v. 23, n. 1, p. 79-87, 2014.

SANTIDRIAN, A. F. et al. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 1068-81, 2013.

SCIEX. API 4000TM LC/MS/MS System. Concord, ON, Canada, AB Sciex, 110p, 2010.

SCRIMA, M. et al. Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): new insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30427, 2012.

SELAK, M.A. et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. **Cancer Cell**, v. 7, n. 1, p. 77-85, 2005.

SHI, W. et al. Effects of a wide range of dietary nicotinamide riboside (NR) concentrations on metabolic flexibility and white adipose tissue (WAT) of mice fed a mildly obesogenic diet. **Molecular Nutrition and Food Research**. v. 61, n. 8, p. 1-11, 2017.

SHIN, H. et al. Establishment of five immortalized human ovarian surface epithelial cell lines via SV40 T antigen or HPV E6 / E7 expression. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–17, 2018.

SHUKLA, S.D. et al. An antagonist of the platelet-activating factor receptor inhibits adherence of both nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* to cultured human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke. **International Journal of COPD**, v. 11, n. 1, p. 1647-1655, 2016.

SIGVE, A. et al. Diverging prognostic impacts of hypoxic markers according to NSCLC histology. **PLOS One**, v. 6, n.1, p. e23847, 2011.

SINGH, S. et al. Clinical Significance of PARP-1 Inhibitors in Cancer Chemotherapy, **Translational Clinical Biology**, v. 1, n.1, p. 10-15, 2013.

SMITH, M.T.. Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 124, n. 6, p. 713-721, 2016.

STEIN, L. R.; IMAI, S. I. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 9, p. 420-428, 2012.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, 193-203, 2015.

STURM, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287-1260, 2006.

SULLIVAN, L. B.; GUI, D. Y.; VAN DER HEIDEN, M. G. Altered metabolite levels in cancer: Implications for tumor biology and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 11, p. 680–693, 2016.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistic 2020: GLOBOCAN estimatives of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer Journal Clinical**, v. 0., n.1, p. 1-40, 2021.

TAMAE, D. et al. Mutagenesis and repair induced by the DNA advanced glycation end product N2-1-(carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine in human cells. **Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 2321-29, 2011.

TAN, B. et al. Pharmacological Inhibition of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT), an Enzyme Essential for NAD Biosynthesis, in Human Cancer Cells METABOLIC BASIS AND POTENTIAL CLINICAL IMPLICATIONS. **THE Journal OF Biological Chemistry**, v. 288, n. 5, p. 3500–3511, 2013.

TAN, B. et al. Inhibition of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT), an Enzyme Essential for NAD Biosynthesis, Leads to Altered Carbohydrate Metabolism in Cancer Cells*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 25, p. 15812–15824, 2015.

TANG, Y. et al. Metabolomics workflow for lung cancer: Discovery of biomarkers. **Clinica Chimica Acta**, v. 495, n. 1, p. 436–445, 2019.

TAO, G. et al. Effect of PARP-1 deficiency on DNA damage and repair in human bronchial epithelial cells exposed to Benzo(a)pyrene. **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 1, p. 2413–2422, 2009.

TESSIER, F. J. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. **Pathologie Biologie**, v. 58, n. 1, p. 214-19, 2010.

THURBER, G. M. et al. Effect of Small-Molecule Modification on Single-Cell

Pharmacokinetics of PARP Inhibitors. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, n. 1, p. 986 – 995, 2014.

TOSS, A.; CORESI, L. Molecular mechanism of PARP inhibitors in BRCA-related ovarian cancer. **Cancer Science and Therapy**, v. 5, n. 11, p. 409-416, 2013.

TRAVIS, W. D., Pathology of Lung Cancer, **Clinics in Chest Medicine**, v. 32, n. 4, p. 669–692, 2011.

TRETYAKOVA, N. et al. Quantitation of DNA adducts by stable isotope dilution mass spectrometry. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 2007-35; 2012.

TSAI, H. Clinical cancer chemoprevention: From the hepatitis B virus (HBV) vaccine to the human papillomavirus (HPV) vaccine. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 54, n. 1. p. 12-15 (2015).

TSOU, J. A. et al. DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. **Oncogene**, v. 21, n. 1, p. 5450-61, 2002.

TUMMALA, K. S. et al. Inhibition of de novo NAD⁺ syntheses by oncogenic URI causes liver tumorigenesis through DNA damage. **Cancer Cell**, v. 26, n. 1, p. 826-839, 2014.

TUNG, E. W. Y. et al. Benzo[a]pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: A possible mechanism for benzo[a]pyrene-induced toxicity. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 760, n.1, p. 64-69, 2014.

VELJKOVIC, E. et al. Chronic exposure to cigarette smoke condensate in vitro induces epithelial to mesenchymal transition-like changes in human bronchial epithelial cells, BEAS-2B. **Toxicology In Vitro**, v. 25, n. 1, p. 446-53, 2011.

