ANDRÉA MIDORY MIYAKE MIZUSAKA

Avaliação *in vitro* dos efeitos da exposição crônica ao carcinógeno 4-(methylnitrosamino)-1-(-3-pyridyl)-1-butanone(NNK) em hepatócitos murinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2020

ANDRÉA MIDORY MIYAKE MIZUSAKA

Avaliação *in vitro* dos efeitos da exposição crônica ao carcinógeno 4-(methylnitrosamino)-1-(-3-pyridyl)-1-butanone(NNK) em hepatócitos murinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profª. Drª. Maria Lucia Zaidan Dagli

Versão original.

São Paulo

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Miyake Mizusaka, Andrea Midory
Avaliação in vitro dos efeitos da exposição crônica ao carcinógeno 4-(methylnitrosamino)-1-(-3-pyridyl)-1-butanone(NNK) em hepatócitos murinos / Andrea Midory Miyake Mizusaka; orientador Maria Lucia Zaidan Dagli. -- São Paulo, 2020.
131 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. NNK. 2. Hepatócitos. 3. Tabagismo. 4. Nitrosaminas. I. Zaidan Dagli, Maria Lucia , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Andrea Midory Miyake Mizusaka

Título da Tese Avaliação in vitro dos efeitos da exposição crônica ao carcinógeno 4-(methylnitrosamino)-1-(-3-pyridyl)-1-butanone(NNK) em hepatócitos murinos

Orientadora: Profª. Drª. Maria Lucia Zaidan Dagli

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o candidato

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação in vitro dos efeitos da exposição crônica ao carcinógeno 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) em hepatócitos murinos. .", protocolada sob o CEUA nº 7882140818 (ID 005800), sob a responsabilidade de **Maria Lucia Zaidan Dagli** *e equipe; Andrea Midory Miyake* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 21/11/2018.

We certify that the proposal "In vitro evaluation effects of the chronic exposure to carcinogen 4- (methylnitrosamino) -1- (3-pyridyl) -1-butanone (NNK) in murine hepatocytes.", utilizing 60 Isogenics mice (60 males), protocol number CEUA 7882140818 (ID 005800), under the responsibility of **Maria Lucia Zaidan Dagli** *and team; Andrea Midory Miyake* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/21/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 06/2018 a 09/2018 Área: Oncologia

Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP						
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade:	1 a 4 meses	N:	60
Linhagem:	Swiss e Nude			Peso:	30 a 40 g		

Local do experimento: LABORATÓRIO DE ONCOLOGIA EXPERIMENTAL E COMPARADA do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

São Paulo, 25 de março de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

São Paulo, 25 de março de 2020
CEUAx N 5026060317

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Maria Lúcia Zaidan Dagli
Área: Patologia Experimental E Comparada
Maria Lucia Zaidan Dagli (orientador)

Título do projeto: "Avaliação in vitro dos efeitos da exposição crônica ao carcinógeno 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyrid-l)-1-butanone (NNK) em hepatócitos murinos. ".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 15/03/2017, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:
1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Dedico esse trabalho ao meu amado pai **Yokio Miyake *(in memorian)*** que sempre me incentivou muito e me ensinou o valor do estudo, do conhecimento e que infelizmente não pode ver a conclusão deste trabalho. Te amarei para sempre.

Á minha amada mãe **Antônia Miyake** que sempre me apoiou e compreendeu a importância de minha ausência em alguns momentos. Amo você.

Especialmente para meu companheiro, amigo e amado marido ***Michel Koji Mizusaka***, o maior apoiador desse trabalho, sempre presente em TODOS os momentos ao longo desse doutorado. Sem seu apoio seria muito difícil caminhar nessa jornada. Muito Obrigada, amo você!

Aos meus ***irmãos Anderson, Adriana, Alexandre e Allison (in memorian),*** a minha cunhada Fernanda, as minhas sobrinhas Larissa, Giulia, Laura, Valentina e ao meu sobrinho Caio. **Amo vocês.**

AGRADECIMENTOS

Á **Deus,** pela sua graça e bondade, me permitiu manter a esperança e Fé, sempre.

Á minha orientadora, professora ***Maria Lúcia Zaidan Dagli,*** pela oportunidade, confiança, por me orientar ao longo desta caminhada, por sempre nos estimular a buscar algo grande, que contribuísse com a sociedade e nos ensinou a acreditar em nosso trabalho, sempre. Muito Obrigada Malú!

A professora ***Cristina Massoco Salles*** por sempre me proporcionar momentos de ensinamentos e auxiliar em todos os momentos que precisei.

Agradeço a professora ***Claudia Mori*** por sempre nos receber em seu laboratório a nos auxiliou com seu conhecimento. Muito Obrigada!

Ao amigo ***Jonathan M. Fonseca*** que me apresentou ao grupo da profa Malú, pela amizade, companheirismo de sempre. Muito Obrigada!

Aos amigos que conquistei ao longo dessa jornada, pessoas que foram essenciais, agregaram muito, seja pela amizade ou cientificamente. Especialmente para ***Marcia Nagamine***, ***Tatícia Ikeda, Nayra Villar, Tatiane Ferrarias, Murilo Penteado, Vagner Jr, Nicolle Hazarbassanov*** muito obrigada por tudo! Foi muito bom poder dividir esse tempo no laboratório com vocês, levo comigo a amizade que construímos.

A nossa mentora ***Ivone M. Fonseca***, muito obrigada por todos os ensinamentos e pelas orientações.

Agradeço ao amigo ***Pedro Navas*** e ao ***Rodrigo Araldi*** por seus ensinamentos e contribuições que foram essenciais para a evolução deste trabalho! Muito Obrigada!

Agradeço aos colegas do laboratório ***Marguitinha, Lucas Chaible, Daniel, Gabriela, Raquel, Theresa, Frederico, Luciana, Jorge***, ***Herculano, Ju Sanchez*** obrigada!

Agradeço ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Agradeço ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)** pela concessão da bolsa de doutorado (Nº164008/2015-2) vigente de 2015 a 2019.

Agradeço ao **Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas**, e as secretárias ***Fabia e Eliane*** pelo suporte.

“Nunca foi aceito que mulheres conquistassem algo a mais.

É uma carreira difícil, mas se você persiste, isso traz muita satisfação”

Ruth Nussenzweing

Cientista

1928-2018

RESUMO

MIYAKE MIZUSAKA, A.M. **Avaliação *in vitro* dos efeitos da exposição crônica ao carcinógeno 4-(methylnitrosamino)-1-(-3-pyridyl)-1-butanone(NNK) em hepatócitos murinos. 2020.(131 folhas) Tese (Doutorado em Biotecnologia)** – Instituto de Ciências Biomédicas, Universiadade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Existem mais de 7000 substâncias químicas no cigarro, sendo que, destas cerca de 70 substâncias são consideradas carcinógenos. Uma delas é o 4- (metilnitrosamino) -1 - (- 3-piridil) -1-butanona) ou NNK. Já é bem estabelecido que o NNK pode causar danos às células pulmonares, bem como às células da mama *in vitro*, e pode levar à formação de danos no DNA. O fígado é um dos órgãos responsáveis pelo seu metabolismo e entender qual o papel desse carcinógeno nos hepatócitos é muito importante, porém pouco se sabe sobre como esse carcinógeno atua na célula *in vitro*. Para isso, adotamos uma abordagem de exposição repetida para avaliar quais alterações e efeitos celulares ocorrem na linhagem AML12 de hepatócitos murinos imortalizados. As células AML12 foram expostas ao NNK por 30 ciclos, em diferentes concentrações, e o comportamento celular foi avaliado após a exposição a longo prazo. Na análise de citometria celular, o grupo exposto a 0,1 nM apresentou maior índice proliferativo, maior capacidade de invasão no ensaio de invasão transwell e maior sobrevivência quando cultivado em superfície de baixa adesão. No entanto, os testes de tumorigenicidade *in vivo* não mostraram crescimento tumoral, após a inoculação das células em camundongos imunodeficientes. No ensaio de exposição de curto prazo com MTT, as células apresentaram um aumento na viabilidade célular em 0,1 nM e 10 nM de NNK. No ensaio de wound healing, as células expostas a 10nM NNK por longo prazo apresentaram um fechamento mais rápido da lesão. O tempo de duplicação não mostrou diferença significativa. Nos ensaios de imunofluorescência, as células submetidas à exposição de longo prazo ao NNK apresentaram marcação para K-RAS, p53, C-Myc e β-catenina. Nas análises de genotoxicidade, o teste do cometa que nos mostrou que as células AML12 tratadas com 10nM de NNK apresentaram maior escore em relação ao grupo controle, indicando uma maior quantidade de quebras de fita de DNA. O ensaio do micronúcleo mostra que não houve diferença estatística nas células expostas ao NNK em comparação com o grupo controle. Concluímos dizendo que, mesmo em baixas concentrações, NNK pode comprometer a dinâmica celular após exposição de longo prazo, mas alguns aspectos permanecem obscuros e requerem maiores estudos para sua elucidação.

Palavras-chave: NNK, hepatócitos murinos, Tabagismo, Nitrosaminas, cigarro

ABSTRACT

MIYAKE MIZUSAKA, A.M **In vitro evaluation of the effects of chronic exposure to carcinogen 4- (methylnitrosamino) -1 - (- 3-pyridyl) -1-butanone (NNK) in murine hepatocytes**. (131 sheets) Ph.D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universiadade de São Paulo, São Paulo, 2020.

There are more than 7000 substances in the tobacco cigarette smoke, 70 of which are considered carcinogenic and genotoxic. One of these byproducts is 4- (methylnitrosamino)-1-(-3-pyridyl)-1-butanone) or NNK. It is well established that NNK can cause damage to lung cells, as well as to breast cells *in vitro*, and can also lead to the formation of DNA damage. Liver is one of the organs responsible for its metabolism. Understanding which role of this carcinogen in hepatocytes is particularly important, however little is known about how this carcinogen acts this cell *in vitro*. So, we adopted a repeated exposure approach to assess which cellular changes and effects occur in the AML12 lineage of immortalized murine hepatocytes. AML12 cells were exposed to NNK for 30 cycles at different concentrations, and cell behavior was evaluated after long-term exposure. In cell cytometry analysis, the group exposed to 0.1nM showed a higher proliferative index, greater invasion capacity in transwell invasion assay and ability to survive when cultivated on low-attachment surface. However *in vivo* tumorigenicity tests showed no tumor growth in imunodeficient mice inoculated with these cells. Short term exposure of cells showed an increase in cell viability at 0.1nM and 10nM NNK in MTT assay. In the wound healing assay, cells exposed to 10nM NNK for long term showed faster-wound closure. The doubling time showed no significant difference. In immunofluorescence assays, cells subjected to long-term exposure to NNK showed labeling for K-RAS, p53, C-Myc and β-catenin. In genotoxicity analyzes, the comet test showed that AML12 cells treated with 10nM NNK had a higher score compared to the control group, indicating a greater amount of DNA strand breaks. The micronucleus assay shows no statistical difference in cells exposed to NNK compared to the control group. Finally, we were able to demonstrate that even at low concentrations, NNK can compromise cell dynamics after long term exposure but some aspects remain unclear and require further studies to elucidate it.

Keywords: NNK, murine hepatocytes, Smoking, Nitrosamines, cigarette

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Números estimado número de casos de câncer associados ao tabaco mundialmente (inclui de ambos os sexos) 25

Figura 2 - Formação de N- nitrosaminas específicos do tabaco.....27

Figura 3 Vias de indução do câncer por meio do NNK e NNN.....28

Figura 4 - Esquema experimental de exposição a 0,1nM NNK in vitro.....38

Figura 5 - Ilustração do Ciclo celular.....39

Figura 6 - Ilustração com exemplo de um inserto com transwell, semelhante ao utilizado em ensaio de invasão com as com as células AML12 e 0,1nM NNK.....41

Tabela 1 - Concentrações de células AML12 e 0,1nM NNK por poço em ensaio de MTT.....45

Figura 7- Rack ventilada do biotério FMVZ-USP.....43

Figura 8 - Animais BALB/c nude macho do grupo de estudo e grupo controle.....44

Figura 9 - Fotomicrografia da célula AML12 em baixa e alta densidade.....47

Figura 10 - Estratégia de análise do ciclo celular da linhagem de célula AML12 (controle) de experimentosdistintos.....49

Figura 11 - Estratégia de análise do ciclo celular das células expostas a 30 ciclos na a concentração de 0,1nM NNK 50

Figura 12 - Gráfico em barra que apresenta o percentual de células em cada fase do ciclo celular das células AML12 e células após a exposição de longo prazo de 0,1nM de NNK.....51

Figura 13 - Gráfico em barra representa a leitura da densidade óptica das células que cruzaram o inserto e invadiram o matrigel que no ensaio de invasão.....52

Figura 14 - Gráfico de barras da densidade óptica de células AML12 e células que foram expostas a 30 ciclos de 0,1nM NNK cultivadas por diferentes períodos placas de cultivo convencional (2D).....54

Figura 15 - Gráfico de barras da densidade óptica de células AML12 e células que foram expostas a 30 ciclos de 0,1nM NNK, cultivadas por diferentes períodos em

superfície de baixa adesão (ultra low).....55

Figura 16 - Imagem de animal nude do grupo 0,1nM de NNK, com coleta de fígado e baço para aferição de peso em balança convencional instantes após a eutanásia.....56

Figura 17 - Aferição de peso médio dos animais inoculados com DMEM/F12, AML12, 0,1nM NNK após 120 dias.....57

Figura 18 - Ilustração do esquema experimental de exposição crônica das células AML12 em diferentes concentrações de NNK.....68

Figura 19 - Equação adotada para fechamento da lesão do wound healing.....70

Figura 20 -- Esquema ilustrando a metodologia de wound healing em cultivo de monocamada.....70

Figura 21- Equação adotada para o doubling time.....71

Figura 22 - Gráfico em barras apresenta o percentual de viabilidade das células após tratamento com MTT.....72

Figura 23 - Fotomicrografias das células AML12 durante o crescimento em cultura.....73

Figura 24 - Fotomicrografias das células expostas 0,1nM NNK durante o crescimento em cultura..... ...74

Figura 25 - Fotomicrografias das células expostas 10nM NNK durante o crescimento em cultura.....75

Figura 26 - Fotomicrografias das células expostas a 1000nM NNK durante o crescimento em cultura.....76

Figura 27- Fotomicrografias em contraste de fase da linhagem AML12 (CTL) após 0, 24, 48 e 72h após a lesão do ensaio de wound healing.....78

