

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**EFEITOS DA NICOTINAMIDA RIBOSÍDEO EM LINHAGENS CELULARES DE
EPITÉLIO BRÔNQUICO HUMANO**

Lucas Gade Assunção

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador(a):

Prof.(a). Dr(a) Ana Paula de Melo
Loureiro

São Paulo

2024

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO	4
1.1 Linhagens Celulares BEAS-2B e 1198.....	4
1.2 Nicotinamida Ribosídeo	5
1.3 Estudos sobre o efeito da NR no câncer	8
1.4 Quimioprevenção e câncer de pulmão	9
2 OBJETIVOS	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Cultura de células BEAS-2B e 1198	10
3.2 Análise do crescimento e sobrevivência celular	10
3.3 Cálculo CL50	11
3.4 Formação de colônias em Soft-agar	11
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1 Citotoxicidade da NR em células BEAS-2B e 1198.	12
4.2 Análise Comparativa das CL50.....	16
4.3 Experimento de formação de colônias em meio semissólido <i>soft-agar</i>	16
4.4 Quimioprevenção.	18
5 CONCLUSÃO.....	19
6 REFERÊNCIAS.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP/ADP - Relação entre Adenosina Trifosfato e Adenosina Difosfato
B[a]P - benzo[a]pireno
BEAS-2B - Linhagem de Células Epiteliais Brônquicas Humanas
BEBM - Meio de Cultura Basal de Carcinogênese Modificado
CL50 - Concentração Letal para 50% das Células
CVD - Cristal Violeta
CSC - Condensado de Fumaça de Cigarro
DAPI - 4',6-Diamidino-2-Fenilindol
DMEM - Meio de Cultura Eagle Modificado por Dulbecco
G2/M - Fases do Ciclo Celular
IDO - Indoleamina 2,3-Dioxigenase
NAM - Nicotinamida
NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NaAD - Adenina Dinucleotídeo de Ácido Nicotínico
NaMN - Mononucleotídeo de Ácido Nicotínico
NaR - Ribosídeo de Ácido Nicotínico
NAPRT - Fosforibosiltransferase de Ácido Nicotínico
NADS - NAD Sintase
NAMPT - Fosforibosiltransferase de Nicotinamida
NMRK - Quinase de Ribosídeo de Nicotinamida
NMN - Mononucleotídeo de Nicotinamida
NMNAT - Adenililtransferase de Mononucleotídeo de Nicotinamida
NR - Ribosídeo de Nicotinamida
NOAEL - Nível de Efeito Adverso Não Observado
PBMCs - Células Mononucleares do Sangue Periférico
PARPs - Poli(ADP-ribose)polimerases
QA - Ácido Quinólinico
QPRT - Quinolinato Fosforibosil Transferase
RB - Retinoblastomas
SIRTs - Sirtuínas

NSCLC - Câncer de Pulmão Não Pequenas Células

CLC - Câncer de Pulmão de Células Pequenas

μM - Micromolar (unidade de concentração)

RESUMO

ASSUNÇÃO, L.G. **Efeitos da nicotinamida ribosídeo em linhagens celulares de epitélio brônquico humano**. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

O NAD⁺ é essencial para várias funções celulares, incluindo reparo do DNA, metabolismo e sinalização. A nicotinamida ribosídeo (NR) aumenta a concentração de NAD⁺ e demonstrou melhorar a função mitocondrial, além de ter potencial na prevenção do câncer. Estudos sugerem que o aumento de NAD⁺ inibe o crescimento tumoral, mas os mecanismos pelos quais a NR atua ainda não são claros.

Em experimentos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Metabolismo Redox em Toxicologia FCF-USP, foram investigados os impactos da suplementação de nicotinamida ribosídeo (NR) nas células do epitélio brônquico.

Os experimentos realizados avaliaram o crescimento celular, a sobrevivência e a formação de colônias em *soft-agar* de linhagens celulares expostas a diferentes concentrações de NR.

Os resultados obtidos nesses experimentos sugerem que a NR pode ter efeitos citotóxicos seletivos em células pré-malignas, abrindo novas perspectivas para sua aplicação na prevenção do câncer. Esses achados enfatizam a importância de continuar a pesquisa sobre os mecanismos de ação da NR, visando aprofundar nosso entendimento sobre seu papel na saúde celular e suas possíveis implicações terapêuticas.

Palavras-chave: Carcinogênese; Quimioprevenção; Metabolismo Celular; Nicotinamida ribosídeo

1. INTRODUÇÃO

1.1 Linhagens Celulares BEAS-2B e 1198.

A linhagem celular BEAS-2B foi desenvolvida conforme descrito na patente de Reddel et al. (1989), em que células epiteliais brônquicas humanas foram imortalizadas por infecção com o vírus híbrido adenovírus 12-SV40, seguido de passagens celulares consecutivas. Esse processo resultou na alteração de proteínas ligantes e inativadoras de reguladores do crescimento celular, como p53 e o produto do gene do retinoblastoma (RB), permitindo o crescimento contínuo dessas células (Lundberg et al., 2002; Ramirez et al., 2004). Desde então, a BEAS-2B tem sido amplamente utilizada para investigar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na carcinogênese pulmonar (Shahid et al., 2023). Essa característica a distingue de células tumorais malignas, tornando-as adequadas para estudos de toxicidade (REDDEL, R. R. et al, 1989). Embora as células BEAS-2B não sejam tumorigênicas, elas apresentam facilidade de transformação devido à susceptibilidade a mutações (Lundberg et al., 2002; Ramirez et al., 2004). Explorando essa característica, nosso grupo tem utilizado benzo[a]pireno (B[a]P) como indutor de transformação maligna em células BEAS-2B (CORDEIRO, 2021)

Em nosso grupo de pesquisa, temos utilizado as células BEAS-2B e a linhagem 1198 como modelos experimentais. A linhagem celular 1198, é derivada de células BEAS-2B após exposição ao condensado de fumaça de cigarro (CSC) em um sistema de xenotransplante (Klein-Szanto et al., 1992). As células BEAS-2B foram inoculadas em traqueias de ratos Fischer 344, que foram transplantadas para o tecido subcutâneo dorsal de camundongos atímicos nus. Durante o processo, as células foram expostas a CSC, e, após seis meses, desenvolveram tumores dos quais diversas linhagens celulares, incluindo a 1198, foram derivadas (Klein-Szanto et al., 1992; Kim et al., 1995). As células 1198 são categorizadas como pré-malignas, ou seja, são imortalizadas, mas não tumorigênicas. Diferentemente de outras células derivadas de BEAS-2B, as células 1198 não formam tumores quando inoculadas em camundongos nude (Klein-Szanto et al., 1992; Kim et al., 1995). Estudos demonstraram que as células 1198 apresentam resistência a tratamentos com retinoides, como o ácido all-trans retinoico (t-RA), que normalmente inibe o crescimento celular. Essa resistência é uma característica de células em processo de transformação maligna, marcando um

passo significativo em direção ao desenvolvimento do câncer, apesar de ainda manterem um perfil não tumorigênico (Kim et al., 1995).