VERDIN, E. NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. **Science**, v. 350, n. 1, p. 1208-1213, 2015.

VERITASBIO. Disponível em: <https://www.veritasbio.com.br/guia-pratico-sobre-contaminacao-em-cultura-de-celulas/>, acessado em 27 de abril de 2021. VISTOLI, G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47, n. 1, p. 3-27, 2013.

WANNHOFF, A. et al. Oxidative and nitrosative stress and apoptosis in oral mucosa cells after ex vivo exposure to lead and benzo[a]pyrene. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 915-921, 2013.

WILLIAMS, K. CHRISTENSEN, J.; HELIN, K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? **EMBO Reports**, v. 13, n. 1, p. 28-35; 2011.

WEI, Y. et al. Benzo[a]pyrene promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis likely through the Aryl hydrocarbon receptor and ERK-dependent induction of MMP9 and c-myc. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 1, p. 2055-2063, 2016.

WU, J. et al. Co-exposure to amorphous silica nanoparticles and benzo[a] pyrene at low level in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 1, p. 23134–23144, 2016.

XIAO, M. et al. Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. **Genes and Development**, v. 26, n. 1, p. 1326-38, 2012.

XIAO, H. et al. Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide causes caspase-mediated apoptosis in H460 human lung cancer cell line. **Cell Cycle**, v. 6, n. 22, p. 2826-2834, 2007.

XIULING, X. et al. MUC1 contributes to BPDE-induced human bronchial epithelial cell transformation through facilitating EGFR activation. **PLOS one**. 7 (3): e33846,2012.

XU, X. et al. MUC1 contributes to BPDE-induced human bronchial epithelial cell transformation through facilitating EGFR activation. **PLOS One**, v. 7, n. 3, p. e33846, 2012.

YACU, K. et al. NAD Metabolism in Cancer Therapeutics. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. 622, p. 1-9, 2018

YANG, T.; CHAN, N. Y.; SAUVE, A. A. Syntheses of nicotinamide riboside and derivatives: effective agents for increasing nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mammalian cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 6458-6461, 2007.

YANG, C. S. et al. Cancer Chemoprevention: What have we learned? **Current Pharmacology Reports**, v. 3, n. 1, p. 409–422, 2017.

ZHAO, E. et al. The Roles of Sirtuin Family Proteins in Cancer Progression. **Cancers**, v. 11, n. 1949, p. 1-22, 2019.

ZHAO, X. et al. The 2.5 Å crystal structure of the SIRT1 catalytic domain bound to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and an indole (EX527 analogue) reveals a novel mechanism of histone deacetylase inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 963–969, 2013.

ZHU, W. et al. Curcumin and vitamin E protect against adverse effects of benzo[a]pyrene in lung epithelial cells. **PLOS One**, v. 9, n. 3, p. e92992, 2014.

9. ANEXOS

Anexo A: Extração do RNA para análise da expressão gênica e análise da integridade

Anexo B: Currículo lattes

Anexo C: Ficha do aluno

Extração do RNA para análise da expressão gênica e análise da integridade

A eficiência e qualidade do RNA obtido na extração têm reflexos diretos nas análises de PCR quantitativo. A utilização de kits de extração facilitou essas análises, e é o primeiro passo para obtenção de dados de expressão gênica confiáveis. Atualmente, um método muito robusto é utilizado nesse tipo de análise: o sistema *Bioanalyzer*. Esse sistema gera informações sobre a concentração, integridade e pureza do material obtido. Nessas análises é possível avaliar minuciosamente a distribuição e o tamanho dos fragmentos de RNA. Neste sentido, RIN (do inglês, *RNA integrity number*) foi desenvolvido para avaliar o perfil de eletroforese (Mueller *et al.*, 2016). Esse algoritmo permite a classificação da integridade do RNA com base em um sistema de numeração que varia numa escala de 1,0 a 10, sendo que os valores próximos a 10 correspondem a amostras com maior nível de integridade de RNA, valores próximos a 5,0 corresponde a amostras com RNA parcialmente degradado, e valores de RIN próximo a 1,0 correspondem a RNA altamente degradado.

Após algumas adaptações no protocolo experimental do kit, conseguimos obter um RNA com alta pureza e alto grau de integridade, o que gera maior confiabilidade dos dados. Foram selecionadas amostras com RIN superior a 8.1. Na **Figura 8** é demonstrado um eletroferograma e os fragmentos de RNA usando gel de agarose de uma das amostras obtidas na extração.