Figura 28 - Fotomicrografias em contraste de fase da cultura celular, exposta durante 30 ciclos a diluição de 0,1nM de NNK após 0, 24, 48 e 72h após a lesão do ensaio de wound healing 79

Figura 29 - Fotomicrografias em contraste de fase da cultura celular, exposta durante 30 ciclos a diluição de 10nM de NNK após 0, 24, 48 e 72h após a lesão do ensaio de wound healing 80

Figura 30 - Fotomicrografias em contraste de fase da cultura celular, exposta durante 30 ciclos a diluição de 1000nM de NNK após 0, 24, 48 e 72h após a lesão do ensaio de wound healing.....81

Figura 31- Fotomicrografias em contraste de fase da linhagem AML12 (CTL +) após 0, 24, 48 e 72h após a lesão do ensaio de wound healing.....82

Figura 32 - Gráficos em barra que representam o percentual da área de fechamento da lesão.....83

Figura 33 - Gráfico da média do tempo de duplicação celular após a exposição de longo prazo.....84

Figura 34 - Transdução de sinal via RAS.....90

Figura 35 - Rotas de expressão gênica na célula.....90

Figura 36 - Ilustração da cadeia de caderina clássica com a presença do domínio extracelular e citoplasmático.....91

Figura 37 - Esquema ilustrando a via canônica WNT/β-catenina.....92

Figura 38 - Imagem ilustrando as diferentes classes de cometa e sua formação.....95

Figura 39 - Ilustração apresentando o processo de formação do micronúcleo.....96

Quadro 1 - Padronização com os respectivos anticorpos e diluições aplicadas na técnica de imunofluorescência.....101

Figura 40 - Fotomicrografia representativa da expressão de K-RAS na linhagem AML12(CTL) e após a exposição crônica a diferentes concentrações do NNK.....102

Figura 41 - Fotomicrografia representativa da expressão de p53 na linhagem AML12(CTL) e após a exposição crônica a diferentes concentrações do NNK.....103

Figura 42 - Fotomicrografia representativa da expressão de c-Myc na linhagem AML12(CTL) e após a exposição crônica a diferentes concentrações do NNK.....104

Figura 43 - Fotomicrografia representativa da expressão de β-catenina na linhagem AML12(CTL) e após a exposição crônica a diferentes concentrações do NNK.....105

Figura 44 - Esquema didático com a intensidade da marcação sugerida para os marcadores adotados no ensaio de IF.....106

Figura 45 - Gráfico em box plot apresenta o score de clastogenicidade das células AML12 e as diferentes concentrações de exposição ao NNK.....107

Figura 46 - Fotomicrografia com classificação dos nucleóides provenientes do ensaio do cometa.....108

Figura 47 - Gráfico em box plot apresenta o score de clastogenicidade das células AML12 após análise do micronúcleo e as diferentes concentrações de exposição ao NNK.....109

LISTA DE ABREVIATURAS

µM	Micro molar
µM	Micro molar
AA	Ampicilina Anfotericina
AML12	Linhagem de hepatócito murino
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CA	Comet Assay
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEUA	Comitê de ética em pesquisa
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
c-Myc	Oncogene c-Myc
DMEM/F12	Dulbelco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid.
EDTA	Ácidoetilenodiamotetraacético
EMA	European Medicines Agency
EUA	Estados Unidos da América
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
G0	Fase de quiescência
G1	Fase de crescimento 1
G2	Fase de crescimento 2
GDP	Guanidina difosfato
GER	Germany
GTP	Guanidina Trifosfato
HCC	Hepatocelular Carcinoma
HE	Coloração de Hematoxilina Eosina

INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de propídeo
ITS	Insulina Transferrina Selenium
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MNA	Micronucleus Assay
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difenil brometo tetrazolico
nM	Nanomol
NNK	4-(methylnitrosamino) -1-(-3-pyridyl)-1-butanone (NNK)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	Proteína supressora de tumor
PBS	Solução tampão a base de fosfato
PETab	Pesquisa Especial do Tabaco
Rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SFP	Specific Pathogen Free
TGF-α	Transforming Growth Factor Alfa
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
WNT	Via de sinalização wingless e int-1.
α7nAChR	α7 nicotinic acetylcholine receptor
β- cat	β- catenina
TA	Temperatura ambiente
WH	Wound healing
DT	Doubling time
THS	Thirdhand Smoke
SHS	Secondhand Smoke
NNN	N-nitrosonornicotine
TG	Test Guideline
ONU	Organizações das Nações Unidas

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Graus Celcius
µg	Micrograma
µm	Micrometro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nM	Nanomol
p (valor)	Valor da estatística
β	beta
γ	Gama

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVO GERAL 24

1.1 Introdução 24

1.1.1 Breve Histórico do Tabaco 24

1.1.2 Panorama do Tabagismo no Brasil 25

1.1.3 NNK 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone 26

1.1.4 Fígado 30

1.1.5 Toxicidade, exposições a substâncias químicas – Panorama geral 31

1.2 Objetivo Geral 33

2 CAPÍTULO - PADRONIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NNK EM CÉLULAS AML12 - AVALIAÇÕES INICIAIS DOS EFEITOS *IN VITRO* E *IN VIVO* 34

2.1 Introdução 34

2.2 Objetivos Específicos 36

2.3 Material e métodos 37

2.3.1 Linhagem AML12 - ATCC® CRL2254 37

2.3.2 Manutenção e padronização do cultivo das células AML12 37

2.3.3 NNK (N-nitrosamine 4-(methylnitrosamino)- 1-(3-pyridyl)-1-butanone) 38

2.3.4 Padronização do tratamento das células AML12 com NNK (N-nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1(3-pyridyl)-1butanone) 38

2.3.5 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo das células AML12 e células expostas a 0,1nM de NNK por 30 ciclos. 39

2.3.6 Ensaio do transwell - análise da capacidade de migração e invasão 40

2.3.7 Perfil de crescimento por meio do ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo tetrazolico) 41

2.3.8 Animais – camundongos atímicos BALB/c Nude 43

2.3.9 Teste de tumorigenicidade em animais BALB/c Nude. 44

2.3.10 Processamento de tecidos para avaliação do teste de tumorigênese in vivo 45

2.4 Análise estatística 47
2.5 Resultados 48
2.5.1 Cultivo celular da linhagem AML12 48
2.5.2 Avaliação do ciclo celular da linhagem AML12 (CTL) e das células que foram expostas a 0,1nM de NNK 48
2.5.3 Avaliação do ensaio da capacidade de invasão e migração por meio da técnica do Transwell 52
2.5.4 Perfil de crescimento das células AML12 (CTL) e AML12 após 0,1nM de NNK em cultivo aderente (2D) e baixa adesão (3D) avaliado por meio do ensaio do MTT 53
2.5.5 Teste de tumorigenicidade em animais imunodeficientes BALB/c nude inoculados com células AML12 (CTL) e células expostas a 0,1nM de NNK 57
2.6 Discussão 59
2.7 Resumo dos Achados 64
3 CAPÍTULO - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE CURTO PRAZO E DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS AML12 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NNK 65
3.1 Introdução 65
3.2 Objetivos Específicos 67
3.3 Material e Métodos 68
3.3.1 Protocolo de exposição das células AML12 a novas concentrações de NNK 10nM e 1000nM. 68
3.3.2 Avaliação da toxicidade de curto prazo da célula AML12 após as diferentes diluições de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK por meio da técnica do MTT 69
3.3.3 Avaliação da migração celular por meio da técnica de wound healing após a exposição da célula AML12 a 30 ciclos nas concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK 70
3.3.4 Avaliação do tempo de duplicação celular da linhagem AML12 após a exposição de longo prazo durante 30 ciclos nas concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK. 72
3.4 Resultados 73

3.4.1 Avaliação da toxicidade curto prazo das diferentes diluições de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK na linhagem AML12 por meio da técnica do MTT 73

3.4.2 Acompanhamento das células AML12 após 30 ciclos de exposição as diferentes diluições de 0,1nM, 10nM, 1000nM de NNK. 74

3.4.3 Avaliação da migração celular por meio da técnica de wound healing em células AML12 expostas por 30 ciclos a 0,1nM, 10nM e 1000nM NNK 78

3.4.4 Avalição do tempo de duplicação celular da linhagem AML12 após a exposição de longo prazo a 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK – Doubling Time 84

3.5 Discussão 86

3.6 Resumo dos Achados 88

4 CAPÍTULO - AVALIAÇÃO DE MUTAGÊNESE EM CÉLULAS AML12 E CÉLULAS EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO NNK 89

4.1 Introdução 89

4.1.1 Lesões no DNA 94

4.1.2 Avaliação de genotoxicidade – análise do cometa 94

4.1.3 Teste de micronúcleo (MN) 96

4.2 Objetivos Específícos 98

4.3 Material e métodos 99

4.3.1 Ensaio de imunoflurescência na linhagem de hepatócitos murinos AML12 (CTL) e pós exposição crônica às concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK 99

4.3.2 Ensaio do teste do cometa 100

4.3.3 Teste do micronúcleo nas células AML12 após exposição de longo prazo às diferentes concentrações de NNK 0,1nM, 10nM, 1000nM. 100

4.4 Resultados 102

4.4.1 Ensaio de imunoflurescência para avaliação dos marcadores K-RAS, p53, C-Myc e β-catenina. 102

4.4.2 Avaliação do efeito clastogênico após exposições de longo prazo a distintas concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK nas células por meio da técnica do cometa 108

4.4.3 Avaliação do teste do micronúcleo nas células AML12 após exposição crônica às diferentes concentrações de NNK 0,1nM, 10nM, 1000nM.....109
4.5 Discussão 111
4.6 Resumo dos Achados.....119
5 CONCLUSÕES.....120
5.1 Conclusão Geral.....120
5.2 Conclusões Específicas.....120
6 REFERÊNCIAS 122

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVO GERAL

1.1 Introdução

1.1.1 Breve Histórico do Tabaco

Nicotiana tabacum L. é atualmente uma das monoculturas mais amplamente cultivadas em todo o mundo, possuindo alto valor econômico. Segundo dados da Food and Agriculture Organization of United Nations (ITALIA, 2003), cinco países produzem aproximadamente 2/3 do tabaco mundial. São eles:China, Brasil, Estados Unidos Turquia e Zimbabue.

O primeiro relato de tabaco identificado foi em 1492 quando Cristóvão Colombo ancorou nas Américas e recebeu tabaco e frutas como presente dos nativos locais (SAMET, 2013), o que ele relatou como *"folhas secas*". Nas Américas, o tabaco era consumido principalmente em rituais religiosos. No Brasil há relatos de uso do tabaco em 1550, daí então foi levado para a França, Espanha e posteriormente para a Inglaterra (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2004).

Durante muito tempo após sua chegada na Europa, foi utilizado em cachimbos e enrolado manualmente. Só por volta de 1800, em Londres, a Philip Morris iniciou sua produção e venda de cigarros em sua loja. Neste mesmo período, nos Estados Unidos, a família Duke deu início a *American Tobacco Company*, que foi a principal fornecedora de cigarros ao longo do século 20 (SAMET, 2013). Desde então o cigarro se tornou um produto muito consumido na sociedade mundial. Segundo dados do CDC (Centers for Disease Control and Prevention), essa indústria faturou 216,9 bilhões de dólares só no ano de 2018.

Desde então, o consumo do tabaco via cigarro ou outras formas, tais como cachimbo, charuto ou mascado, cresceu. Durante muitos anos os malefícios do cigarro e seus subprodutos eram completamente desconhecidos. Atualmente, sabe-se que o cigarro possui diversas substâncias tóxicas. São processados com substâncias químicas e aromas para auxiliar na sua aceitabilidade, entretanto já é bem estabelecido a presença de substâncias carcinogênicas que podem induzir o desenvolvimento de doenças crônicas e o câncer. Segundo dados da IARC (International Agency for Research on Cancer - WHO), em 2018, o câncer de pulmão associado ao tabaco teve uma incidência de mais de 2 milhões de casos ao redor do mundo (figura 1), distribuído entre homens e mulheres.

1.1.2 Panorama do Tabagismo no Brasil

Mundialmente, segundo dados do GATS (*Global Adult Tobacco Survey*), existem 879 milhões de tabagistas distribuídos em 22 países. O Brasil está entre os maiores produtores de tabaco no mundo e desde a década de 1990 ocupa o primeiro lugar na exportação mundial (BRASIL, 2011b). O tabagismo no Brasil e em grande parte do mundo é considerado como uma epidemia e um grande problema de saúde pública, gera custos elevados aos sistemas de saúde e a cada ano estima-se que comprometa mais de U$500 bilhões de prejuízo (EKPU, BROWN; 2015).

Há mais de dez anos a Organização Mundial da Saúde (OMS) toma a frente algumas iniciativas a fim de diminuir o consumo de tabaco na população adulta. Diante deste cenário, a OMS em conjunto com os CDCs (Centers for Disease Control and Prevention) nos Estados Unidos desenvolveram os GATS. Este programa tem por objetivo coletar dados para o controle do tabaco na população adulta (BRASIL, 2011b). No Brasil, órgãos como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional do Câncer (INCA) participaram do comitê nacional do GATS.

O Brasil também faz parte da Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco que envolve 192 países e entrou em vigor em fevereiro de 2005. Esta tem o seguinte objetivo:

> *O objetivo da presente convenção e de seus protocolos é proteger as gerações presentes e futuras das devastadoras conseqüências sanitárias, sociais, ambientais e econômicas geradas pelo consumo e pela exposição à fumaça do tabaco, proporcionando uma referência para as medidas de controle do tabaco, a serem implementadas pelas partes nos níveis nacional, regional e internacional, a fim de reduzir de maneira contínua e substancial a prevalência do consumo e a exposição à fumaça do tabaco.* (BRASIL, 2011b*)*

Em 2008 foi realizada uma pesquisa intitulada Pesquisa Especial do Tabaco (PETab) pelo Ministério da Saúde, na qual foi estimou-se mais de 24 milhões de fumantes no Brasil. Destes, 14,8 milhões eram homens e 9,8 milhões eram mulheres. A prevalência de cigarros industrializados foi de 14,4% e de cigarros enrolados a mão de 5,1%. esse estudo também permitiu estimar pela primeira vez o percentual de indivíduos que consomem tabaco sem fumaça, como rapé e tabaco mascado no Brasil, sendo que a proporção de pessoas que consumiam esse tipo de derivado é de aproximadamente 0,4% (BRASIL, 2011b).