1.2 Nicotinamida Ribosídeo

O NAD^+ é co-substrato para atividades de enzimas (poli-ADP-ribose-polimerases, ADP-ribose transferases, sirtuínas, ADP-ribose cíclico sintetases) que participam de diversos processos celulares fundamentais, tais como reparo e replicação do DNA, transcrição, metilação do DNA, estabilidade genômica, sinalização celular, ciclo celular, apoptose, metabolismo mitocondrial, atividades de fatores de transcrição, modulação de enzimas antioxidantes, homeostase de cálcio. Adicionalmente, NAD^+ e NADH são coenzimas em etapas da via glicolítica e ciclo do ácido tricarboxílico e necessárias para a atividade da cadeia de transporte de elétrons e produção de ATP (Belenky et al., 2007).

Foi verificado em estudos que a Nicotinamida Ribosídeo (NR) gera NAD^+ intracelular a partir da ativação da via de Nicotinamida Ribosídeo Quinase. A NR é convertida em Nicotinamida Mononucleotídeo (NMN), que sofre ação das enzimas nicotinamida mononucleotídeo adenilil transferases (NMNATs) (Fletcher R. et al, 2017; Ratajczak J. et al, 2016). A Nicotinamida (NAM), juntamente com o ácido nicotínico (NA), é coletivamente conhecida como niacina ou vitamina B3. A NR é considerada parte da vitamina B3 devido à sua presença em alimentos e à sua conversão em NAD^+ . Outras moléculas também são consideradas precursores de NAD^+ , porém não são classificadas como vitamina B3, como o mononucleotídeo de nicotinamida (NMN), o mononucleotídeo de NA (NaMN), o ribosídeo de NA (NaR), o adenina dinucleotídeo de NA (NaAD) e o triptofano. (CORDEIRO et al., 2024).

A Figura 1 resume as vias de geração de NAD^+ a partir de diferentes precursores.

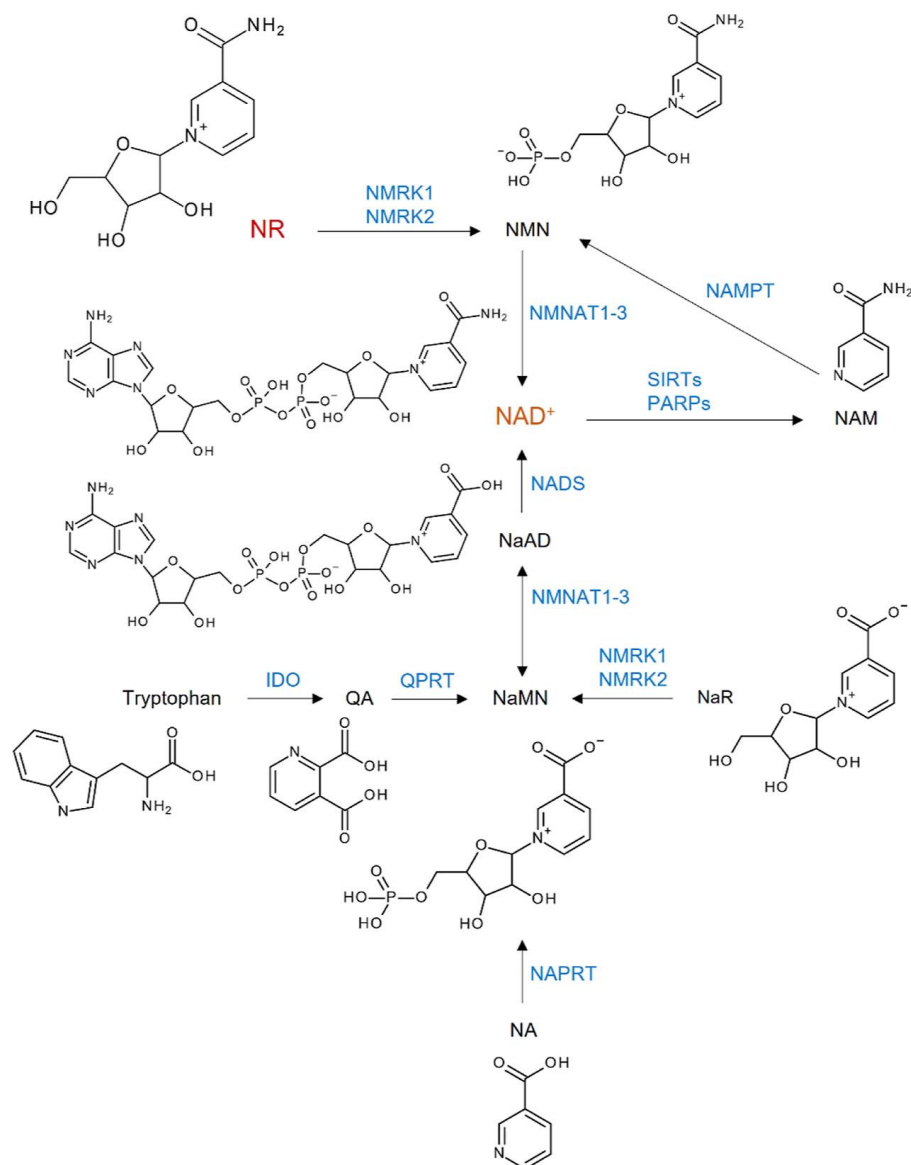


Figura 1. Vias de geração de NAD⁺. QA, ácido quinolínico; NaMN, mononucleotídeo de NA; NA, ácido nicotínico; NaR, ribosídeo de NA; NaAD, dinucleotídeo de adenina de NA; NAM, nicotinamida; NMN, mononucleotídeo de NAM; NR, ribosídeo de NAM; NAD⁺, dinucleotídeo de adenina de NAM; IDO, indoleamina 2,3-dioxigenase; QPRT, fosforribosiltransferase do ácido quinolínico; NAPRT, fosforribosiltransferase do NA; NMRK, quinase de ribosídeo de NAM; NMNAT, adenylyltransferase do mononucleotídeo de NAM; NADS, sintase de NAD; NAMPT, fosforribosiltransferase de NAM; SIRT6, sirtuínas; PARPs, polimerases de poli(ADP-ribose). Fonte: (CORDEIRO et al., 2024).