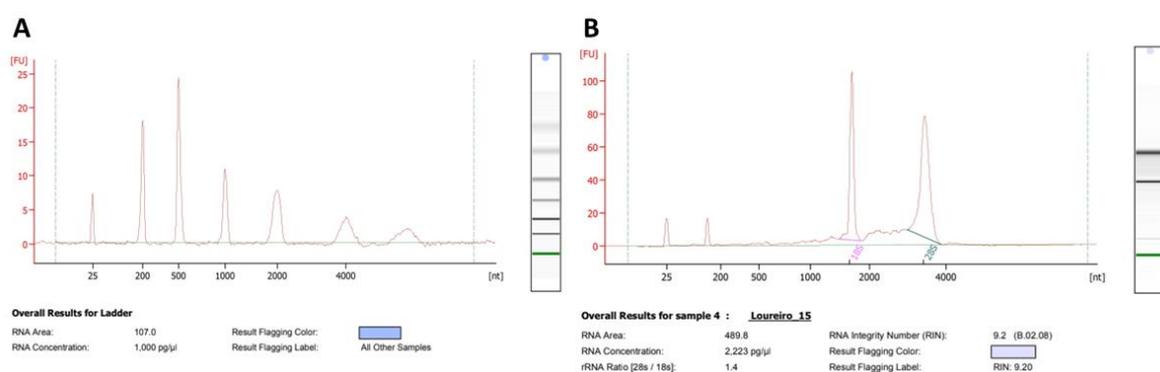


Figura suplementar 1. Análise dos fragmentos de RNA por meio do sistema *Bioanalyzer* utilizando o *Eukaryote Total RNA Nano assay*. A. Eletroferograma e respectivo perfil de fragmentação de RNA em gel de eletroforese de uma amostra padrão de RNA de alta integridade. B. Eletroferograma e respectivo perfil de fragmentação do RNA de uma das

amostras obtidas em 48 h de incubação (o exemplo corresponde à amostra do grupo B[a]P+NR em 48 h de incubação).



Everson Willian Fialho Cordeiro

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5742251812454787>

Última atualização do currículo em 17/04/2021

Resumo informado pelo autor

Doutor em Toxicologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Também possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Pampa (2015). Atualmente é aluno do curso de especialização em Pesquisa Clínica e Medical Affairs da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Atuou como integrante no Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (LDCQ/UNIPAMPA) e no Laboratório de Metabolismo Redox em Toxicologia (FCF-USP).

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Everson Willian Fialho Cordeiro

Dados pessoais

Filiação Geraldo Magela Cordeiro e Sylvania de Cassia Pereira Fialho Cordeiro

Nascimento 02/07/1992 - Inhapim/MG - Brasil

Carteira de Identidade MG17307902 SSP - MG - 16/01/2008

CPF 110.867.356-25

Formação acadêmica/titulação

- 2016 - 2021** Doutorado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Modulação da concentração intracelular de NAD⁺ e seu efeito na tumorigênese induzida por benzo[a]pireno em células epiteliais bronquiais humanas. Ano de obtenção: 2021
Orientador: Ana Paula de Melo Loureiro
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2021** Especialização em Especialização em Pesquisa Clínica e Medical Affairs.
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, FCMSCSP, Sao Paulo, Brasil
- 2019** Especialização em Aplicação da abordagem Farmacocinética-Farmacodinâmica (PK/PD) para efetivi.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2011 - 2015** Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Bage, Brasil
Título: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR CLAE, ESTUDO DE SEGURANÇA BIOLÓGICA E ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE POTÊNCIA E SENSIBILIDADE PARA DANOFLOXACINO EM SOLUÇÃO INJETÁVEL
Orientador: Clésio Soldateli Paim; Cheila Denise Ottonelli Stopiglia

Formação complementar

- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Procedimentos operacionais da plataforma Brasil. (Carga horária: 2h).
Hospital Moínhos de Vento, HMMV, Porto Alegre, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Elaborando um protocolo de ensaio Clínico: considerações estatísticas, étic.
(Carga horária: 10h).
Hospital Moínhos de Vento, HMMV, Porto Alegre, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Documentos obrigatórios em protocolos. (Carga horária: 2h).
Hospital Moínhos de Vento, HMMV, Porto Alegre, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Ética em Pesquisa. (Carga horária: 8h).
Hospital Santa Marcelina, AAGAPE, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Aspectos Regulatórios em Pesquisa Clínica de Medicamentos: foco na Agênci.
(Carga horária: 27h).
Instituto Racine, RACINE, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Elaborando um protocolo de ensaio Clínico: população, intervenção/exposição. (Carga horária: 10h).
Hospital Moínhos de Vento, HMMV, Porto Alegre, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Elaborando um protocolo de ensaio clínico randomizado: racional, objetivos.
(Carga horária: 10h).
Hospital Moínhos de Vento, HMMV, Porto Alegre, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Marcos regulatórios do Sistema CEP/Conep para o processo de análise ética d.
(Carga horária: 2h).
Hospital Moínhos de Vento, HMMV, Porto Alegre, Brasil