Segundo a PETab, estima-se que o fumo seja responsável por mais de 5 milhões de mortes por ano e que se o quadro de consumo de tabaco prevalecer, esse número chegará a 8 milhões no ano de 2030.

Desde a década de 1950 há diversos trabalhos que associam o uso do tabaco como um dos principais elementos para desenvolvimento de câncer e outros 50 processos patológicos (BRASIL, 2011a). Fatores como tabagismo, alcoolismo, sedentarismo e obesidade são alguns dos fatores que auxiliaram a transformar o câncer na epidemia da atualidade, principalmente nos países mais desenvolvidos (SAITO et al., 2015).

1.1.3 NNK 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone

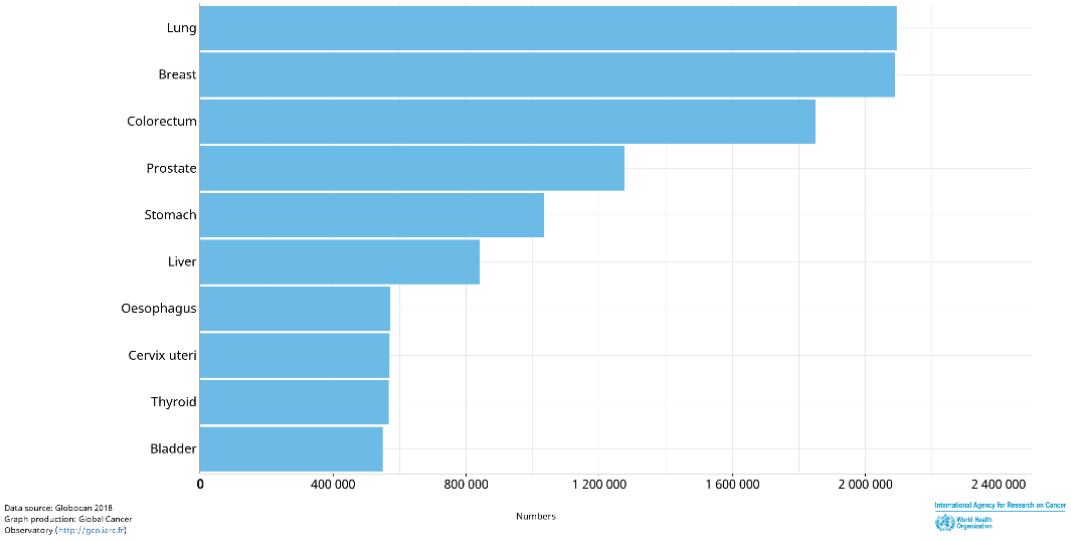
O tabaco, bem como petróleo e carvão mineral possuem componentes químicos na sua composição que quando sofrem a queima incompleta geram os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Essa família possui carcinógenos potentes e indiretos e dependem da ativação prévia por sistemas enzimáticos celulares. Seu papel na carcinogênese é importante tendo em vista que, seu risco não está somente associado a uma tarefa ocupacional, mas também ser decorrente de hábitos de vida ou uma exposição ambiental (SAITO et al., 2015).

Existem mais de 7000 substâncias químicas no cigarro, com aproximadamente 90 moléculas. Destas, 70 deles são considerados carcinógenos e possuem evidências de ser suficientemente genotóxicos para animais ou seres humanos (IARC, 2004; RODGMAN; PERFETTI, 2013). Dentre estes componentes, destaca-se *o 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK).*

Embora o NNK seja um carcinógeno que pode induzir o câncer de pulmão (figura 2), existem diversas evidências que também associam o NNK ao desenvolvimento de câncer de fígado como mostra o trabalho de Aizawa e colaboradores (2016), no qual foi observado o desenvolvimento de tumores de fígado com características de carcinoma hepatocelular (HCC) após a exposição de NNK em furões *(Mustela putorius furo)*.

O NNK ou 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone pertence ao grupo das nitrosaminas (Figura 1). É uma substância não volátil presente tanto nas folhas de tabaco, bem como na fumaça oriunda da queima do tabaco (*Nicotiana tabacum L.*). Este é considerado um pró-carcinógeno ou carcinógeno de via indireta, ou seja, necessita ser metabolizado para tornar-se uma substância mutagênica (YALCIN; EMINE; LAMONTE, 2016).

Figura 1: Números estimado número de casos de câncer associados ao tabaco mundialmente (inclui de ambos os sexos).



Fonte: Globocan/WHO, 2018.

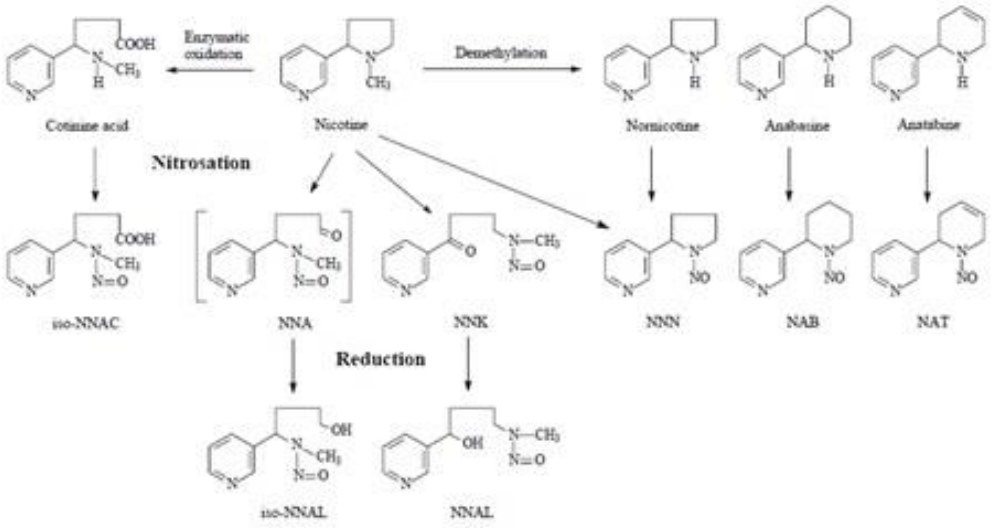
De maneira geral, as substâncias potencialmente hepatotóxicas podem ser classificadas de acordo com seu caráter intrínseco ou extrínseco. Compostos considerados intrínsecos são definidos como substâncias que possuem elevada incidência de toxicidade, de maneira dose dependente, em algumas espécies mais do que em outras. Exemplos destas substâncias químicas intrínsecas são compostos associados a dietas, como a aflatoxina. Já as substâncias extrinsecamente tóxicas, geralmente causam uma baixa incidência de toxicidade, a qual não é prevista por dose ou por estudos em animais experimentais. Essas entidades químicas são tipicamente drogas, e às vezes, o risco de lesão hepática não é reconhecido até que um número significativamente alto de pacientes tenha sido tratado (WALLIG et al., 2017). Assim, é importante que se entenda a ação de alguns compostos em células hepáticas, como o NNK.

A nicotina sofre nitração e um dos seus metabólitos é o NNK, considerado como uma substância extrínseca. Este é metabolizado pela enzima do citocromo P450, o qual irá formar metabólitos instáveis que irão reagir com as bases de DNA e formar os adutos volumosos de DNA. Esses adutos são estruturas volumosas que podem impedir a abertura da dupla fita e bloquear ou inviabilizar o prosseguimento e ação da DNA polimerase, ao longo do processo de replicação do DNA (XUE, 2014). Os adutos são gerados por ligações covalentes dessas substâncias químicas de grande tamanho a vários pontos do DNA. O desenvolvimento desses adutos volumosos é a principal e mais importante classe de dano ao DNA derivado da exposição à fumaça do cigarro (HANG, 2010).

A principal rota metabólica do NNK é a redução do grupo carbonil. Esta irá formar o (4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) que é uma mistura racêmica dos enantiomêros. É um produto formado após o NNK entrar no corpo. O NNK pertence a um grupo de produtos químicos que é encontrado apenas no tabaco e seus subprodutos. Avaliar e mensurar o NNAL na urina das pessoas é uma maneira fidedigna de determinar a exposição ao NNK para tabagistas e não tabagistas expostos à fumaça ambiental do tabaco (CDC, 2019). O NNAL possui meia vida mais longa do que os outros biomarcadores de tabaco até então estudados e pode ser adotado para avaliar a exposição a fumaça do cigarro por 6 a 12 semanas após a interrupção da exposição (GONIEWICZ et al., 2009). O NNAL, por exemplo, já foi identificado na urina de recém-nascidos e de mães não tabagistas, expostos à fumaça de maneira passiva (IARC, 2004). Esses achados indicam que o NNK é metabolizado em NNAL no corpo da mãe, este é capaz de atravessar a barreira placentária, ser absorvido e posteriormente metabolizado em outras fases do desenvolvimento do feto (LACKMANN et al., 1999).

O NNAL também é considerado carcinogênico. Substâncias químicas de fontes exógenas derivadas do tabaco, como o NNK ou de outras fontes químicas são capazes de formar adutos de DNA. São quatro os adutos produzidos pelo NNK, a saber: I) aduto aldeído DNA; II) aduto metil DNA; III) aduto Piridiloxobutil DNA; IV) aduto Piridilhidroxibutil DNA. Cada uma dessas rotas possui seu potencial carcinogênico capaz de conduzir danos na molécula de DNA e em conseqüência disto, gerar adutos volumosos que inviabilizam a leitura correta da informação genética atribuída a uma dada região do DNA (PETERSON, 2017). Estas estruturas por sua vez, podem reagir covalentemente com DNA e acarretar mutações (Figura 3) genéticas específicas (MENNECIER et al., 2014).

Figura 2- Formação de N- nitrosaminas específicas do tabaco



Fonte: Hoffmann et al (1995)

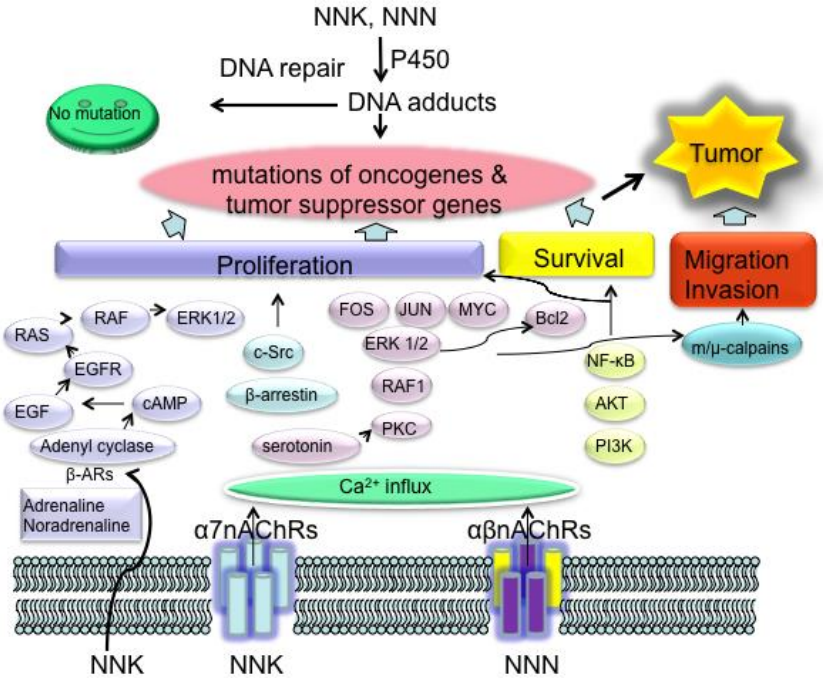
Já se sabe que a exposição ao NNK ou aos seus metabólitos como o *N-nitrosonornicotine* (NNN) podem produzir adutos de DNA. Estes já foram identificados em tecidos de fumantes como também em tecidos de não fumantes e são chamados de tabagismo passivo (Secondhand Smoke, SHS) (HANG, 2010). O SHS consiste em um mix de fumaça, partículas e gases gerados da queima do tabaco em associação com a queima do papel (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2006).

Whitlatch e Schick em 2019, realizaram um levantamento com documentos da coleção The Truth Tobacco Industry onde foi identificado no ano de 1991 um grupo de pesquisa da Philip Morris ® que realizou um dos primeiros estudos avaliando os efeitos do Thirdhand Smoke (THS). Thirdhand Cigarrete Smoke é um conceito estabelecido para a fração da fumaça do cigarro que permanece no ambiente, mesmo após longos períodos após a finalização do consumo do cigarro. Nesse estudo realizado ao longo de quase quatro meses por um período de 8 horas por dia, observou-se que as substâncias químicas permanecem no ar por 12h e impregnam as superfícies. Foram extraídas nitrosaminas de móveis e superfícies presentes na sala onde foi desenvolvida a análise. O NNK foi capaz de persistir por mais de 50 dias. Esses dados nos mostram que o NNK pode permanecer no ambiente mesmo após a sua combustão podendo reagir com outros carcinógenos e toxinas

Assim, mesmo em baixas concentrações, quando metabolizado de maneira direta ou indiretamente, o NNK presente no cigarro pode contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas. Diante do exposto é de extrema importância a compreensão dos aspectos tóxicos do

NNK não somente em tecidos pulmonares (MENNECIER et al., 2014) ou tecidos de mama (SIRIWARDHANA et al., 2008) como em tecidos do fígado como os hepatócitos.

Figura 3 - Vias de indução do câncer por meio do NNK e NNN.



Legenda: A ilustração apresenta a ativação metabólica e indução de adutos de DNA, o possível reparo de DNA ou a promoção de tumor.
FONTE: XUE, YANG, SENG; 2014.

1.1.4 Fígado

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo humano, possui cerca de 1/50 do peso corporal total, ou seja aproximadamente 1,5 kg de um adulto humano médio. O fígado processa e armazena os nutrientes absorvidos através da alimentação para a utilização por outros órgãos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). É responsável por diversas reações, como metabolismo de carboidratos e gorduras é um dos principais órgãos de biotransformação, está envolvido na alteração química na qual todo fármaco ou xenobiótico passa em um organismo, em geral é realizado por processos enzimáticos (DE LUCIA; OLIVEIRA-FILHO, 2004). As substâncias são absorvidas praticamente intactas pelo sistema delgado e transportado inicialmente pelo sistema porta ao fígado, onde passam por metabolismo intenso.