Na Tabela 1, são apresentados os resultados de estudos que avaliaram o aumento da concentração de NAD⁺ em diferentes modelos celulares, após a suplementação com a NR.

Tabela 1: Resultado do aumento de NAD⁺ a exposição de NR em diferentes células.

Linhagem Celular	Concentração de NR (µM)	Duração da Exposição	Aumento de NAD ⁺
Neuro 2a (neuroblastoma)	50–600	48 horas	Até 2 vezes
HEK293 (rim embrionário humano)	50–600	48 horas	Até 2 vezes
AB1 (células-tronco de camundongo)	50–600	48 horas	Até 2 vezes
C2C12 (miócitos murinos)	500 e 1000	24 horas	Até 2,7 vezes
Hepa1.6 (hepatoma murino)	500 e 1000	24 horas	Até 2,7 vezes
HEK293T (rim embrionário humano)	500 e 1000	24 horas	Até 2,7 vezes

Fonte: (CORDEIRO, 2024)

É importante destacar as diferenças nas concentrações de NAM encontradas nos meios de cultura utilizados em estudos *in vitro*. O meio BEBM ou LHC-9, usado no presente estudo, contém apenas 0,3 µM de NAM, conforme descrito por Fulcher et al. (2005). Em contraste, o meio DMEM, amplamente utilizado em outros estudos, apresenta concentrações significativamente mais altas de NAM, chegando a 32,7 µM (LIU et al., 2018). Essas variações podem exercer um impacto substancial nos níveis intracelulares de NAD⁺, influenciando a resposta celular à suplementação com NR. Isso ocorre porque a concentração de NAM no meio de cultura afeta diretamente a síntese de NAD⁺, sendo este o precursor predominante para a produção de NAD⁺ em células pulmonares, que carecem de algumas das enzimas necessárias para sintetizar NAD⁺ a partir do triptofano (LIU et al., 2018).

Por exemplo, a adição de 1 µM de NR ao meio BEBM ou LHC-9 resulta em um aumento de 4,3 vezes na disponibilidade de precursores de NAD⁺ para as células. Esse aumento é particularmente relevante ao considerar que as concentrações de NAM no plasma humano e no soro de camundongos variam entre 2 e 4 µM (ODUM; WAKWE, 2012), valores que estão próximos das concentrações de NAM usadas nos meios de cultura. Com isso, a diferença nas concentrações de NAM pode impactar diretamente a resposta obtida nos experimentos.

1.3 Estudos sobre o efeito da NR no câncer

Nos últimos anos, a suplementação com NR tem despertado grande interesse graças à sua função como precursora do NAD⁺ (CANTO, 2022), uma vez que o conteúdo de NAD⁺ tem sido inversamente correlacionado com o fenótipo maligno (Poljsak, 2016). Dados de diferentes estudos experimentais mostram que estratégias para aumentar os níveis de NAD⁺, tais como super expressão de enzimas que participam da sua produção, como NMNAT ou a suplementação com precursores, inibem o crescimento tumoral ou metástase (Rajman *et al.*, 2018; Galbraith *et al.*, 2019). Em estudos recentes, foi verificado que a suplementação com NR aumentou as concentrações de NAD⁺ no sangue total em 2,3 vezes. Também houve aumento das concentrações de nicotinato adenina dinucleotídeo (NAAD) e NMN, que são biomarcadores de uma maior biossíntese de NAD⁺ (Lapatto *et al.*, 2023).

Estudos de genotoxicidade, que incluíram o teste de Ames, o ensaio de aberração cromossômica *in vitro* e o ensaio de micronúcleo *in vivo*, demonstraram que NR não apresenta características mutagênicas ou clastogênicas (CONZE *et al.*, 2016).

Um nível de efeito adverso não observado (NOAEL) de 300 mg/kg/dia foi encontrado em um estudo de toxicidade subcrônica em ratos machos e fêmeas. O nível máximo seguro de ingestão de NR para humanos foi estimado em 3 mg/kg/dia, ou 180 mg/dia para uma pessoa de 60 kg, usando um fator de segurança de 100 vezes ao NOAEL observado no estudo subcrônico em ratos. Nos ratos que receberam a dose mais alta de NR (3000 mg/kg/dia), foram observados efeitos tóxicos como nefropatia, hipertrofia das células foliculares da tireoide, lesões hepáticas e hipertrofia da zona glomerulosa das glândulas adrenais (Conze *et al.*, 2016). NR está disponível como suplemento (cloreto de NR superior a 99%) (CORDEIRO *et al.*, 2024).

Foram encontrados 103 ensaios clínicos avaliando NR no banco de dados ClinicalTrials.gov (acessado em 10 de setembro de 2024), com alguns efeitos adversos relatados em poucos estudos que apresentaram resultados.

1.4 Quimioprevenção e câncer de pulmão

O termo "quimioprevenção" foi criado por Sporn e seus colaboradores em 1976 para se referir a intervenções farmacológicas ou dietéticas que possam interromper o processo de carcinogênese, levando a uma redução no risco de desenvolver câncer (Sporn et al., 1976, citado por Keith, 2009).

Em nossos projetos a NR surge como um composto de interesse, com o seu efeito protetor investigado em células que foram transformadas por indução do carcinógeno benzo[a]pireno (B[a]P) (CORDEIRO, 2021).

Diante da busca contínua por novas estratégias terapêuticas, a descoberta de moléculas com potencial quimiopreventivo é crucial, visto que apesar dos avanços na medicina atual, o câncer de pulmão costuma ser diagnosticado em estágios avançados, e isso direciona os esforços da comunidade científica em novos avanços na triagem focados em detecção precoce, tratamento e prevenção (New et al., 2018).

O câncer de pulmão foi o tipo de câncer mais diagnosticado em 2022, representando cerca de 2,5 milhões de novos casos (12,4% globalmente). No Brasil, as estimativas de 2023 posicionam o câncer de pulmão como o terceiro mais comum entre os homens (18.020 novos casos) e o quarto entre as mulheres (14.540 novos casos), excluindo os casos de câncer de pele não melanoma. Este tipo de câncer também é o líder em mortalidade, sendo responsável por aproximadamente 1,8 milhão de mortes no mundo, destacando-se como o primeiro entre os homens e o segundo entre as mulheres (Bray et al., 2024; INCA, 2022). Essa elevada taxa de mortalidade reforça a urgência de se compreender não apenas os aspectos epidemiológicos, mas também os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento carcinogênico.