- 2018 - 2018** Curso de curta duração em Introduction to benchmark dose modelling using the PROAST software. (Carga horária: 6h).
54 Congress of the European Societies of Toxicology, EUROTOX, Bélgica
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em Treinamento para manutenção preventiva de HPLC-ESI-MS/MS. (Carga horária: 30h).
Water Technologies do Brasil, WATERS, Barueri, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Fundamentos e aplicações da espectrometria de massas. (Carga horária: 6h).
Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Sao Paulo, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Vias de Administração e Métodos de Avaliação de Es. (Carga horária: 4h).
Unipampa, UNIPAMPA, Brasil
Bolsista do(a): Unipampa
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Técnica de aplicação de Injetáveis. (Carga horária: 12h).
Conselho Regional de Farmácia, CRF-RS, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Regional de Farmácia
- 2013 - 2013** Extensão universitária em Curso de Toxicologia Forense. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Bage, Brasil
Bolsista do(a): Unipampa
- 2013 - 2013** Extensão universitária em Farmacêutico na Praça. (Carga horária: 7h).
Conselho Regional de Farmácia do Rio Grande do Sul, CRFRS, Porto Alegre, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Regional de Farmácia
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Redação formatação de artigos científicos. (Carga horária: 20h).
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Bage, Brasil
Bolsista do(a): Grupo de Pesquisa em Fisiologia Humana
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Técnicas de elaboração e formatação de trabalhos. (Carga horária: 3h).
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Bage, Brasil
Bolsista do(a): Unipampa
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Operação e manutenção básica do Sistema de HPLC. (Carga horária: 12h).
SCIENTIFIC INSTRUMENTS CO, SINC, Brasil
Bolsista do(a): Unipampa
- 2011 - 2011** Extensão universitária em Células Tronco. (Carga horária: 16h).
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Bage, Brasil
Bolsista do(a): Unipampa
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Boas Práticas de Neurofarmacologia. (Carga horária: 30h).
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Bage, Brasil
Bolsista do(a): Unipampa
- 2010 - 2010** Extensão universitária em I Seminário sobre o idoso. (Carga horária: 4h).
Prefeitura de Caratinga, SMDS, Brasil
Bolsista do(a): Secretaria Municipal de desenvolvimento Social