As reações de biotransformação são catalisadas pelo sistema do citocromo P450, que também pode ser designado como CIP. As CIP são enzimas que se localizam no fígado, bem como no trato gastro intestinal (TGI) e é composta por várias famílias de isoenzimas.

Normalmente o nome utiliza uma classificação com um número, seguido por uma letra maiúscula para a subfamília e outro número para indicação da isoenzima (HOWLAND; MYCEK, 2007).

A nitrosamina específica do tabaco, 4- (metilnitrosamino) -1- (3-piridil) -1-butanona (NNK), requer ativação metabólica pelas enzimas do citocromo P450 (CYP) para gerar intermediários reativos ao DNA que induzem mutações e câncer (ABDEL-RAHMAN et al., 2000).

Segundo dados do National Cancer Institute (NCI, 2020), o cigarro pode contribuir para o aumento em até de duas vezes o risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) caso o tabagismo esteja associado à instalação de hepatite viral (HBV/HBC). Segundo Saito e colaboradores (2015), o tabagismo juntamente com outros comportamentos de risco, são fatores associados a 1/3 das mortes causadas por câncer. Petrick e colaboradores (2018) observaram por meio de um consórcio de 14 estudos de coorte, que o tabagismo e o consumo de álcool estão associados ao aumento de risco de câncer. Observou-se também que a interrupção do tabagismo e o consumo leve a moderado de álcool está associado com a dimunição do risco de carcinoma hepatocelular.

Diante da intima associação dos efeitos nocivos do cigarro no desenvolvimento do câncer, se faz importante o entendimento do impacto do NNK em células como os hepatócitos.

1.1.5 Toxicidade, exposições a substâncias químicas – Panorama geral

Podemos iniciar esse tópico apresentando a grande relevância de estudos toxicológicos no desenvolvimento da ciência. Segundo o dicionário Michaelis, *toxicologia é a área da medicina que estuda os venenos e as substâncias tóxicas, suas composições químicas, seus efeitos, assim como o tratamento contra suas intoxicações*. Diante desta breve introdução, podemos comentar a importância do entendimento e das análises toxicológicas na elaboração e desenvolvimento de novas drogas, tratamentos, bem como na compreensão de como os compostos químicos podem repercutir em organismos vivos.

A avaliação de toxicidade nos ensaios *in vivo* é muito importante e a adoção de modelos animais é amplamente empregada por conta da sua similaridade com o metabolismo humano. Desta forma, podem ser adotados modelos de toxicidade aguda e crônica. Segundo o UNITED NATIONS (2011), a toxicidade aguda se refere aos efeitos adversos ocorridos após a administração de uma única ou múltiplas doses, dentro de 24h após a administração oral ou dermal, ou por meio de 4 horas de inalação. Já as diretrizes 452 de testes químicos da OECD

(2018), para estudos de toxicidade crônica tem objetivo avaliar a resposta toxicológica em modelos mamíferos após exposição prolongada e/ou a um dado agente químico. Segundo a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2018), esses estudos são capazes de fornecer uma ampla gama de informações tais como a neurotoxicidade e também sobre possíveis riscos à saúde que podem ser oriundos de exposições mais prolongadas a agentes tóxicos. Tem ainda a pretensão de idenficar efeitos em alguns órgãos alvo. São previstos testes crônicos *in vivo* com períodos de 28 e/ou 90 dias. Estes podem contribuir com informações essenciais para o panorama toxicológico.

O ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) possui como principal objetivo definir um comitê científico para promover a regulaçao de métodos alternativos ao uso de animais na área de biociências. Segundo o 45º workshop realizado, o conceito "*Teste toxicológico crônico in vitro*" ainda gera muito debate, pois consiste em um termo ainda muito impreciso. Por conta disso prefere-se o termo "*Teste de longo prazo*", considerando-se como longo prazo um mínimo de 5 dias, e para os testes agudos adota-se o termo "*Teste de curto prazo*" para tempos até 72h (PFALLER et al, 2000). O hepatócito de linhagem primária seria o mais indicado para compreender o impacto de substâncias tóxicas a longo prazo, contudo, a manutenção por longos períodos desses hepatócitos em cultivo celular acarreta na diminuição de algumas funções do metabolismo hepático tais como, atividades enzimáticas de fase I e fase II (SIRICA, PITOT, 1979). Em virtude disto, indica-se para realização deste tipo de análise *in vitro*, células relativamente mais estáveis tais como culturas irmortalizadas e geneticamente modificadas.

As células AML12 foram inicialmente estabelecidas por Wu et al. (1994), a partir do fígado de camundongos (*Mus musculus*) transgênicos que super expressam TGFα. Esta linhagem celular foi desenvolvida de um camundongo macho de aproximadamente três meses da cepa CD1, linha MT42. A cultura hepática não tumoral (BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO, 2014) foi imortalizada sem a presença de oncogenes virais e permaneceu diferenciada após diversas passagens, apresentando características de sua origem hepática, tais como morfologia epitelial, presença de peroxissomos, presença de LDH 5, crescimento aderente, dentre outros (WU et al, 1994).

Diante do exposto, optamos pela adoção desta linhagem celular imortalizada, não tumoral e com característica de células normais para a investigação ao longo deste estudo.

1.2 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo compreender e avaliar os efeitos do carcinógeno 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) na linhagem de hepatócitos murinos AML12 em diferentes concentrações por um longo prazo.

2 CAPÍTULO - PADRONIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NNK EM CÉLULAS AML12 - AVALIAÇÕES INICIAIS DOS EFEITOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

2.1 Introdução

Há 60 anos os pesquisadores Russell and Burch desenvolveram o conceito de *Replacement, Reduction and Refinement (3R´s)* que foi publicado no mesmo ano, em seu livro intitulado "*Os princípios da técnica experimental humana"* (RUSSELL; BURCH, 1959). O cerne desta publicação foi a abordagem de uma nova proposta, com o objetivo de melhorar o a aplicação de animais na pesquisa, bem como a melhora e progresso da qualidade da pesquisa médica clínica científica.

Atualmente existe um engajamento da comunidade científica global para seguir os princípios dos 3R´s, e isso se aplica na redução do número de animais utilizados em pesquisa de maneira mundial, ou o seu uso com parcimônia. Cada vez mais, tem se estabelecido novas organizações para disseminar e transmitir os princípios de Russell e Burch, que têm se mostrado progressivamente mais contemporâneos em nossa atual sociedade.

O cultivo celular "*in vitro"* tem sido desenvolvido a fim de minimizar o uso de animais e mimetizar o comportamento celular após a exposição acumulativa a baixas concentrações de agentes carcinógenos (HECHT, 1999; HECHT; CARMELLA; MURPHY et al., 1993; BESARATINIA; KLEINJANS; VAN SCHOOTEN, 2002) além de avaliar os efeitos da exposição de longo prazo

Adotando a técnica de cultivo de células *in vitro* Mennencier e colaboradores (2014), expuseram células pulmonares E10 ao carcinógeno NNK à concentração de 0,1nM e observaram que após a exposição prolongada ao carcinógeno, este conduziu as células para a aquisição de um perfil com propriedades malignas.

Siriwardhana e colaboradores (2008) realizaram ensaio de longo prazo com baixas concentrações de NNK (0,1nM) em células epiteliais de mama humana MCF10A, e após repetidas exposições também observaram a aquisição de perfil maligno com crescimento independente de ancoragem.

Diante do exposto, podemos ressaltar a importância e o impacto de estudos de exposições de longo prazo a carcinógenos, como o NNK. Estes podem acessar o organismo de maneira direta ou indireta, viabilizando alterações no DNA que a médio ou longo prazo podem em acarretar erros na replicação, transcrição ou tradução. É importante compreender o impacto

do NNK em células hepáticas (hepatócitos), pois estas células possuem um papel essencial na metabolização de xenobióticos, e o modelo *in vitro* utilizando a linhagem imortalizada de hepatócitos murinos AML12 permite que o estudo de longo prazo possa ser conduzido sem a deterioração das características celulares, comumente observada nas culturas de células primárias.

Umas das facetas desse trabalho também foi estimular a redução do número de animais adotados na pesquisa, juntamente, com a adoção e promoção de métodos alternativos, como o cultivo celular. Técnicas como esta, se fazem primordiais para o entendimento da toxicidade de substâncias químicas após longos períodos de exposição, bem como contribuir na compreensão dos mecanismos de ação e auxiliar na elucidação da toxicidade molecular do NNK.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o comportamento celular após exposição da concentração de 0,1nM de NNK em células AML12, estabelecimento do processo de cultivo celular e do número de ciclos de exposição ao NNK.
- Avaliar o comportamento do ciclo celular após a exposição a concentração de 0,1nM de NNK
- Avaliar o potencial de invasão e migração pela técnica do Transwell após exposição a concentração de 0,1nM de NNK por 30 ciclos.
- Avaliar a viabilidade celular pela técnica do MTT e a independência de ancoragem da célula AML12 após exposição a concentração de 0,1nM de NNK por 30 ciclos em condições de cultivo aderente (2D) e de baixa adesão (3D)
- Avaliar o potencial de tumorigênese das células expostas a concentração de 0,1nM por 30 ciclos de NNK após sua inoculação por via subcutânea em animais imunodeficientes BALB/c nu/nu

2.3 Material e métodos

2.3.1 Linhagem AML12 - ATCC® CRL2254

A linhagem de hepatócitos murinos AML12 foi adquirida através do Banco de Células do Rio de Janeiro BCRJ (figura 9). Esta linhagem é comercializada pela ATCC® (*American Type Culture Collection*) com o código CRL-2254. Os experimentos foram realizados no laboratório de oncologia comparada da FMVZ/USP e autorizada sob o número do Comitê de ética no uso de animais - CEUA/FMVZ- USP, CEUAx N 5026060317.

As células AML12 foram inicialmente estabelecidas por Wu et al (1994), a partir do fígado de camundongos (*Mus musculus*) transgênicos que super expressam TGFα. Esta linhagem celular foi desenvolvida de um camundongo macho de aproximadamente três meses da cepa CD1, linha MT42. A cultura hepática não tumoral (BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO, 2014) foi imortalizada sem a presença de oncogenes virais e permaneceu diferenciada após diversas passagens, apresentando características de sua origem hepática, tais como morfologia epitelial, presença de peroxissomos, presença de LDH 5, crescimento aderente, dentre outros (WU et al, 1994).

2.3.2 Manutenção e padronização do cultivo das células AML12

As células de hepatócito murino AML12 foram estocadas e congeladas em tanques de nitrogênio líquido, em pequenas alíquotas dentro de frascos criogênicos estéreis de 2 ml, fundo em “u” e com tampa rosca interna (Corning®). Para descongelá-las, o frasco criogênico é retirado do nitrogênio líquido e aquecido, sem agitação, em banho Maria 37°C. Terminado o descongelamento, o frasco é lavado com meio de DMEM/F12 Glutamax 1x (GIBCO), e o seu conteúdo transferido para um tubo cônico de 15 ml, de polipropileno e com tampa vedadora (Corning®), com 8 ml de meio de cultura. O tubo é centrifugado por 5 min a 1.500 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante é desprezado e as células são ressuspendidas em 10 ml de meio de cultivo DMEM/F12 acrescido de 10% soro fetal bovino (SFB) e suplementado com 10 µg/ml insulina, 5.5 µg/ml transferrina, 5 ng/ml selênio (ITS – Insulin, Transferrin, Selenium – GIBCO®), 40 ng/ml dexametasona (SIGMA-ALDRICH®), e 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina-B – GIBCO® – USA).

O conteúdo da garrafa foi então homogeneizado levemente, observado ao microscópio invertido (MOTIC® Image Plus 2.0, British Columbia, CA) e, a seguir, a garrafa foi mantida em estufa a 37ºC, com atmosfera umidificada contendo 5% CO_2. Entre cada cultivo celular, e

após o crescimento celular com uma confluência de 80%, as células eram submetidas ao processo de dissociação de célular com auxílio de uma enzima proteolítica (tripsina), para desagregação para células aderentes ao substrato de cultivo. Este processo é denominado como tripsinização.

Além do descongelamento quando necessário, outra fase importante do cultivo celular é a expansão do cultivo, que consiste na amplificação da cultura após a confluência das células. Para isso a garrafa de cultura é lavada com solução de PBS (Phosphate-Buffered Saline) para a remoção de resíduos de meio DMEM/F12 Glutamax 1x (GIBCO®) e SFB, posteriormente é realizada a incubação com Tripsina EDTA 1x (0,05%) em PBS, durante 10 minutos 5%CO_2 a 37ºC em atmosfera umidificada. Após a incubação foi adicionado DMEM/F12 a 10% SFB para inativação da tripsina, as células foram centrifugadas a 1500rpm por 5 min, ressuspendidas em meio e homogeneizado vigorosamente com auxílio da pipeta de precisão, contadas e distribuídas em novas garrafas de cultura para expansão.

2.3.3 NNK (N-nitrosamine 4-(methylnitrosamino)- 1-(3-pyridyl)-1-butanone)

O carcinógeno NNK foi obtido de Toronto Research Chemicals- (North York, ON, Canada CA) com peso molecular de 207.23kDa. O carcinógeno foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) para se obter uma solução estoque de 1mM NNK que foi armazenada a -20°C até o momento do uso. Para os tratamentos das células, era preparada uma pré diluição com DMEM/F12 na concentração apropriada, para finalmente diluir em meio devidamente suplementado e atingir a concentração final desejada.

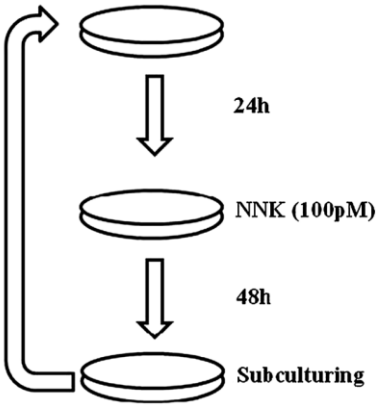
2.3.4 Padronização do tratamento das células AML12 com NNK (N-nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1(3-pyridyl)-1butanone)

Para a realização da exposição de longo prazo, foram cultivadas $1x10^6$ /células em 10ml de meio de cultivo, em uma garrafa de $75cm^2$. O tratamento com NNK foi adotado 24h após a adesão da cultura celular AML12 na garrafa de cultura. Estas foram submetidas ao tratamento com uma solução com concentração de final de 0,1nM, de NNK que foi previamente diluído em meio com o de cultura DMEM/F12 Glutamax (1x). Os grupos tratados permaneceram em contato com o carcinógeno durante as próximas 48h consecutivas. Ao final deste período, as células foram tripsinizadas, contadas e replaqueadas permanecendo em meio novo sem adição de NNK por mais 24h. A este período de total de 72h adotamos o nome de “ciclo” (Figura 4) (MENNECIER et al., 2014).