2 OBJETIVOS

Comparar a citotoxicidade da NR nas linhagens celulares BEAS-2B e 1198, a fim de verificar se há seletividade citotóxica para a linhagem pré-maligna e revisar os resultados a partir do conhecimento atual sobre o tema.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células BEAS-2B e 1198

As linhagens BEAS-2B e 1198 foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Fekadu Kassie (Masonic Cancer Center, Universidade de Minnesota, Minneapolis, Estados Unidos). As culturas foram mantidas em meio BEGM (Bronchial Epithelial Growth Medium®), suplementado com o conjunto de cofatores do kit (extrato de pituitária bovina, insulina, hidrocortisona, hEGF, epinefrina, transferrina, ácido retinóico, triiodotironina, gentamicina e anfotericina). As células foram mantidas em garrafas e incubadas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.2 Análise do crescimento e sobrevivência celular

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 (24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h; N=5; inicialmente 2×10^4 células/poço), o meio de cultura foi removido e a camada celular cuidadosamente lavada duas vezes com solução salina fosfato tamponada (PBS) pH 7,0. Em seguida a solução de PBS foi removida dos poços e será adicionado metanol (100 µL) como agente fixador e 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 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 15×10^4 células/poço e a quantificação realizada em

espectrofotômetro com leitor de microplaca (SpectraMAX® ou Synergy H1 Multi-Mode Reader), disponibilizados pelos laboratórios da Profa. Sandra H. P. Farsky (FCF USP) e da Profa. Tania Marcourakis (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. Os resultados foram expressos em número de células e porcentagem.

3.3 Cálculo da CL50

Para determinar a concentração letal para 50% das células (CL50), as leituras de absorbância obtidas no experimento 3.2 foram utilizadas como indicativo de sobrevivência celular, em que menores valores de absorbância refletem maior letalidade celular. A letalidade percentual foi calculada em relação às células controle. Posteriormente, as concentrações foram convertidas em logaritmos, permitindo a construção de uma curva de dose-resposta. A partir da reta de regressão linear ajustada, foi possível determinar o valor de CL50, ou seja, a concentração necessária para causar a morte de 50% das células. Todos os cálculos e as análises foram realizados utilizando o software Microsoft Excel.

3.4 Formação de colônias em Soft-agar

O experimento foi realizado conforme descrito a seguir. Após os diferentes períodos de exposição a 1 μ M de NR (24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h; N=8; 2×10^4 células/poço), as células foram tripsinizadas e em seguida foram plaqueadas nas densidades de 10.000 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 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. Em seguida, foi feita a contagem das colônias com diâmetro igual ou superior a 100 μ m em microscópio invertido, utilizando-se aumento de 50 vezes, foram tiradas em média 35 fotos por poço.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Citotoxicidade da NR em células BEAS-2B e 1198.

Ao se desenvolverem, as células BEAS-2B e 1198 mantêm-se aderidas à superfície da placa de cultura. No entanto, quando entram em processo de morte celular, essa característica de adesão é perdida. Isso possibilita o acompanhamento do desenvolvimento e da sobrevivência das células por meio da coloração com cristal violeta (CVD), que se liga ao DNA das células (Feoktistova et al., 2016). Este procedimento é frequentemente empregado em experimentos *in vitro* por sua simplicidade e eficácia, permitindo a mensuração da densidade celular através da medição da absorção de luz, e, conseqüentemente, a quantidade de células aderidas (Feoktistova et al., 2016).

Conforme descrito em Material e Métodos foi realizado um teste de sobrevivência com essas células. Foram incubadas por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas com nicotinamida ribosídeo (NR) em concentrações de 0,5 μ M; 1 μ M; 2 μ M e um grupo controle. Os ensaios com concentrações variadas de NR mostraram citotoxicidade dose e tempo dependente, com células morrendo em períodos após 24 horas de incubação. As figuras abaixo mostram, por grupos e tempo de exposição, que a NR induz a morte da linhagem 1198.