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. BAIROS, Andre V.; BAPTISTA, Danilo P.; CORDEIRO, Everson Willian Fialho; PAIM, Clésio Soldateli; SILVA, Fabiana Ernestina Barcellos da; MELESUIK, Marcelo Donadel; PAULA, Fávero R. Evaluation of the influence of fluoroquinolone chemical structure on stability: forced degradation and in silico studies. BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES (ONLINE). **JCR**, v.54, p.1 - , 2018.
2. CAMARGO, Vanessa Brum de; CASSOL, José Pedro; FARIAS, Lidiane Silveira; BATISTA, Luiz Alcides das Chagas; CORDEIRO, Everson Willian Fialho; WINGERT, N. R.; GARCIA, Cássia Virginia; MENDEZ, Andreas Sebastian Loureiro Evaluating the In Vitro Release of Antipsychotic Paliperidone in OROS® Tablets by Dissolution Profile Investigation. LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY. **JCR**, v.36, p.639 - , 2017.
3. CAMARGO, Vanessa Brum de; CASSOL, José Pedro Etchepare; FARIAS, Lidiane; CORDEIRO, Everson Willian Fialho; WINGERT, Nathalie Ribeiro; GARCIA, Cássia Virginia; MENDEZ, Andreas Sebastian Loureiro Evaluating the In Vitro Release of Antipsychotic Paliperidone in OROS® Tablets by Dissolution Profile Investigation. Latin American Journal of Pharmacy. Latin American Journal of Pharmacy. **JCR**, v.36, p.639 - 646, 2017.
4. BARBOSA, Fabio de Souza; CASSOL, José Pedro; BATISTA, Luiz Alcides das Chagas; CORDEIRO, Everson Willian Fialho; SANTOS, Mari Castro dos; POHLMANN, A. R.; SCHAPAVAL, Elfrides Eva; GARCIA, Cássia Virginia; MENDEZ, Andreas Sebastian Loureiro Stability of doripenem in reconstituted solution - thermal and oxidative decomposition kinetics and degradation products by LC-MS.. Biomedical Chromatography. **JCR**, v.31, p.394 - , 2017.
5. MERLUGO, Liara; SANTOS, Mari Castro dos; SANTANNA, Liane Santariano; CORDEIRO, Everson Willian Fialho; BATISTA, Luiz Alcides das Chagas; MIOTTO, Silvia T. S.; GARCIA, Cássia Virginia; MOREIRA, Cleci Meneses; MENDEZ, Andreas Sebastian Loureiro Alkaloids in Erythrina by UPLC-ESI-MS and In Vivo Hypotensive Potential of Extractive Preparations. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Online). **JCR**, v.2015, p.1 - 12, 2015.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. CORDEIRO, Everson Willian Fialho; SANTOS, Matheus Relvas dos; CURY, t; OLIVEIRA, Joseana de; FACCIO, A. T.; MAGGI, M. F.; MEDEIROS, Marisa H. G.; MASCIO, Paolo di; LOUREIRO, Ana Paula de Melo Effects of nicotinamide riboside on energetic metabolism of BEAS-2B cells exposed to benzo[a]pirene In: Hallmarks of Cancer, Cell Symposia, 2019, Seattle. **Effects of nicotinamide riboside on energetic metabolism of BEAS-2B cells exposed to benzo[a]pirene**, 2019.
2. CORDEIRO, Everson Willian Fialho; SANTOS, Matheus Relvas dos; CURY, t; OLIVEIRA, Joseana de; FACCIO, A. T.; MAGGI, M. F.; MEDEIROS, Marisa H. G.; MASCIO, Paolo di; LOUREIRO, Ana Paula de Melo Nicotinamide Riboside Protects BEAS-2B Cells Exposed to Benzo[a]Pirene Against Transformation In: Advances in metabolic Communication, Nature conference, 2019, Rio de Janeiro. <http://www.nature.com/natureconferences/amc19/index.html>, 2019.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. OLIVEIRA, Joseana de; CORDEIRO, Everson Willian Fialho; SILVA, Giovanna Caroline; SANTOS, Matheus Relvas dos; MEDEIROS, Marisa H. G.; MASCIO, Paolo di; LOUREIRO, Ana Paula de Melo Effects of Fumarate on Transformation and Epigenetic Marks of BEAS-2B Cells In: World Toxicologic Pathology Congress, 2018, SÃO PAULO. **Abstract** . , 2018.
2. CORDEIRO, Everson Willian Fialho; OLIVEIRA, Joseana de; RELVAS, Matheus; OLIVEIRA, Tiago; SILVA, Giovanna Caroline; MEDEIROS, Marisa Helena Gennari de; LOUREIRO, Ana Paula de Melo Effects of Nicotinamide Riboside Supplementation on Benzo[a]pyrene Induced Cellular Transformation In: World Toxicologic Pathology Congress, 2018, SÃO PAULO. **Abstract** . , 2018.
3. RELVAS, Matheus; CORDEIRO, Everson Willian Fialho; MASCIO, Paolo di; MEDEIROS, Marisa Helena Gennari de; LOUREIRO, Ana Paula de Melo Modulação do metabolismo de células epiteliais bronquiais humana por nicotinamida ribosídeo In: 26 Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 2018, São Paulo. **Ciências biológicas** . , 2018.
4. OLIVEIRA, Joseana de; CORDEIRO, Everson Willian Fialho; SILVA, Giovanna Caroline; RELVAS, Matheus; MEDEIROS, Marisa Helena Gennari de; MASCIO, Paolo di; LOUREIRO, Ana Paula de Melo MODULATION OF EPIGENETIC MARKS AND CELL TRANSFORMATION IN CULTURE OF NORMAL HUMAN CELLS SUPPLEMENTED WITH FUMARATE In: VIII SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS – SIMPAC AND III INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PATHOPHYSIOLOGY AND TOXICOLOGY - ISPAT H, 2018, São Paulo. **Carcinogênese** . , 2018.