Diante do exposto, as células AML12 foram submetidas à exposição com NNK por 30 ciclos, na concentração final de 0,1nM. Como controle negativo, utilizamos a mesma cultura AML12, a qual recebia as mesmas condições de cultivo e passagens da linhagem tratada, porém sem a exposição ao carcinógeno. Estes foram nomeados como grupo controle (CTL).

Uma vez adotado este tratamento, as culturas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO_2 para futuras análises.

Figura 4: Esquema experimental de exposição a 0,1nM NNK *in vitro*



Legenda: A. Esquema experimental de exposição química induzida por repetições sucessivas ao NNK *in vitro*. As células são cultivadas e após 24h do cultivo, as células são submetidas a exposição a 0,1nM (concentração final) de NNK durante 48h. A este período completo de 72h deu se o nome de ciclo.
FONTE: Adaptado MENNECIER, 2014;

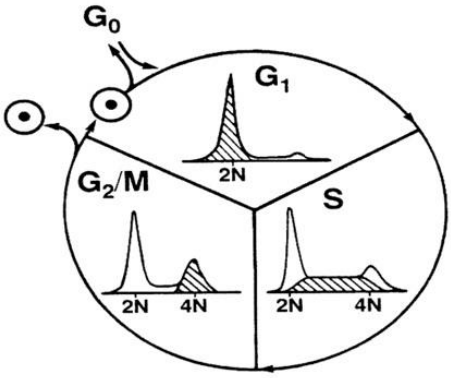
2.3.5 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo das células AML12 e células expostas a 0,1nM de NNK por 30 ciclos.

O ciclo celular consiste em uma sequência de eventos para replicação celular. São dividos em fases (Figura 5) e ocorrem em uma célula ao longo do seu crescimento e divisão celular. Para avaliar o ciclo celular das células AML12 expostas ao 0,1nM NNK e células não expostas, foi primeiramente realizada a marcação das células com iodeto de propídeo. O iodeto de propídeo (IP) é um agente intercalante de DNA que emite fluorescência vermelha. Isso permite a detecção da quantidade de DNA nas células pela citometria de fluxo e com isso pode-se identificar a frequência de células individuais que estão sintetizando o DNA. Diante disto, é possível detectar em qual fase do ciclo celular as células se encontram, permitindo identificar aquelas que estão em fase S.

Para isso, 1 x 10^6 células de cada grupo foram tripsinizadas, fixadas com etanol 70% por duas horas, na temperatura de -20°C. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes

com PBS, centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos, filtradas e incubadas com 200µl/amostra de solução corante de IP. A solução de IP consistia de 20µg/ml de IP (Merck), 200µg de RNAse A (Thermo Fisher – USA) e 0,1% de Triton 100x (Sigma Aldrich- USA) em PBS. As amostras foram incubadas durante 30 minutos em temperatura ambiente, sob abrigo da luz, seguidas por 3 pulsos de Vórtex (PróLab – Brasil) a cada 10 minutos durante a incubação. Após o término do tempo de incubação, foi feita a leitura no aparelho FACSCalibur® (Becton & Dickinson Immunocytometry System, San Diego, CA- USA) sendo adquiridos 10000 eventos/amostra utilizando o programa CellQuest Pro. A análise das células em cada fase do ciclo celular foi realizada com o programa Flowjo® versão 10 (Becton & Dickinson – Immunocytometry System, San Diego, CA-USA). Os resultados foram expressos em porcentagem de células nas fases G1, G0/G1, S ou G2/M (figura 5). Foram realizadas triplicatas das células das células AML12 e células expostas aos 30 ciclos de NNK em três experimentos distintos. Os resultados foram apresentados em histogramas (Figuras 10 e 11).

Figura 5 - Ilustração do Ciclo celular



Legenda: Ilustração apresentando o ciclo celular e os componentes de casa fase.
Fonte: Adaptado de Rabinovitch (2002)
e

2.3.6 Ensaio do transwell - análise da capacidade de migração e invasão

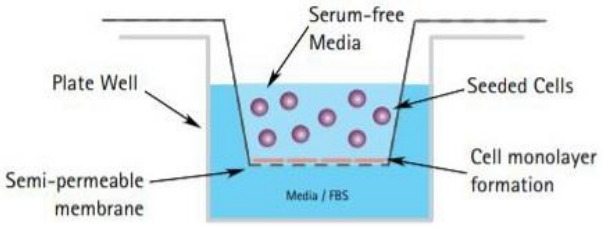
Para o ensaio de migração e invasão foram preparados insertos do transwell (Greiner bio-one® 8.0mµ) com Matrigel (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix, *LDEV-free) em placas de 24 poços estéril. O matrigel foi preparado gelado na proporção de 1:10 (matrigel : DMEM/F12 sem SFB) e adicionado o volume de 100µl em cada inserto do transwell. A placa contendo os insertos, foi incubada em estufa 5% CO_2 a 37°C por 24h para a

solidificação do matrigel. Após a solidificação, foram inseridas 5 x 10^4 células em um volume de 200µl/poço na câmara superior para cada grupo celular: AML12 e AML12 após a exposição a 0,1nM NNK (30 ciclos).

No compartimento inferior, foram adicionados 750µl de DMEMF12 suplementado com 10% SFB, que ficou 24h em contato com o transwell. Após esse período, o meio foi retirado da câmara superior, as células que permaneceram na parte superior do transwell foram removidas com um swab estéril, e o inserto foi novamente inserido em seu respectivo poço. Foram adicionados 50 µl do corante Alamar Blue® (Sal de rezasurina, Thermo Fisher - USA) a 450 µl de meio de cultura (concetração final de10%), conforme instruções do fabricante. O Alamar Blue é um corante fluorimétrico/colorimétrico que se baseia na detecção da atividade metabólica e é utilizado como indicador fluorescente/colorimétrico com propriedade redox. A forma não fluorescente na coloração azul é oxidada, e representa a célula não viável. Já quando se apresenta na forma reduzida é rósea, fluorescente, e é um indicativo de viabilidade célular. Esta solução ficou em contato com as células durante 20h. Após esse período foram coletados 200 µl de todos os poços, inseridos em placas de 96 poços e por fim, foi realizada a leitura a 570nm (Varioskan-Thermo-Fischer).

Os insertos do transwell foram removidos dos poços e fixados com formaldeído 3,7% em PBS na parte interna e externa por 2 minutos, em seguida foram permeabilizados com metanol 100%, durante 20 minutos e finalmente corados com giemsa durante 15 minutos em temperatura ambiente.

FIGURA 6- Ilustração com exemplo de um inserto com transwell, semelhante ao utilizado em ensaio de invasão com as com as células AML12 e 0,1nM NNK



Fonte: Sigma Aldrich (2020)

2.3.7 Perfil de crescimento por meio do ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo tetrazolico)

O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo tetrazolico) (ThermoFischer®-USA) é um ensaio colorimétrico adotado para a determinação da taxa de viabilidade celular. O sal tetrazólico MTT, solúvel em água e de coloração amarelada, é metabolizado pelas enzimas mitocondriais da família das desidrogenases sendo reduzido a formazan, um cristal insolúvel em água e de coloração arroxeada. Através da detecção colorimétrica da quantidade de formazan produzida por células viáveis por meio da leitura em um comprimento de onda de 570nM em aparelhos de espectrofotometria (Varioskan - ThermoFischer®), é possível determinar a taxa de viabilidade celular, e seu crescimento de maneira indireta, sendo esta, diretamente proporcional à quantidade de formazan produzida pelo cultivo celular (MOSMANN, 1983; VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

O ensaio do MTT foi realizado para avaliar a influência da adesão ao substrato no padrão de crescimento celular. Para o presente ensaio, as células AML12 e as células que foram expostas a 30 ciclos com 0,1nM NNK foram cultivadas em placas de 96 poços convencionais (aderentes) (Sarsted® Standandart 96 wells plate) ou de baixa aderência (Ultra low Cluster plate - Corning®).

As células foram plaqueadas em várias concentrações por meio de diluição seriada (Tabela 1) com meio DMEM/F12 + 10% SFB devidamente suplementado com ITS, dexametasona, e 1% de antibiótico-antimicótico em placas de 96 poços de cultivo convencional e em placas de baixa adesão, em quadruplicatas, por 24, 48 ou 72h. A seguir foram submetidas à técnica do MTT. Para tanto, foram adicionados 15µl de MTT na concentração 5mg/ml em cada poço e em seguida, foi incubado em estufa a 37°C com atmosfera umidificada e 5% CO_2 durante 3 horas sob abrigo da luz. O branco foi realizado somente com o meio de cultivo sem células acrescido do MTT.

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100µl de DMSO para a solubilização do MTT. A leitura foi realizada por escpectrofotometria em leitor de placas com o comprimento de onda de 570nm (Multiscan EX - Thermo Fischer®).

Tabela 1: Concentrações de células AML12 e células expostas à 0,1nM NNK por 30 ciclos para ensaio de MTT (células/poço).

AML12	0,1nM NNK
$1x10^4$	$1x10^4$
$5x10^3$	$5x10^3$
$2,5x10^3$	$2,5x10^3$
$1,25x10^3$	$1,25x10^3$
$0,625x10^3$	$0,625x10^3$
$0,3125x10^3$	$0,3125x10^3$
$0,15626x10^3$	$0,15626x10^3$

Legenda: Tabela apresenta a diluição seriada da linhagem AML12 e das células expostas à 0,1nM de NNK por 30 ciclos.
Fonte MIYAKE MIZUSAKA,2020

A determinação da viabilidade celular foi calculada pela fórmula:

$$\%\ viabilidade = \frac{a-b}{c-b}\ x\ 100$$

Onde:

a = média da densidade óptica da amostra;

b = média da densidade óptica do branco;

c = média da densidade óptica do controle.

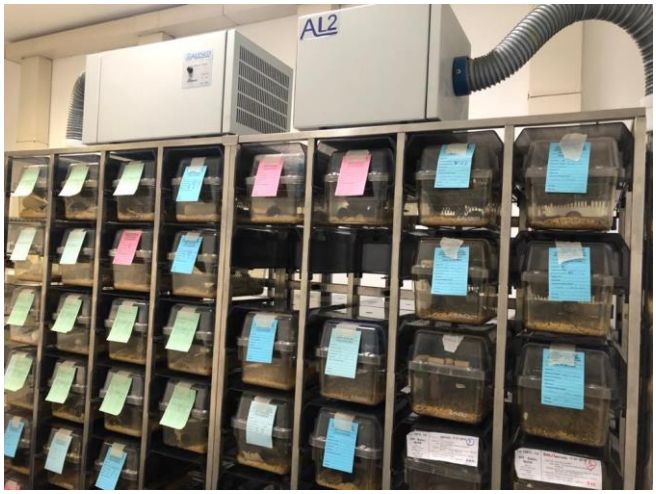
2.3.8 Animais – camundongos atímicos BALB/c Nude

Os animais SPF (Specific Pathogen Free) BALB/c nude machos, com sete semanas foram adquiridos do biotério central da Faculdade de Medicina da USP (FM-USP) e mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os camundongos foram mantidos em gaiolas 100% polisulfona com presença de micro isolador, em sala de sanidade controlada, isolada e devidamente climatizada (22±2°C) com ciclo claro e escuro de 12h. Estes roedores foram alimentados com ração peletizada *ad libitum* (Nuvilab- CR1, Nuvital Nutrientes) e receberam livre demanda de água previamente autoclavada.

Os animais foram acomodados em rack ventilada (Alesco ®- Brasil) (figura 7) e em grupos de 5 animais/gaiola (figura 8). A limpeza da gaiola dos animais foi realizada

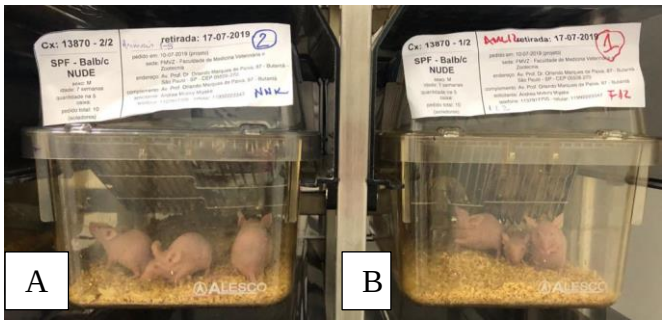
semanalmente, foram utilizadas gaiolas esterilizadas, bem como a maravalha autoclavada. A manipulação dos animais se deu em fluxo laminar (TROX®) e todos os materiais que entravam em contato com o animal eram devidamente desinfectados.

Figura 7 - Rack ventilada do biotério FMVZ-USP.



Legenda: Os animais permaneceram isolados do ambiente com temperatura controlada e em gaiolas com microisoladores.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA, (2020).

Figura 8 – Animais BALB/c nude macho do grupo de estudo e grupo controle.



Legenda: Animais BALB/c nude macho em gaiolas microisoladas. **A:** Grupo de estudo 0,1nM NNK. **B**: Grupo CTL.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020).

2.3.9 Teste de tumorigenicidade em animais BALB/c Nude.

No presente estudo foram utilizados 10 animais machos, de sete semanas. Os animais foram inoculados no subcutâneo com células AML12 (CTL), células expostas a 0,1nM NNK ou somente meio DMEM/F12 (controle veículo). Cerca de 1 x 10^7 células/animal em 150ul de meio DMEM/F12 isento de SFB foram inoculadas no subcutâneo do flanco do animal.

O grupo controle recebeu células AML12 inoculadas no subcutâneo do flanco inferior direito, e o grupo 0,1nM NNK recebeu a mesma quantidade de células no flanco inferior

esquerdo. A fim de validar o controle do veículo, foram inoculados 150µl meio de cultivo DMEM/F12 livre de SFB na mesma região que o grupo controle.

Os animais foram marcados e acompanhados semanalmente para verificação de seus sinais clínicos bem como a mensuração de peso. Todos os experimentos foram desenvolvidos no biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) e foram devidamente avaliados e autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP, número do protocolo CEUA 7882140818. Após o período de 120 dias pós inoculação, os animais foram eutanásiados, seguindo o protocolo de sedação descrito em CEUA/FMVZ com adoção de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg).