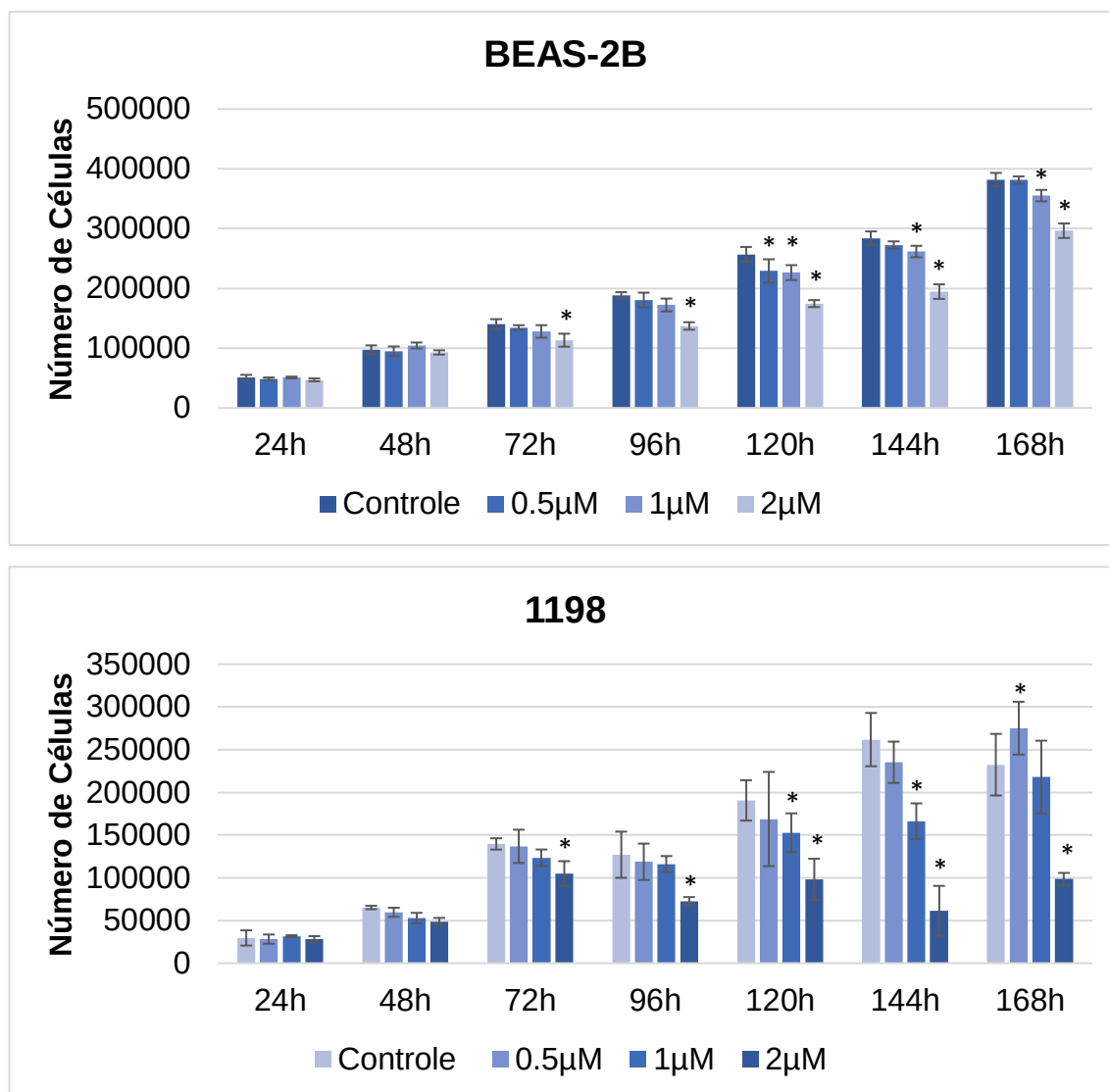


Figura 2: Efeito de NR na sobrevivência das células BEAS-2B e 1198. As células foram incubadas por 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h e 168h com NR nas concentrações 0,5; 1; 2 μ M e grupo controle. Visualização completa para análise comparativa. São apresentados os dados de número das células. ANOVA two-way com teste de comparações múltiplas de Tukey, N = 5, *p < 0,05.

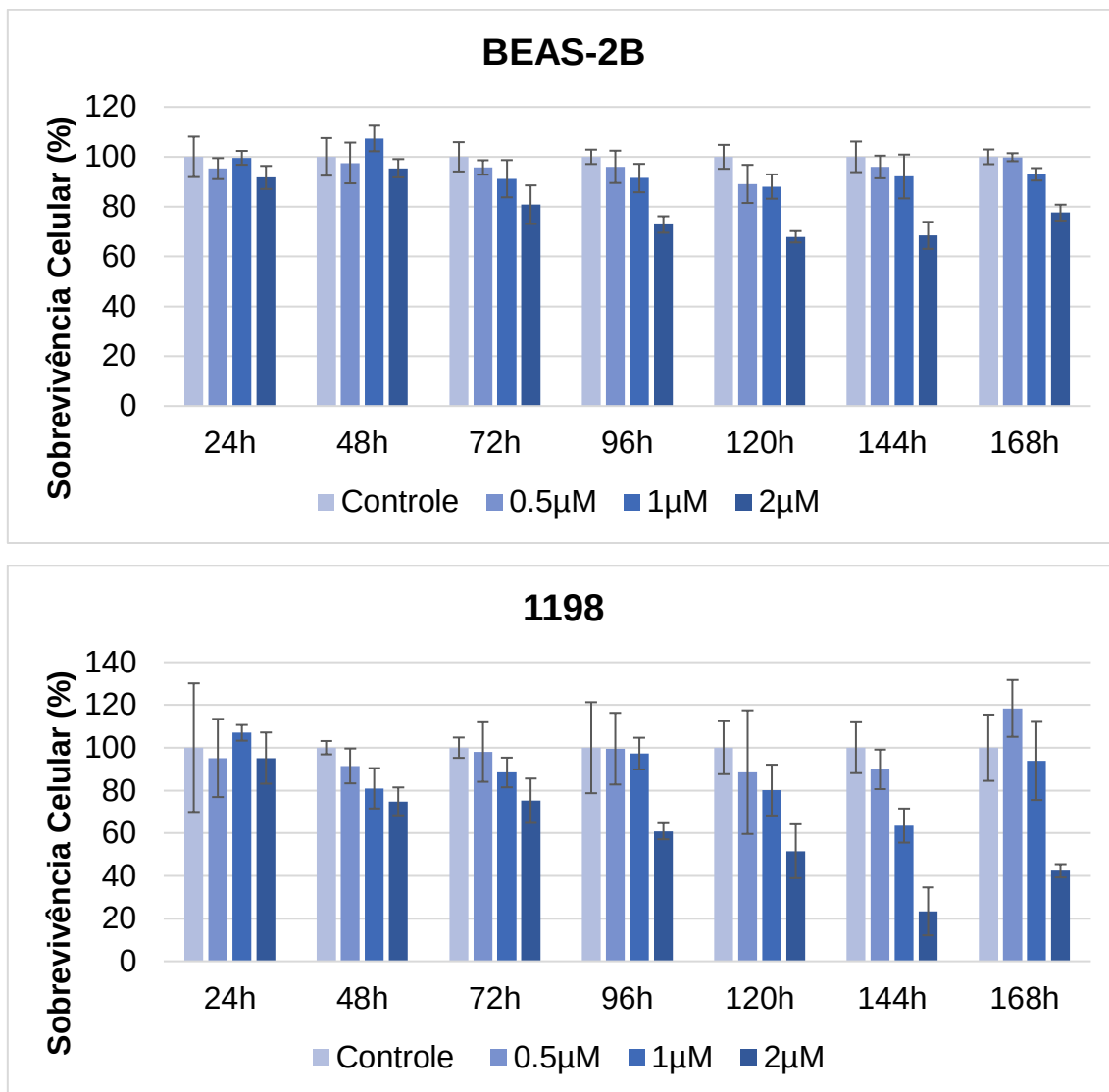


Figura 3: Efeito de NR na sobrevivência das células BEAS-2B e 1198. As células foram incubadas por 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h e 168h com NR nas concentrações 0,5; 1; 2 μ M e grupo controle. Visualização completa para análise comparativa. São apresentados os dados de sobrevivência relativa (%) das células.

Os resultados obtidos no presente estudo, utilizando o ensaio de citotoxicidade com cristal violeta, fazem parte das conclusões do artigo científico desenvolvido por nosso grupo de pesquisa sobre os efeitos da nicotinamida ribosídeo (NR) em células BEAS-2B (CORDEIRO et al., 2024).