5. CORDEIRO, Everson Willian Fialho; OLIVEIRA, Joseana de; SANTOS, Matheus Relvas dos; SILVA, Giovanna Caroline; OLIVEIRA, Tiago F.; MEDEIROS, Marisa H. G.; MASCIO, Paolo di; LOUREIRO, Ana Paula de Melo MODULATION OF THE INTRACELLULAR CONCENTRATION OF NAD+ AND IT'S EFFECT ON THE BENZO[A]PYRENE INDUCED TRANSFORMATION OF HUMAN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS In: VIII SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS – SIMPAC AND III INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PATHOPHYSIOLOGY AND TOXICOLOGY - ISPAT, 2018, SÃO PAULO. **Abstracts** . , 2018.
6. CORDEIRO, Everson Willian Fialho; HILGERT, Renata Medeiros; SOUZA, Raul de Oliveira; OLIVEIRA, Luís Flávio de Souza; MACHADO, Michel Mansur; STOPIGLIA, Cheila Denise Ottonelli; PAIM, Clésio Soldatelli EVALUATION OF THE EFFECTS OF CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF DANOFLOXACIN SAMPLES SUBMITTED TO FORCED DEGRADATION ASSAY In: II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology and VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas, 2016, São Paulo. **SIMPAC** . , 2016.
7. CORDEIRO, Everson Willian Fialho; HILGERT, Renata Medeiros; BATISTA, Luiz Alcides das Chagas; STOPIGLIA, Cheila Denise Ottonelli; PAIM, Clésio Soldatelli Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and Escherichia coli to danofloxacin injectable solution in the presence of the degradation product obtained under photolytic conditions In: Simpósio de Comemoração dos 50 anos de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica) da UFPR **Simpósio de Comemoração dos 50 anos de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica) da UFPR** . , 2015.
8. CORDEIRO, Everson Willian Fialho; BATISTA, Luiz Alcides das Chagas; REIS, Rafael Henrique Dias; SAUZEM, Patrícia Dutra Atenção Farmacêutica a idosos do projeto Ativa Idade: um relato de experiência de integração entre ensino e extensão In: IV Salão Internacional de Pesquisa Ensino e Extensão, 2014, Bágé. **IV Salão de Ensino Pesquisa e Extensão** . , 2014.
9. CORDEIRO, Everson Willian Fialho; CASSOL, José Pedro; BARBOSA, Fabio de Souza; BATISTA, Luiz Alcides das Chagas; GARCIA, Cássia Virginia; MENDEZ, Andreas Sebastian Loureiro Estudo de decomposição oxidativa do fármaco paliperidona em comprimidos de liberação osmótica In: IV Salão Internacional de Ensino Pesquisa e Extensão, 2014, Bagé. **IV Salão Internacional de Ensino Pesquisa e Extensão** . , 2014.
10. BATISTA, Luiz Alcides das Chagas; FARIAS, Lidiane Silveira; CORDEIRO, Everson Willian Fialho; MELESUIK, Marcelo Donadel; MENDEZ, Andreas Sebastian Loureiro ESTUDO PRELIMINAR DE LIBERAÇÃO IN VITRO DE PALIPERIDONA A PARTIR DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA In: 66ª Reunião Anual da SBPC, 2014, Rio Braco- AC. **66ª Reunião Anual da SBPC** . , 2014.
11. CORDEIRO, Everson Willian Fialho; BATISTA, Luiz Alcides das Chagas; HELLWIG, Fernanda; MELESUIK, Marcelo Donadel; SILVA, Fabiana Ernestina Barcellos da Estudos de parâmetros do Controle de Qualidade de comprimidos de Glibenclâmida disponibilizados na farmácia do Posto de Saúde municipal de Uruguaiana-RS In: III Semana Acadêmica da Farmácia - II Mostra de Trabalhos Científica e Mostra cultural, 2014, Uruguaiana. **III Semana Acadêmica da Farmácia - II Mostra de Trabalhos Científica e Mostra cultural** . , 2014.
12. BATISTA, Luiz Alcides das Chagas; MERLUGO, Liara; GARCIA, Cássia Virginia; SANTOS, Mari Castro dos; CORDEIRO, Everson Willian Fialho; MENDEZ, Andreas Sebastian Loureiro INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS VEGETAIS OBTIDOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO ERYTHRINA (FABACEAE) In: INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS VEGETAIS OBTIDOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO ERYTHRINA (FABACEAE), 2014, Bagé. **VI Salão Internacional de Ensino Pesquisa e Extensão** . , 2014.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. BAIRROS, Andre V.; BAPTISTA, Danilo P.; CORDEIRO, Everson Willian Fialho; PAIM, Clesio Soldatelli; SILVA, Fabiana Ernestina Barcellos da; MELESUIK, Marcelo Donadel; PAULA, Fávoro R. PHOTOCATALYTIC DEGRADATION OF FLUOROQUINOLONES: COMPARISON OF DIFFERENT STRUCTURES AND IN SILICO STUDIES In: III Congress ABCF, 2016, Porto Alegre. **PHOTOCATALYTIC DEGRADATION OF FLUOROQUINOLONES: COMPARISON OF DIFFERENT STRUCTURES AND IN SILICO STUDIES** . , 2016.
2. CORDEIRO, Everson Willian Fialho; BATISTA, Luiz Alcides das Chagas; CASSOL, José Pedro; STOPIGLIA, Cheila Denise Ottonelli; PAIM, Clésio Soldatelli Delineamento de condições experimentais para validação de ensaio microbiológico para danofloxacin em solução injetável In: III Simpósio Anual do PPG Bioquímica, 2015, Uruguaiana. **III Simpósio Anual do PPG Bioquímica** . , 2015.