2.3.10 Processamento de tecidos para avaliação do teste de tumorigênese in vivo

Os animais foram eutanasiados seguindo o protocolo da CEUA-FMVZ, descrito anteriormente e alguns órgãos foram extraídos para posterior processamento e análise. Foram pesados fígado e baço dos animais, imediatamente após o sacrifício. O cálculo do peso relativo do fígado e baço foram obtidos pela seguinte fórmula:

$$Peso\ relativo = \frac{peso\ do\ órgão(g)}{peso\ corpóreo(g)} x100$$

Todos os órgãos foram submetidos ao protocolo de processamento, já previamente estabelecido em nosso laboratório. Os tecidos foram fixados em solução de formol 10% por 48 horas, sendo a seguir colocados em álcool 70% por duas horas. Seguiu-se a bateria de desidratação em álcool 80%, álcool 96%, álcool absoluto I, pelo mesmo período de duas horas, em seguida os tecidos permaneceram no álcool absoluto II *overnight*. No dia seguinte, foram inseridos no xilol - álcool por 30 minutos, parafina I e na sequência parafina II ambas por duas horas. Para finalizar, deu-se a sequência no emblocamento com parafina e cera de abelha na proporção de 9:1.

Foram obtidos cortes histológicos na espessura de 5µm em micrótomo (RM2255-Leica/USA) para a confecção de lâminas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) e reação de Perls. Os cortes foram dispostos em lâminas 26.0 x 76.0mm (Knittel-Germany) e posteriormente desparafinizadas e hidratadas em banhos sucessivos de xilol, xilol-álcool e álcool, devidamente coradas com hematoxilina (Merck/ USA) e contracorado com eosina (Sigma).

A hematoxilina e eosina (HE) habitualmente é adotada como coloração padrão para identificação e análise patológica. É possível examinar tecidos que foram previamente fixados e processados. Por meio desta metodologia, a hematoxilina cora o núcleo em azul ou violeta e a contracoloração de eosina, confere a coloração cor-de-rosa ao citoplasma e ao colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Diante disto, após análise prévia das lâminas de HE, foram então selecionadas randomicamente algumas amostras de tecidos de ambos os grupos para a realização da reação de Perls (Easypath, Grupo Erviegas, Brasil), a fim de avaliar o ferro férrico e tecido conjuntivo em cortes histológicos. Este método tem como princípio a reação de ferrocianeto de potássio que reage com ferros férricos de hemossiderina em ambiente ácido para formar um sal colorido, o Azul Prussiano.

2.4 Análise estatística

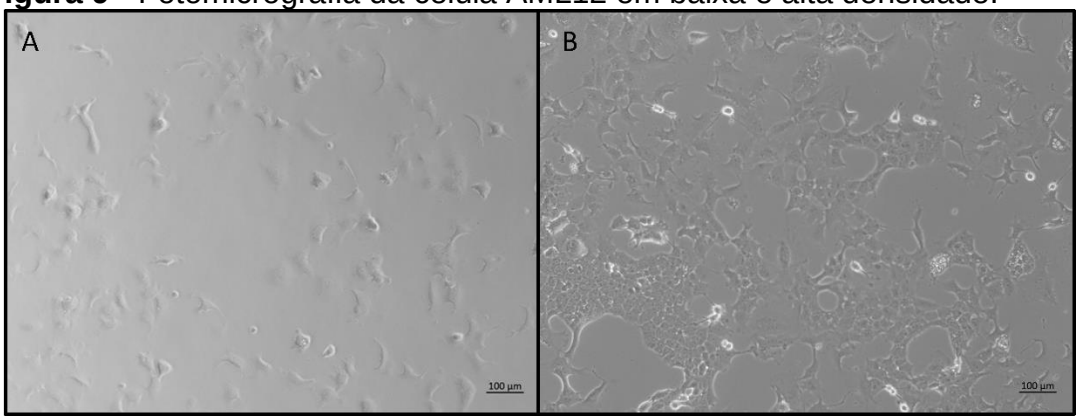
Para a análise estatística dos dados foram utilizados os programas computacionais GraphPad Prism5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Para os dados paramétricos foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni para comparação entre os grupos experimentais. Para os dados não paramétricos foi utilizado teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparação entre os grupos. Foi adotado o nível de significância de 5% para todos os testes estatísticos.

2.5 **Resultados**

2.5.1 Cultivo celular da linhagem AML12

A figura 9 apresenta o aspecto morfológico da célula AML12 em diferentes densidades, após 24 e 72h de cultivo.

Figura 9 - Fotomicrografia da célula AML12 em baixa e alta densidade.



Legenda: **A:** célula 24h após o cultivo. **B**: Célula 72h após o cultivo celular. Objetiva de 10x (Zeiss - GER). Barra de escala = 100µm.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

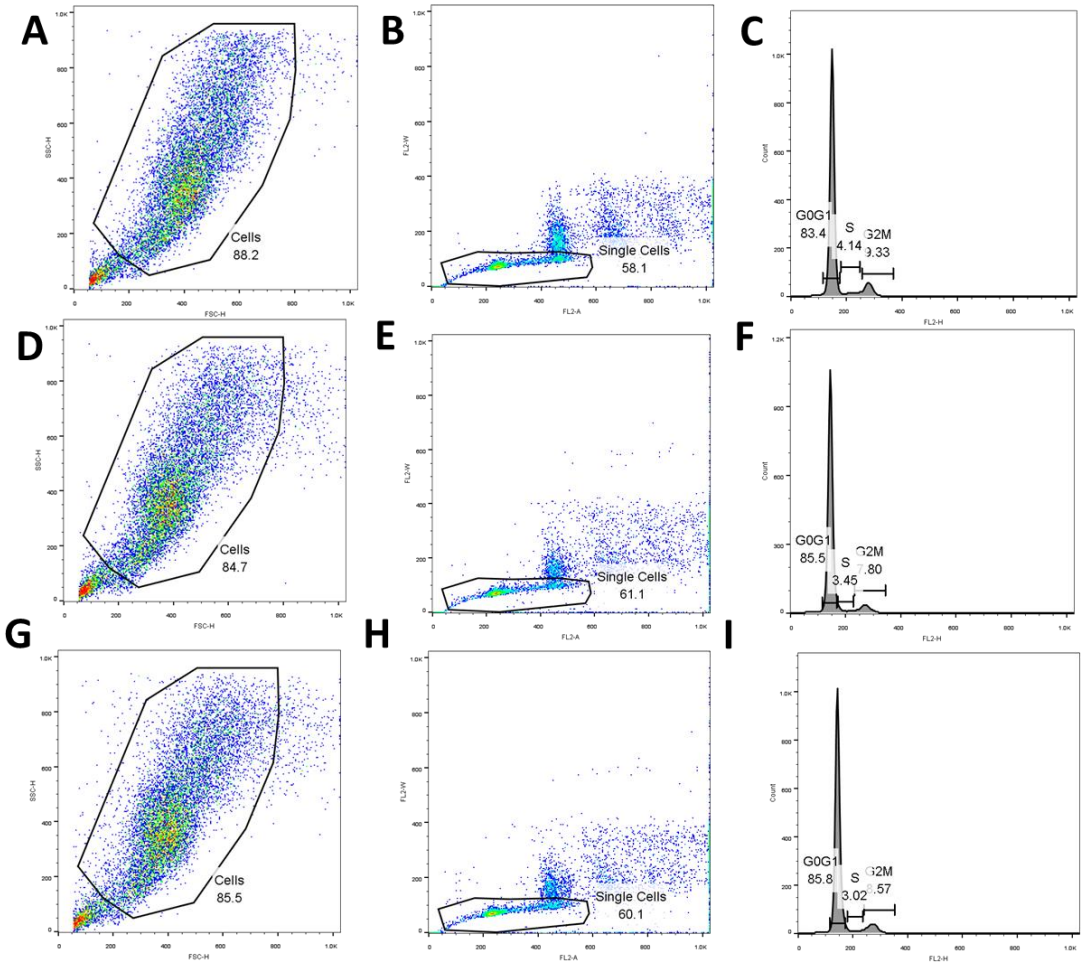
2.5.2 Avaliação do ciclo celular da linhagem AML12 (CTL) e das células que foram expostas a 0,1nM de NNK

A figura 10 apresenta a estratégia adotada no experimento do ciclo celular nas linhagens AML12 (CTL) e AML12 que foram expostas a 0,1nM de NNK durante 30 ciclos.

Pode-se observar no histograma ilustrativo de um dos experimentos realizados com as células AML12 (CTL) (Figuras 10C, 10F, 10G) e nos histogramas das células submetidas à exposição com 0,1nM NNK (Figuras 11C, 11F, 11G) que existe uma diferença nos valores apresentados na fase S, quando avaliamos as células expostas à concentração de 0,1nM de NNK (20,8%, 22,1% e 19,0%) com o seu controle AML12 (CTL) (4,14%, 3,45%, 3,02%), mostrando que a leitura das células submetidas à exposição a longo prazo são superiores em relação ao controle nesta análise. Pode-se também observar, que a média dos valores corrigidos referente aos três experimentos realizados, demonstram aumento na fase S e a diminuição na fase G0/G1 nas células que foram expostas à concentração final de 0,1nM de NNK quando comparado ao grupo controle (Figura 12). A média de células em fase S do ciclo celular no grupo AML12 expostas a concentração de 0,1nM NNK (10,72 $\pm$ 8,01, n=9) é estatísticamente maior ($p<0,05$) em relação ao grupo controle (2,63 $\pm$ 0,83, n=9) pelo teste ANOVA de duas

vias seguida do pós-teste de Bonferroni. Esses resultados indicam que o carcinógeno NNK é capaz de induzir o aumento da proliferação destas células com esta concentração de 0,1nM após 30 ciclos de exposição.

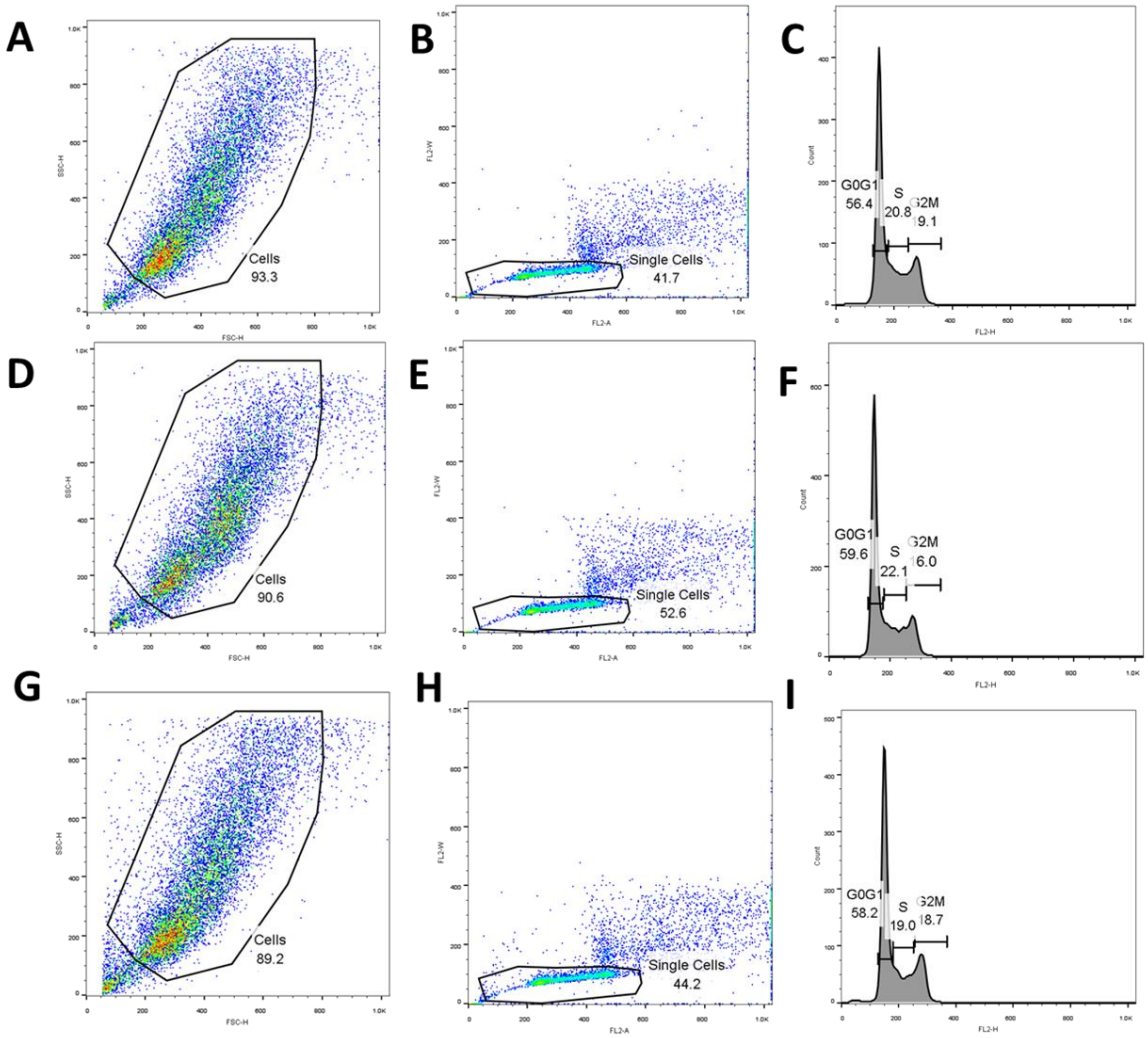
Figura 10 - Estratégia de análise do ciclo celular da linhagem de célula AML12 (CTL) de experimentos distintos.



Legenda: Imagem representativa do ciclo celular da linhagem AML12 (CTL). **A, D, G:** Dot plot representativo da seleção da população da célula AML12 (CTL); **B,E,H**: Dot plot da seleção de single cells (FL2-W x FL2 -A)**; C, F, I**: Histograma que representa as diferentes fases do ciclo celular por meio da análise automatica (FlowJow) da porcentagem de cada fase (Cont x FL2 - H). Foram realizados três experimentos distintos.