O estudo mostrou que NR reduziu a respiração mitocondrial e causou estresse energético nas células BEAS-2B. Isso levou a uma menor razão ATP/ADP, mais apoptose e parada do ciclo celular na fase G2/M.

O artigo elaborado pelo grupo conclui que a linhagem celular pré-maligna 1198 é mais sensível a NR do que a linhagem BEAS-2B, sugerindo que as alterações metabólicas induzidas pela NR podem ter um impacto diferencial em células com diferentes estados de transformação celular. Esses achados indicam que os mecanismos moleculares que podem estar subjacentes à citotoxicidade observada, fornecem uma base para futuras investigações sobre o impacto da NR no metabolismo celular e na regulação da sobrevivência dessas células (CORDEIRO et al., 2024). Foi realizada uma busca bibliográfica nas bases de dados PubMed, Google Scholar e Web of Science utilizando as palavras-chave “nicotinamida Ribosídeo”, “NR”, “BEAS-2B”, “1198”, “Células pulmonares”, porém não foram encontrados, até a data da produção deste trabalho, estudos que avaliassem diretamente os efeitos da NR em linhagens pulmonares, como as células BEAS-2B e 1198

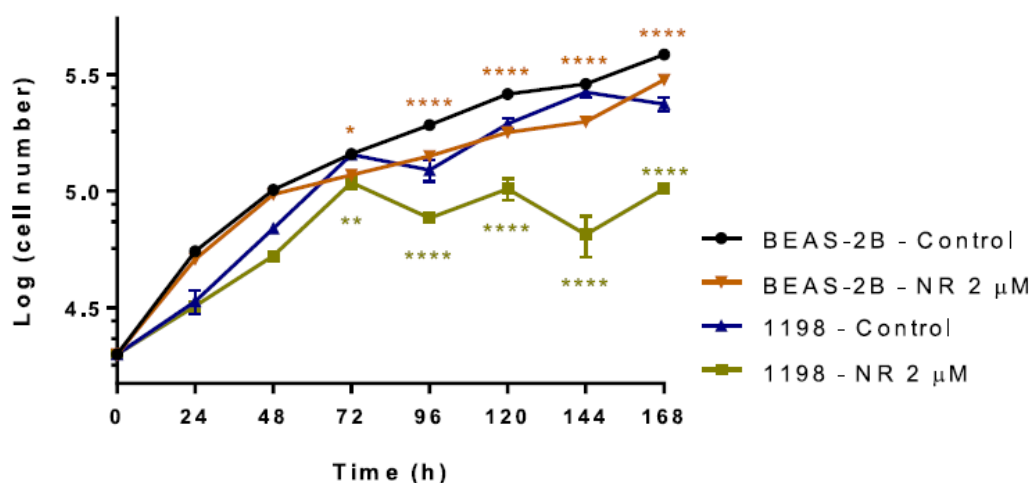


Figura 4: A NR é preferencialmente tóxica para a linhagem celular pré-maligna 1198 nas culturas em monocamada. O painel mostra as curvas de crescimento das linhagens celulares BEAS-2B e 1198, expostas ou não a 2 µM de NR. Os asteriscos indicam as diferenças significativas entre as células expostas e de controle de cada linhagem celular. Os testes estatísticos realizados foram: ANOVA de duas vias com teste de comparações múltiplas de Tukey, N = 5, *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,0001. Fonte: (CORDEIRO et al., 2024).

4.2 Análise Comparativa das CL50

Os dados da Tabela 1 destacam a maior sensibilidade da linhagem 1198 à nicotinamida ribosídeo (NR) em comparação à linhagem BEAS-2B, refletida pelas menores concentrações necessárias para induzir 50% de morte celular (CL50) ao longo do tempo de exposição. Após 72 horas de incubação, a CL50 para a linhagem 1198 foi de 3,22 μM , significativamente menor do que a concentração de 6,65 μM necessária para a BEAS-2B. Essa tendência se manteve ao longo de todo o período de exposição, com a diferença se acentuando em tempos mais prolongados. Por exemplo, após 144 horas, a CL50 da linhagem 1198 caiu para 1,24 μM , enquanto para a BEAS-2B foi de 3,46 μM . Esses resultados confirmam que a linhagem 1198 é mais suscetível aos efeitos citotóxicos da NR, o que sugere uma maior vulnerabilidade metabólica ou estrutural, possivelmente devido ao estado pré-maligno dessas células.

Tabela 2: Concentrações para indução de 50% de morte celular (CL50) nas linhagens BEAS-2B e 1198.

Exposição	CL50	
	BEAS-2B	1198
72h	6.65 μM	3.22 μM
96h	3.98 μM	2.41 μM
120h	5.24 μM	2.26 μM
144h	3.46 μM	1.24 μM
168h	2.47 μM	1.86 μM

4.3 Experimento de formação de colônias em meio semissólido *soft-agar*.

O ensaio de formação de colônias em meio semissólido de *soft agar* é uma técnica amplamente reconhecida para avaliar o crescimento celular independente de ancoragem em modelos experimentais *in vitro* (Borowicz et al., 2014).

O teste foi conduzido conforme especificado em Material e Métodos. No entanto, a pandemia de COVID-19 teve um impacto significativo na condução dos experimentos, resultando em atrasos e desafios operacionais. Um desses desafios ocorreu durante

a transferência das células para o meio semissólido, o que comprometeu a avaliação do desenvolvimento das colônias.

Com isso, se faz necessária uma repetição do experimento para garantir maior precisão nos resultados. Contudo, foram avaliados parcialmente os resultados do ensaio, e verificado que não foram observadas diferenças no número de colônias entre os grupos controle e aqueles expostos ao NR para ambas as linhagens. No entanto, as colônias de maior tamanho foram registradas na linhagem 1198. Para realizar a contagem das colônias, aproximadamente 35 campos de cada poço foram fotografados. Na figura 5 são apresentadas fotos representativas do experimento.