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões em andamento

Iniciação científica

1. Matheus Relvas. **Modulação de adutos de DNA, do metabolismo e de marcas epigenéticas em cultura de células humanas normais suplementadas com benzo[a]pireno, NAD+, succinato e/ou fumarato: implicações para a tumorigênese.** 2017. Iniciação científica - Faculdade de Ciências Farmaceuticas
Inst. financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
2. Giovanna Caroline Silva. **Modulação de adutos de DNA, do metabolismo e de marcas epigenéticas em cultura de células humanas normais suplementadas com benzo[a]pireno, NAD+, succinato e/ou fumarato: implicações para a tumorigênese.** 2017. Iniciação científica - Faculdade de Ciências Farmaceuticas

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **Advance in metabolic Communication - Nature concerence**, 2019. (Congresso)
2. **Hallmarks of cancer**, 2019. (Simpósio)
3. **54 Congress of the European Societies of Toxicology**, 2018. (Congresso)
4. **VIII SIMPÓSIO DE PÓSGRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS – SIMPAC AND III INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PATHOPHYSIOLOGY AND TOXICOLOGY - ISPAT**, 2018. (Seminário)
5. **World Toxicologic Pathology Congress**, 2018. (Congresso)
6. **Ciclo de Palestras em Toxicologia - Toxicologia e Suas Implicações Clínicas e Forenses**, 2016. (Seminário)
7. **II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology and VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas**, 2016. (Simpósio)
8. **III Simpósio Anual do PPG Bioquímica**, 2015. (Simpósio)
9. **Simpósio Comemorativo dos 50 anos do Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) da UFPR**, 2015. (Simpósio)
10. **VI Simpósio de Pós Graduação em Análises Clínicas - SIMPAC - I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology**, 2015. (Simpósio)
11. **X Jornada em Farmacologia da UFPR**, 2015. (Outra)
12. **37º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2014. (Congresso)
13. **Colóquios em Fisiologia do Sistema Nervoso intitulada "Estresse pré-natal e repercussões sobre o desenvolvimento do Sistema Nervoso"**, 2014. (Outra)
14. **I Simpósio Gaúcho de Química Medicinal e Inovação em Saúde**, 2014. (Simpósio)
15. **II Simpósio do PPG Bioquímica da Universidade Federal do Pampa**, 2014. (Simpósio)
16. **III Semana Acadêmica de Farmácia**, 2014. (Encontro)
17. **VI Salão Internacional de Ensino Pesquisa e Extensão (VI SIEPE)**, 2014. (Congresso)
18. **Curso de Toxicologia Forense**, 2013. (Seminário)
19. **II Semana Acadêmica de Farmácia**, 2013. (Outra)
20. **V Salão Internacional de Ensino Pesquisa e Extensão (V SIEPE)**, 2013. (Congresso)
21. **Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionada -COLACRO XIV-2012**, 2012. (Congresso)
22. **II Simpósio de Atualização em Fisiologia do Sistema Nervoso e II Mostra de Projetos em Fisiologia s**, 2012. (Simpósio)
23. **IV SIEPE Salão Internacional de Ensino Pesquisa e Extensão o**, 2012. (Congresso)
24. **I Semana Acadêmica de Farmácia**, 2011. (Outra)
25. **I Simpósio de Atualização em Fisiologia: Sistema Nervoso e I Mostra de Projetos em Fisiologia**, 2011. (Simpósio)
26. **III SIEPE Salão Internacional de Ensino Pesquisa e Extensão**, 2011. (Congresso)
27. **I Congresso Multiprofissional de Saúde da Família do Leste de Minas Gerais**, 2010. (Congresso)

28. I Congresso de Medicina de Família e Comunidade do Leste de Minas Gerais, 2010. (Congresso)

Organização de evento

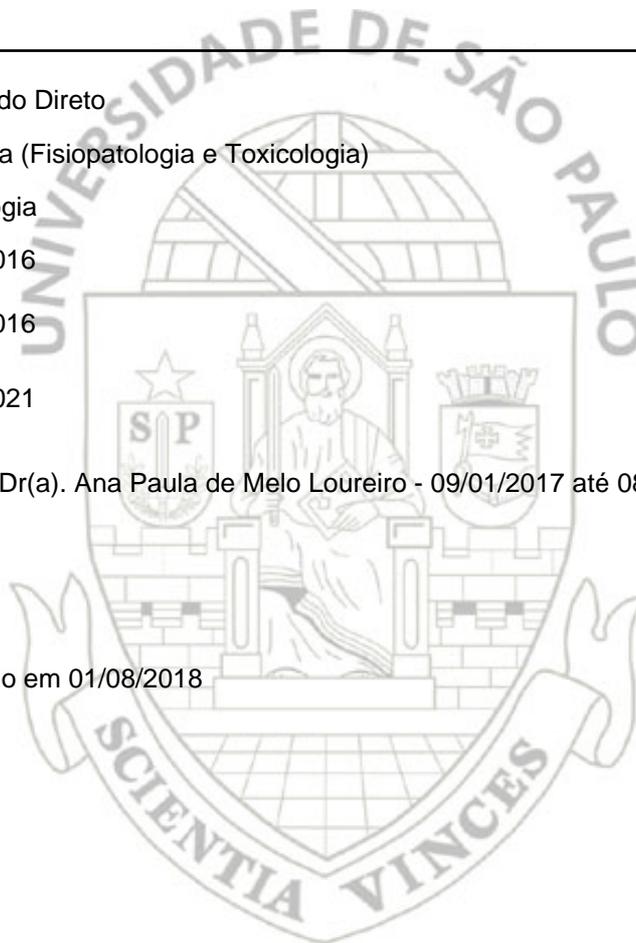
1. CORDEIRO, Everson Willian Fialho
III International Symposium on Pathophysiology and Toxicology and VIII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas, 2018. (Outro, Organização de evento)
2. CORDEIRO, Everson Willian Fialho
III Semana Acadêmica de Farmácia, 2014. (Outro, Organização de evento)
3. CORDEIRO, Everson Willian Fialho
Curso de Toxicologia Forense, 2013. (Outro, Organização de evento)
4. 🌟 CORDEIRO, Everson Willian Fialho
II Semana Acadêmica de Farmácia, 2013. (Outro, Organização de evento)
5. 🌟 CORDEIRO, Everson Willian Fialho
III SIEPE (Salão Internacional de Ensino Pesquisa e Extensão), 2011. (Congresso, Organização de evento)