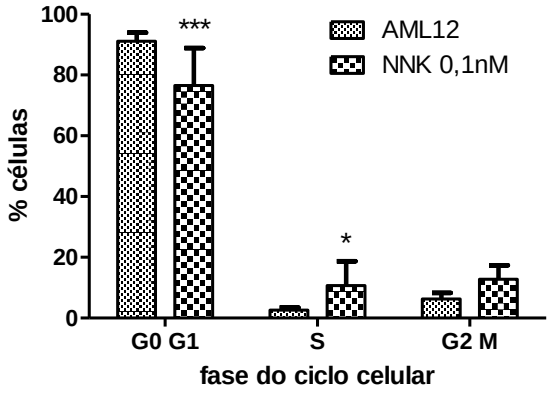
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA 2020.

Figura 11- Estratégia de análise do ciclo celular das células expostas a 30 ciclos na a concentração de 0,1nM NNK



Legenda: Imagem representativa do ciclo celular das células expostas a 0,1nM NNK. **A, D, G:** Dot plot representativo da seleção da população da célula AML12 expostas ao NNK. **B, E, H**: Dot plot da seleção de single cells (FL2-W x FL2 -A)**. C, F, I**: Histograma que representa as diferentes fases do ciclo celular por meio da análise automatica (FlowJow) da porcentagem de cada fase (Cont x FL2 - H). Foram realizados três experimentos distintos.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA 2020.

Figura 12- Gráfico em barra que apresenta o percentual de células em cada fase do ciclo celular das células AML12 e células após a exposição de longo prazo a 0,1nM de NNK

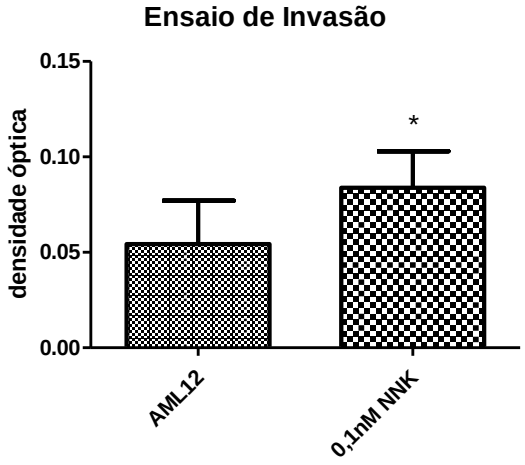


Legenda: A diferença é estatisticamente significativa na fase G0/G1($p<0,001$) e na fase S ($p<0,05$) utilizando-se o teste ANOVA de duas vias seguido de pós teste de Bonferroni.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

2.5.3 Avaliação do ensaio da capacidade de invasão e migração por meio da técnica do Transwell

A figura 13 apresenta a capacidade migratória e de invasão das células AML12 (CTL) e das células AML12 após a exposição de longo prazo, na concentração de 0,1nM NNK na técnica do transwell. Após a metabolização do Alamar Blue pelas células viáveis que transpassaram o matrigel, foi coletado o meio de cultura do poço onde o transwell estava inserido para a realização da leitura colorimétrica. O grupo que foi submetido à concentração de 0,1nM de NNK migrou e invadiu mais em relação ao grupo controle ($p=0,0352$), observado pela maior densidade ótica do meio de cultivo após 20h de incubação com o Alamar Blue, que pode ser visto no gráfico de barras (Figura 13).

Figura 13 - Gráfico em barra representando a leitura da densidade óptica das células que cruzaram o inserto e invadiram o matrigel no ensaio de invasão.



Legenda: Células AML12 (CTL) e células AML12 após 30 ciclos de exposição ao NNK 0,1nM incubadas com o corante Alamar Blue por 20h. A diferença é estatisticamente significativa (p=0,0352) utilizando-se o teste T de Student não pareado.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

2.5.4 Perfil de crescimento das células AML12 (CTL) e AML12 após 0,1nM de NNK em cultivo aderente (2D) e baixa adesão (3D) avaliado por meio do ensaio do MTT

Nesta análise, foi avaliado como seria o crescimento e viabilidade celular da linhagem AML12 (CTL) e das células AML12 após a exposição de longo prazo com a concentração de 0,1nM NNK em cultivo aderente e de baixa adesão ao substrato.

No cultivo em monocamada (2D) pode se observar um aumento gradativo ao longo do tempo na leitura da densidade óptica de cada concentração celular, nas células AML12 (CTL), ou seja, indica crescimento celular ao longo do tempo (Figura 14A).

No grupo exposto a 0,1nM de NNK cultivado em 2D (Figura 14B) também se observa aumento gradativo da densidade ótica de cada concentração celular ao longo do tempo. Entretanto, a concentração de 10000 cels/poço apresentou decréscimo significativo ($p<0,001$) na leitura da densidade ótica mensurada no tempo de 72h, sugerindo morte celular decorrente do crescimento excessivo e consequente deprivação de nutrientes.

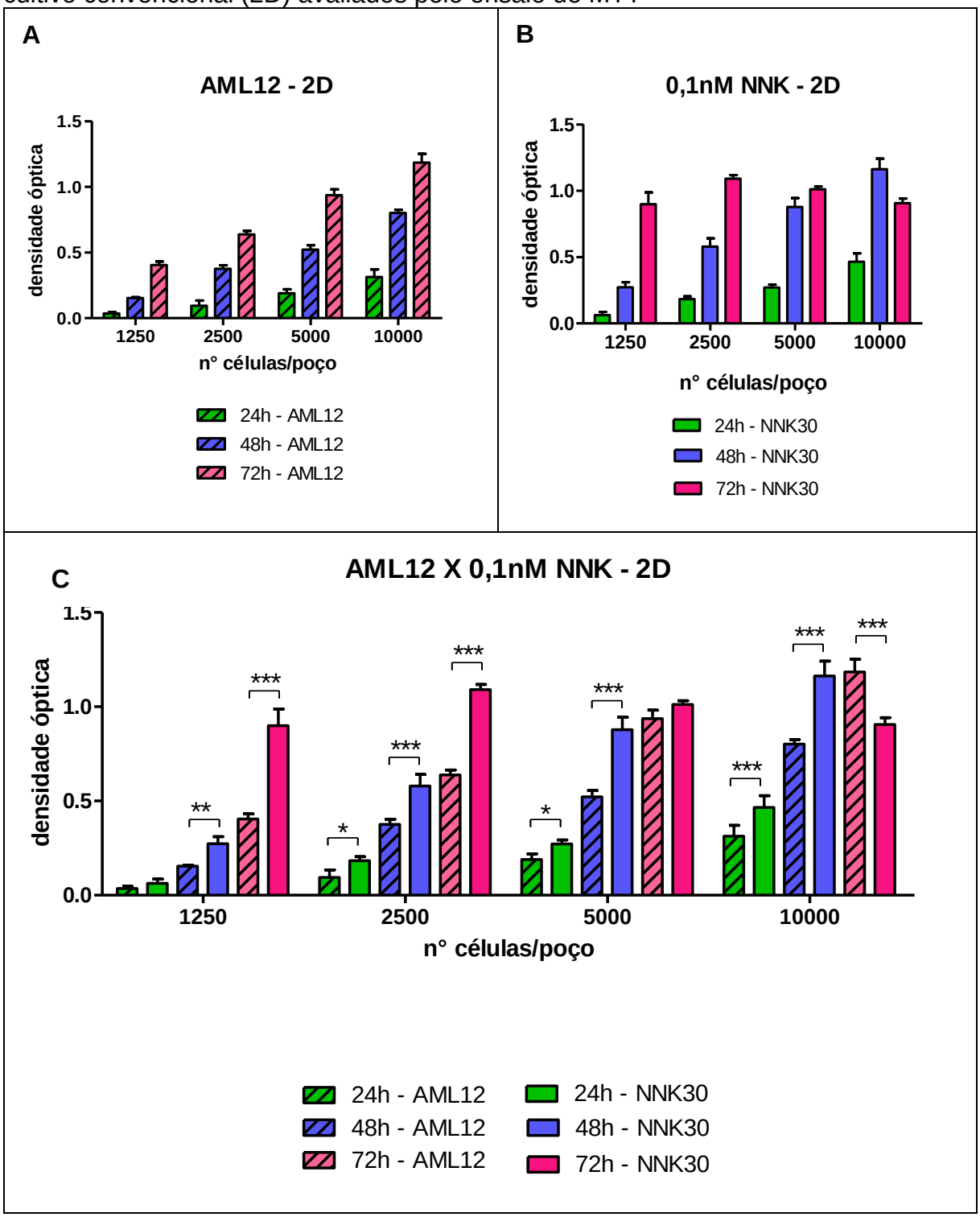
Quando comparamos os grupos controle e grupo exposto a 0,1nM NNK no cultivo 2D (Figura 14C), é possível notar que, as células expostas ao NNK apresentam uma leitura de densidade ótica sempre maior, com exceção da concentração de 10000 cels/poço no tempo de 72h, decorrente provavelmente da morte celular por excesso de crescimento.

Quando analisamos o cultivo 3D em placas de baixa adesão (ultra low), no grupo AML12 (CTL) não há aumento significativo da densidade ótica de cada concentração celular ao longo do tempo, e inclusive pode-se notar queda na leitura no tempo de 72h sugerindo morte celular (figura 15A). Já no grupo exposto a 0,1nM de NNK por 30 ciclos é possível notar o aumento progressivo da leitura da densidade ótica ao longo do tempo, em cada concentração celular (figura 15B).

Quando comparamos o grupo AML12 (CTL) *versus* o grupo que foi exposto a 0,1nM de NNK (figura 15C), pode -se observar que as células expostas ao NNK apresentam uma leitura de densidade ótica maior do que o grupo controle, principalmente nas maiores concentrações de células de 5000 e 10000 cels/poço ($p<0,001$), o que nos sugere um crescimento celular no grupo exposto ao NNK nesta condição de cultivo de baixa adesão (independência de ancoragem).

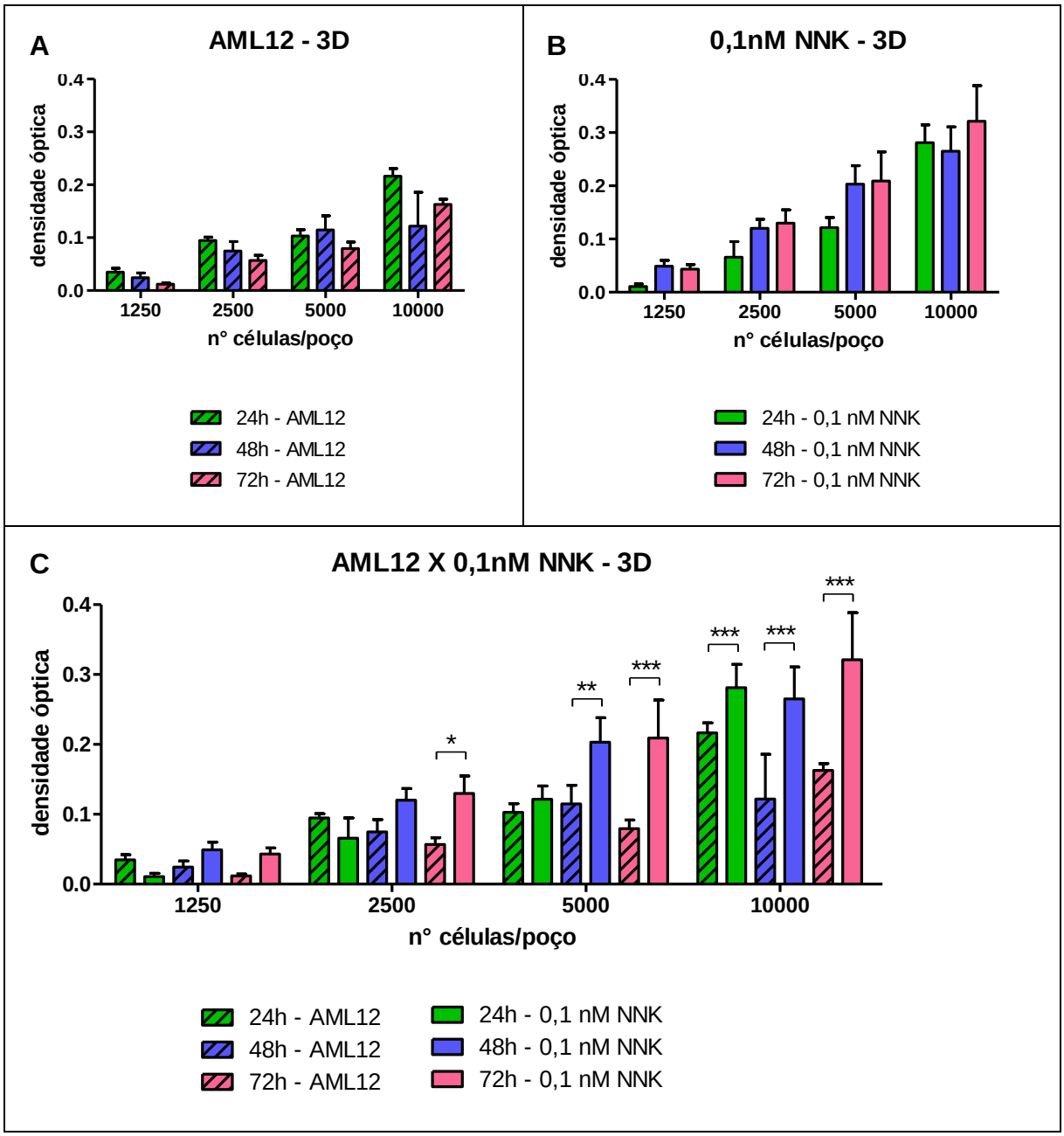
Nos gráficos apresentados abaixo, estão dispostas as concentrações mais elevadas da diluição seriada realizada.