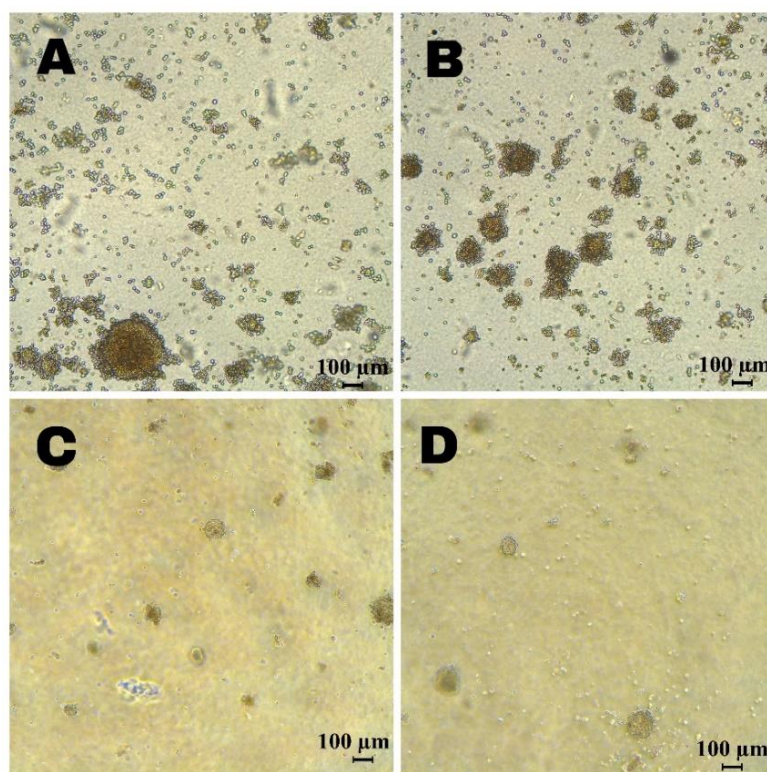


Figura 5 - Fotos obtidas do experimento de formação de colônias em meio semissólido soft-agar. A e B se refere a linhagem 1198 com adição de 1uM NR e controle, respectivamente. C e D se refere a linhagem BEAS-2B com adição de 1uM NR e controle, respectivamente.

4.4 Quimioprevenção.

O uso de compostos naturais ou sintéticos para inibir, retardar ou reverter a carcinogênese surge como uma estratégia promissora no combate ao câncer de pulmão. No âmbito desse trabalho, os achados indicam que a nicotinamida ribosídeo (NR), apesar de ser amplamente divulgada por suas capacidades de elevar os níveis de NAD⁺ e otimizar o metabolismo celular, pode ter uma função dupla. O efeito citotóxico notado nas células pré-malignas 1198 sugere que a NR pode funcionar como um agente quimiopreventivo ao provocar a morte celular de forma seletiva em células modificadas. (CORDEIRO et al., 2024).

Contudo, essa citotoxicidade distinta ressalta a importância de analisar minuciosamente as circunstâncias em que a NR é empregada, para assegurar que seus benefícios como complemento metabólico não sejam acompanhados de perigos para as células saudáveis. Estes resultados indicam que a NR pode ser útil em estratégias de quimioprevenção. (CORDEIRO et al., 2024)

5 CONCLUSÃO

Diante da alta incidência de câncer de pulmão revelada pelos estudos epidemiológicos, é necessário expandir o entendimento dos processos de carcinogênese e buscar novas estratégias de terapias e prevenção. Neste contexto, os achados deste estudo, em sincronia com as pesquisas desenvolvidas pelo grupo, respondem a essa demanda. A detecção de citotoxicidade seletiva em células pré-malignas 1198, diferentemente das células não transformadas BEAS-2B, indica que a NR pode funcionar como um regulador metabólico, capaz de alterar as estratégias de sobrevivência celular.

Os estudos em modelos 3D, que já estão sendo planejados pelo grupo de pesquisa, prometem proporcionar um progresso relevante no entendimento dos mecanismos que atuam tanto na transformação celular quanto na quimioprevenção. Através dessas análises, a expectativa é identificar alterações em painéis de metabólitos em diferentes fases do processo de carcinogênese e observar como essas modificações podem ser moduladas pela intervenção da NR, aumentando as chances de aplicação clínica.

6 REFERÊNCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer facts & figures 2024*. Atlanta: American Cancer Society, 2024. Disponível em: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2024.html>. Acesso em: 15 set. 2024.
- BELENKY, P.; BOGAN, K. L.; BRENNER, C. NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 32, p. 12, 2007.
- Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M. K., Tauler, J., Bikkavilli, R. K., & Winn, R. A. (2014). The soft agar colony formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, n. 92, 27 out. 2014.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 74, n. 3, p. 229–263, maio 2024.
- BROWN, K. D. et al. Activation of SIRT3 by the NAD⁺ precursor nicotinamide riboside protects from noise-induced hearing loss. *Cell Metabolism*, v. 20, n. 6, p. 1059–1068, 2 dez. 2014.
- CANTO, C. NAD⁺ Precursors: A Questionable Redundancy. *Metabolites*, 1 jul. 2022.
- CHUN, K.-H. et al. Effects of Deguelin on the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway and Apoptosis in Premalignant Human Bronchial Epithelial Cells. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <http://jnci.oxfordjournals.org/>.
- CONZE, D. B.; CRESPO-BARRETO, J.; KRUGER, C. L. Safety assessment of nicotinamide riboside, a form of Vitamin B3. *Human and Experimental Toxicology*, v. 35, n. 11, p. 1149–1160, 1 nov. 2016.
- CORDEIRO, E. W. F. et al. Nicotinamide riboside Induced Energy Stress and Metabolic Reprogramming in BEAS-2B Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 19 ago. 2024.
- 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, 2021

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

FLETCHER, R. S.; RATAJCZAK, J.; DOIG, C. L.; OAKEY, L. A.; CALLINGHAM, R.; DA SILVA XAVIER, G.; GARTEN, A.; ELHASSAN, Y. S.; REDPATH, P.; MIGAUD, M. E.; PHILP, A.; BRENNER, C.; CANTO, C.; LAVERY, G. G. Nicotinamide riboside kinases display redundancy in mediating nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in skeletal muscle cells. *Molecular Metabolism*, v. 6, n. 8, p. 819-832, 2017. DOI: 10.1016/j.molmet.2017.05.011

FULCHER, M. L.; GABRIEL, S.; BURNS, K. A.; YANKASKAS, J. R.; RANDELL, S. H. Well-Differentiated Human Airway Epithelial Cell Cultures. In: PICOT, J. (ed.). *Human Cell Culture Protocols*. Methods in Molecular Medicine, v. 107. Humana Press, 2005.

GALBRAITH, A. R.; SEABLOOM, D. E.; WUERTZ, B. R.; ANTONIDES, J. D.; STEELE, V. E.; WATTENBERG, L. W.; ONDREY, F. G. Chemoprevention of lung carcinogenesis by dietary nicotinamide and inhaled budesonide. *Cancer Prevention Research*, v. 12, p. 69, 2019.