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 03/05/2021 às 09:09:47.

9143 - 9968886 / 1 - Everson Willian Fialho Cordeiro

Email: fcord@usp.br
Data de Nascimento: 02/07/1992
Cédula de Identidade: RG - 17.307.902 - MG
Local de Nascimento: Estado de Minas Gerais
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Farmácia - Universidade Federal do Pampa - Rio Grande do Sul - Brasil - 2015

Curso: Doutorado Direto
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Toxicologia
Data de Matrícula: 04/07/2016
Início da Contagem de Prazo: 04/07/2016
Data Limite para o Depósito: 01/03/2021
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Paula de Melo Loureiro - 09/01/2017 até 08/04/2021 Email: apmlou@usp.br
Proficiência em Línguas:
Inglês, Aprovado em 04/07/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 01/08/2018



Data do Depósito do Trabalho: 25/02/2021

Título do Trabalho: "Modulação da concentração intracelular de NAD+ e seu efeito na tumorigênese induzida por benzo[a]pireno em células bronquiais epiteliais humanas"

Data Máxima para Aprovação da Banca: 12/04/2021

Data de Aprovação da Banca: 10/03/2021

Data Máxima para Defesa: 23/06/2021

Data da Defesa: 08/04/2021

Resultado da Defesa: Aprovado

Acesso à dissertação/tese: 'Banco de Teses da USP'

A titulação é: Somente USP

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Titulado em 08/04/2021

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
QBQ5893-1/1	Processos Redox em Bioquímica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	02/08/2016	14/11/2016	60	4	80	C	N	Concluída
FBC5766-4/3	Tópicos em Análises Clínicas IV	02/08/2016	14/11/2016	15	1	90	A	N	Concluída
MCM5923-1/1	Mecanismos de Carcinogênese (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	21/09/2016	04/10/2016	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/9	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	14/03/2017	27/03/2017	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5805-1/1	Lógica e Filosofia da Ciência	28/03/2017	10/07/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5752-4/1	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	22/06/2017	26/07/2017	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	15/08/2017	27/11/2017	15	1	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/5	Aprimoramento Pedagógico	12/09/2017	10/10/2017	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/5	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	06/02/2018	16/04/2018	90	6	80	B	N	Concluída

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793-14/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	05/03/2018	19/06/2018	15	1	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0425 - Toxicologia, ministrada aos alunos de graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. (1)	02/07/2018	30/11/2018	-	3	-	-	-	-
FBC5734-3/2	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais (2)	20/08/2018	26/08/2018	30	2	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina disciplina 0900102 - Farmacocinética e Toxicocinética, ministrada aos alunos de graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. (1)	01/02/2019	28/06/2019	-	2	-	-	-	-
FBC5792-5/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III (2)	12/03/2019	24/06/2019	15	1	100	A	N	Concluída
VRA5754-1/1	Aspectos Básicos de Biologia Molecular (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo) (2)	03/06/2019	16/06/2019	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	42
Estágios:			
Total:	0	25	42

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588/05, alterada pelas Portarias GR-4391/09 e GR-4601/09 - PAE e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 13/05/2020

Observações:

2) Disciplina(s) cursada(s) voluntariamente pelo(a) candidato(a) após ter cumprido as exigências regulamentares

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
329970	Ana Paula de Melo Loureiro	FCF - USP	Presidente
2276537	Eloiza Helena Tajara da Silva	FMSJRP(IB)	
7494529	Flavia Carla Meotti	IQ - USP	
8156537	Daiana Silva de Àvila	FMVZ - Externo	



Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo: <https://uspdigital.usp.br/iddigital>

Documento emitido às 09:10:44 horas do dia 03/05/2021 (hora e data de Brasília)

Código de controle: XTXW-PL59-PPS1-5HJR

Código de controle válido até: 03/06/2021