GONG, B. et al. Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α regulated β -secretase 1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models. *Neurobiology of Aging*, v. 34, n. 6, p. 1581–1588, jun. 2013.

HONG, G. et al. Administration of nicotinamide riboside prevents oxidative stress and organ injury in sepsis. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 123, p. 125–137, 1 ago. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Câncer de pulmão. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pulmao>. Acesso em: 16 set. 2024

Keith, R. L. Chemoprevention of lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*, v. 6, n. 2, p. 187-193, 2009.

KIM, Y. H. et al. Retinoid refractoriness occurs during lung carcinogenesis despite functional retinoid receptors. *Cancer Research*, v. 55, p. 5603-5610, 1995.

KHAN, N. A. et al. Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Molecular Medicine*, v. 6, n. 6, p. 721–731, 2014.

KLEIN-SZANTO, A. J. P. et al. A tobacco-specific N-nitrosamine or cigarette smoke condensate causes neoplastic transformation of xenotransplanted, 1992.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. *Robbins e Cotran: bases patológicas das doenças*. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

LAPATTO, Helena A. K.; KIVILUOMA, Markus; HEIKKINEN, Anna; GRÖNROOS, Sari; SØRENSEN, Mette; SILLANPÄÄ, Sara; PÄÄKKÖNEN, Noora; SALO, Tiina; KUULA, Joonas; HAKKARAINEN, Anna; TIIHONEN, Jari; PIETILÄINEN, Kirsi; PEKKINEN, Emma; TÄHTINEN, Mikko-Roope; LUNDGREN, Natacha; GROOP, Päivi-Hannamari; LAITINEN, Maria; BRENNER, Charles; KORHONEN, Päivi; PAANANEN, Sari; OLLIKAINEN, Markus. Nicotinamide riboside improves muscle mitochondrial biogenesis, satellite cell differentiation, and gut microbiota in a twin study. *Science Advances*, v. 9, 2023. DOI: 10.1126/sciadv.add5163

LEE, H. J. et al. Nicotinamide Riboside Ameliorates Hepatic Metaflammation by Modulating NLRP3 Inflammasome in a Rodent Model of Type 2 Diabetes. *Journal of Medicinal Food*, v. 18, n. 11, p. 1207–1213, 1 nov. 2015.

LIU, H. et al. Histomorphological transformation from non-small cell lung carcinoma to small cell lung carcinoma after targeted therapy or immunotherapy: A report of two cases. *Frontiers in Oncology*, v. 12, 9 nov. 2022.

LIU, L. et al. Quantitative Analysis of NAD Synthesis-Breakdown Fluxes. *Cell Metabolism*, v. 27, n. 5, p. 1067-1080.e5, 1 maio 2018.

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.

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. 1, 1 dez. 2018.

NEW, M.; KEITH, R. Early Detection and Chemoprevention of Lung Cancer. *F1000Research*, v. 7, p. 61, 16 jan. 2018. DOI: 10.12688/f1000research.12433.1.

ODUM, E. P.; WAKWE, V. C. Plasma concentrations of water-soluble vitamins in

metabolic syndrome subjects. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, v. 15, n. 4, p. 442–447, out. 2012.

PARK, E. J. et al. Whole cigarette smoke condensates induce ferroptosis in human bronchial epithelial cells. *Toxicology Letters*, v. 303, p. 55–66, 15 mar. 2019.

PICKETT, G. et al. Effects of 10 cigarette smoke condensates on primary human airway epithelial cells by comparative gene and cytokine expression studies. *Toxicological Sciences*, v. 114, n. 1, p. 79–89, 15 dez. 2009.

POLJSAK, B.; MILISAV, I. Vitamin B3 forms as precursors to NAD⁺: Are they safe? *Trends in Food Science and Technology*, 1 set. 2018.

POLJSAK, J. NAD⁺ in cancer prevention and treatment: Pros and Cons. *Clinical and Experimental Oncology*, v. 5, p. 4, 2016.

RAJMAN, L.; CHWALEK, K.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of NAD-boosting molecules: The in vivo evidence. *Cell Metabolism*, v. 27, p. 529, 2018.

RAMIREZ, R. D. et al. O-205 Immortalization of normal human bronchial epithelial cells (NHBE) in the absence of viral oncoproteins. In: Lung Cancer, Anais...2004.

RATAJCZAK, J.; JOFFRAUD, M.; TRAMMELL, S. A.; RAS, R.; CANELA, N.; BOUTANT, M.; KULKARNI, S. S.; RODRIGUES, M.; REDPATH, P.; MIGAUD, M. E.; AUWERX, J.; YANES, O.; BRENNER, C.; CANTÓ, C. NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *Nature Communications*, v. 7, p. 13103, 2016.

REDDEL, R. R. et al. Immortalized human bronchial epithelial and mesothelial cell lines. United States Patent 4,885,238, 1989.

SHAHID, A.; CHEN, M.; LIN, C.; ANDRESEN, B. T.; PARSA, C.; ORLANDO, R.; HUANG, Y. The β -blocker Carvedilol Prevents Benzo(a)pyrene-Induced Lung Toxicity, Inflammation and Carcinogenesis. *Cancers*, v. 15, n. 3, p. 583, 2023

SPORN, M. B.; DUNLOP, N. M.; NEWTON, D. L.; SMITH, J. M. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc*, v. 35, p. 1332-1338, 1976.

TUMMALA, K. S. et al. Inhibition of De Novo NAD⁺ Synthesis by Oncogenic URI Causes Liver Tumorigenesis through DNA Damage. *Cancer Cell*, v. 26, n. 6, p. 826–839, 8 dez. 2014.

VLAHOS, I. et al. Lung cancer screening: Nodule identification and characterization.

Translational Lung Cancer Research, 1 jun. 2018.

YANG, Q. et al. Increasing ovarian NAD⁺ levels improve mitochondrial functions and reverse ovarian aging. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 156, p. 1–10, 20 ago. 2020.

ZHANG, X. et al. Systemic Treatment with Nicotinamide Riboside Is Protective in a Mouse Model of Light-Induced Retinal Degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 61, n. 10, 1 ago. 2020.

 Documento assinado digitalmente
LUCAS GADE ASSUNCAO
Data: 10/10/2024 14:29:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Data e assinatura do aluno(a)

Data e assinatura do orientador(a)

Assinatura: Ana Paula de Melo Loureiro
Ana Paula de Melo Loureiro (10 de outubro de 2024 19:42 ADT)

Email: apmlou@usp.br