Figura 14 -Gráfico de barras da densidade óptica de células AML12 (CTL) e células expostas a 30 ciclos de 0,1nM NNK cultivadas por diferentes períodos em placas de cultivo convencional (2D) avaliados pelo ensaio de MTT



Legenda: **A** e **B:** células AML12 (CTL) (**A**) e células expostas à 0,1nM NNK (**B**) foram avaliadas em tempos distintos de crescimento em monocama (2D). **C**: Comparação entre as densidades ópticas do grupo controle e grupo exposto ao NNK nas respectivas concentrações de células em diferentes tempos. ANOVA de duas vias seguido de pós teste de Bonferroni *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 15 Gráfico de barras da densidade óptica de células AML12 (CTL) e células expostas a 30 ciclos de 0,1nM NNK, cultivadas por diferentes períodos em superfície de baixa adesão (ultra low) avaliadas pelo ensaio do MTT



Legenda: **A** e **B:** células AML12 (CTL) (**A**) e células expostas à 0,1nM NNK (**B**) foram avaliadas em tempos distintos de crescimento em superfície de baixa adesão (3D). **C**: Comparação entre as densidades ópticas do grupo controle e grupo exposto ao NNK nas respectivas concentrações de células em diferentes tempos. ANOVA de duas vias seguido de pós teste de Bonferroni *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

2.5.5 Teste de tumorigenicidade em animais imunodeficientes BALB/c nude inoculados com células AML12 (CTL) e células expostas a 0,1nM de NNK

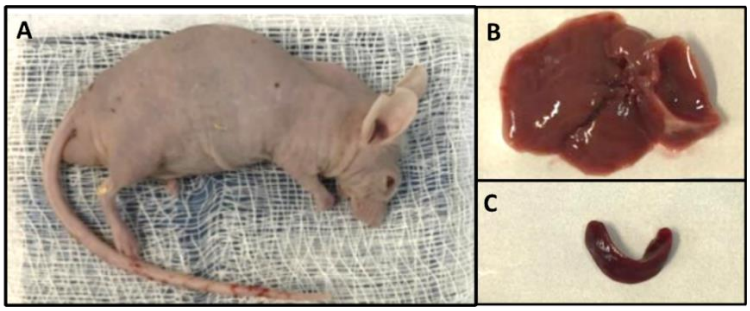
Para o presente ensaio, foram utilizados 10 animais imunodeficientes BALB/c nude, dos quais cinco animais receberam as células que foram anteriormente expostas à concentração de 0,1nM de NNK, três receberam somente as células AML12 (CTL) e dois animais receberam somente o meio de cultura DMEM/F12.

Na observação semanal dos animais inoculados com células expostas a 30 ciclos de 0,1nM NNK ou células AML12 (CTL), não foram identificados sinais clínicos anormais, nem mesmo crescimento de massa tumoral macroscópica no subcutâneo do local ou em regiões adjacentes à inoculação ao longo de 16 semanas.

Após a eutanásia dos animais dos grupos AML12 (CTL), DMEM/F12 (controle do veículo) e NNK 0,1nM (células expostas ao NNK), foram aferidos o peso de cada animal e observou-se que não houve diferença estatística. Mesmo o grupo DMEM/F12 tendo apresentado o maior ganho de peso entre grupos, esse aumento não foi relevante uma vez que não houve significância estatística (p=0,8300).

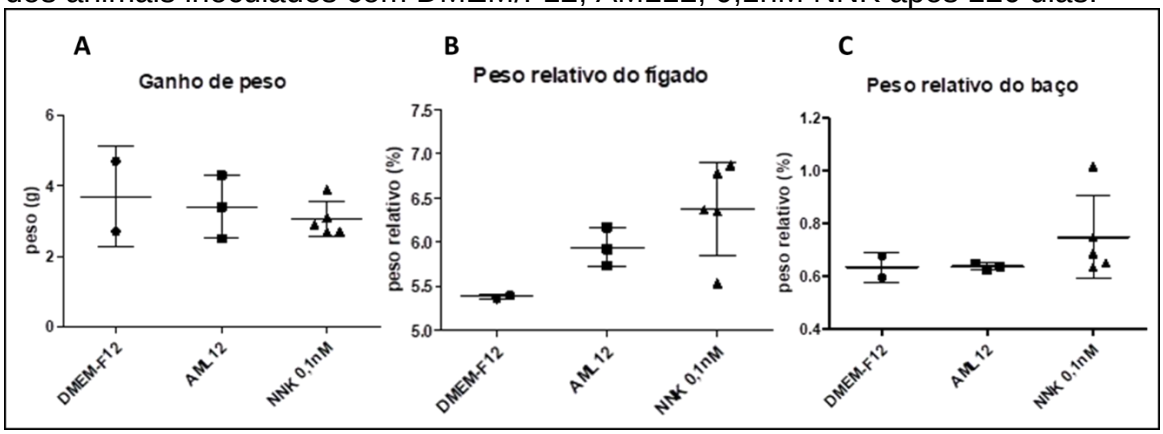
Foi realizado a necrópsia dos animais (Figura 16) e foram extraídos e aferidos o peso médio relativo do baço (Figura 16C) e fígado (Figura 16B). No que se refere ao baço, neste quesito não houve diferença estatística (p=0,2052) entre os grupos avaliados. No peso relativo do fígado (Figura 17C) não houve diferença estatística significante (p=0,0626p) entre os grupos avaliados, conforme apresenta a figura 17B a seguir.

Figura 16 – Imagem de camundongo nude do grupo 0,1nM de NNK, com coleta de fígado e baço para aferição de peso em balança convencional instantes após a eutanásia



Legenda:**A:** Animal BALB/c nude macho logo após eutanásia aferindo peso de 30,7g**.**
B: fígado extraído de animal logo após eutanásia do grupo 0,1nM NNK aferindo 2,0g.
C:Baço extraído de animal nude logo após eutanásia do grupo 0,1nM NNK aferindo 0,2g
Fonte :MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 17- Gráfico do ganho de peso, peso relativo do fígado e peso relativo do baço dos animais inoculados com DMEM/F12, AML12, 0,1nM NNK após 120 dias.



Legenda: A: Média do ganho de peso após 120 da inocução (p=0,8300). **B**: média do peso relativo do fígado (p=0,0626). **C**: média do peso relativo do baço (p=0,2052). Análise estatística Kruskall-Wallis.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Foi realizada a análise histopatológica e pode-se observar que na por meio da coloração de Hematoxilina Eosina (HE) que não houveram achados morfológicos significativos.

2.6 **Discussão**

O tabagismo é um grande problema mundial de saúde pública que contribui com o desenvolvimento de diversas doenças crônicas, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), câncer de pulmão (GE; XU; CHEN, 2015), câncer de cabeça e pescoço (COHEN, FEDEWA, CHEN; 2018), e altas taxas de morbidade e mortalidade. Em 2011, o tabagismo foi responsável por 14,7% do total de mortes ocorridas no Brasil (PINTO et al, 2015).

O NNK *4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone*, com fórmula molecular de $C_{10}H_{13}N_3O_2$ e peso molecular de 207.23 (TORONTO CHEMICALS, CA), um derivado da nicotina, é um dos agentes tóxicos que compõem o cigarro e tem sido identificado como um dos mais potentes carcinógenos em células pulmonares (SHULLER; PLUMMER; JULL, 2003; HECHT, 2006) sendo considerado um dos mais importantes carcinógenos devido à sua potente carcinogenicidade em animais de laboratório (BALBO et al., 2014). Mennencier e colaboradores (2014) observaram que prolongadas exposições ao NNK sob baixas concentrações foram capazes de conduzir as células pulmonares murinas E10 a um aumento da capacidade maligna, apresentaram marcadores para câncer com aumento da proliferação, bem como a migração celular e demonstraram ainda habilidade de desenvolver tumores subcutâneos *in vivo*.

O ciclo celular é um processo complexo de síntese e duplicação do DNA, composto pelas fases G1, S e G2/M. Segundo Schafer (1998), o cerne deste processo são as ciclinas dependentes de kinases (CDKs) as quais estão envolvidas em um refinado processo com as proteínas ciclinas, proteínas que regulam a progressão celular através das fases do ciclo.

Verificamos a partir do ensaio do ciclo celular, realizado com marcação nuclear com iodeto de propídeo, que após a exposição dos hepatócitos AML12 à 0,1nM de NNK ao longo de 30 ciclos, as células apresentaram aumento significativo na fase S e diminuição na fase G0/G1. Esse resultado de aumento da fase S, vai de encontro com achados da literatura. Schafer (1998) apresenta que o ciclo celular pode ser afetado, principalmente em alguns endpoints pela interação de substâncias tóxicas, tais como o NNK. Com isso esta ferramenta pode ser adotada para estudar os mecanismos de várias drogas e toxinas (HANEEF et al., 2014) e a análise de ciclo celular pode ser uma tecnologia útil na determinação e na identificação dos efeitos de drogas ou toxinas no ciclo celular.

Diante disto, a análise do ciclo celular pode ser adotada como instrumento para compreensão de estudos toxicológicos, além da compreensão do comportamento das células pós exposição ao NNK, pois substâncias tóxicas podem afetar *check points* celulares, como

pode ser bem ilustrado em diversas quimioterapias para o câncer (SAITO et al, 2015) e também vão de encontro com a outros achados da literatura. Haneef e colaboradores (2014) ilustram que um dos prováveis caminhos para a perda de controle do ciclo celular pode ser a alteração das proteínas regulatórias quinases dependentes de ciclinas (*do inglês* CDKs) em decorrência da interação com substâncias químicas ou carcinógenos e puderam predizer, por meio de técnicas *in sílico*, que o CDK8 falha ao formar um complexo complementar ao seu par a proteína ciclina C, sob a presença do NNK. Esse dano funcional pode acarretar na perda de controle do ciclo celular e colaborar para o desenvolvimento de um possível processo carcinogênico.

O papel e comportamento das proteínas ciclinas e CDKs após a exposição da concentração final de 0,1nM de NNK nos hepatócitos murinos ainda necessita ser mais bem elucidado. Mesmo tendo em vista que a concentração é baixa e pode ser aparentemente inofensiva, podemos sugerir que após exposições sucessivas em baixas concentrações (0,1nM de NNK) pode ser danoso para a homeostasia celular, provocando o *start* de processos carcinogênicos uma vez que, segundo Hannef e colaboradores (2014), uma da prováveis razões para a perda do controle da maquinaria do ciclo celular pode estar envolvido com o abalo dessas proteínas regulatórias, como as ciclinas (MENNENCIER et al, 2014; SIRIWARDHANA, CHOUDHARDY, WANG, 2007).

Baseado nos presentes achados, e nos resultados que obtivemos, podemos sugerir que o aumento apresentado na fase S da análise de ciclo celular das células AML12 pode ser resultado desta perda do controle do ciclo celular derivado da alteração das proteínas regulatórias, entretanto maiores análises se fazem necessárias para a comprovação desta hipótese.

Quando analisamos a migração e invasão das células por meio da técnica do transwell, observamos que, após a exposição da célula AML12 com a concentração final de 0,1nM de NNK durante 30 ciclos, houve o aumento da taxa de migração e invasão. Esses resultados vão de encontro com os achados de Wei e colaboradores (2009) que verificaram somente o aumento da taxa de migração por meio da técnica do transwell e pelo ensaio de migração celular (técnica de wound healing) em células de adenocarcinoma colorretal humano HT-29 e DLD-1 após a incubação com NNK. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que a via de ação do NNK nas células HT29 era mediada pelo α7-nAChR e pela regulação negativa de E-caderina. Além disso, também foi observado neste estudo, um aumento da expressão de outros fatores que moderam de maneira negativa a transcrição da E-caderina. Em outros estudos realizados por Shen e colaboradores (2013) com linhagens de células pulmonares humanas H1299, H82, H157 e H460 (ATCC, USA), também foi observado que o NNK na concentração de 0,1nM estimulou

a migração e invasão celular na técnica do transwell. Neste estudo os autores verificaram que o estímulo da migração foi mediada pela sinalização de α7-nAChR e a ativação de c-Src, o qual fosforila múltiplos subtratos incluindo PKCι (WOOTEN et al.,2001) e FAK (CALALB; POLTE; HANKS, 1995; CALALB et al.,1996) necessário para a adesão celular e o espraiamento.

Outros trabalhos também mostram que NNK foi capaz de promover a migração e invasão em células pulmonares humanas. Xu e Deng (2004) demonstraram que o NNK, pode ativar a migração e proliferação celular invasão por meio da fosforilação da calpaína, em células de carcinoma pulmonar humano NCI-H69. A família das calpaínas são enzimas proteolíticas, e as pricipais são a calpaína I e calpaína II. Elas contribuem para processos de angiôgese, por meio da realização de poros na membrana do vaso sanguíneo, permitindo que as células de câncer iniciem sua invasão. Outro fato interessante é que estudos indicam que, a calpaína está localizada em complexos associados à integrina. Esta por sua vez está associada à matriz extracelular (ECM). Essa hipótese talvez explicaria a invasão no matrigel. Neste trabalho as células NCI-H69 foram tratadas com um inibidor específico para a calpaína, em várias concentrações, o calpeptin, e observou-se que o calpeptin não somente bloqueou o aumento da atividade da calpaína mediada pelo NNK, como também inibiu a invasão celular mediada pelo NNK. Então isso comprova que a calpaína está intimamente associada aos processos de migração e invasão mediados pelo NNK em células pulmonares. Entretanto, embora a concentração de carcinógeno seja a mesma que adotamos em nossos estudos, não podemos afirmar que o NNK induz a invasão dos hepatócitos da mesma forma, uma vez que em nosso estudo não foi avaliado a via de transdução de sinal que o NNK ativa nas células AML12.

Um estudo avaliou em células pulmonares humanas H157 e A549 o papel do Twist, *(basic helix-loop-helix (bHLH) domain-containing transcription fator)* um fator de transcrição que tem sua origem na decodificação do gene twist. Neste estudo foi realizado a exposição por quatro semanas em diferentes concentrações (0, 1, 2 e 5 µM) de NNK. O carcinógeno promoveu o aumento da expressão da proteína Twist e de seu RNA mensageiro, o que sugere que Twist pode estar envolvido na promoção de migração e invasão em células pulmonares provocado pelo NNK (WANG et al 2020). Entretanto, é prematuro afirmar que o gene Twist possui o mesmo papel em nosso modelo adotado de linhagem de hepatócitos murinos, contudo pode ser um caminho a ser melhor elucidado para o entendimento da promoção da migração e invasão neste tipo celular.

Quando avaliamos viabilidade celular pela técnica do MTT em cultivo 2D e das células AML12 (CTL), pode-se observar um perfil de crescimento com curva ascendente ao longo das

72h em cada concentração celular. Quando cultivamos o grupo exposto (0,1nM NNK) no cultivo monocama (2D), nota-se que o perfil da curva de crescimento de cada concentração celular é também crescente ao longo tempo, porém há uma nítida diminuição na leitura no tempo de 72h na maior concentração de 10000 cels/poço, provavelmente pelo crescimento excessivo com decorrente morte celular.

Diante disso, quando comparamos a viabilidade celular no cultivo monocamada (2D) dos distintos grupos celulares (CTL *versus* NNK), observa-se que, a densidade óptica do grupo NNK é significativamente maior em relação ao controle, nas diferentes concentrações celulares. Entretanto, na concentração celular de 10000cels/poço a diferença estatística encontrada é decorrente provavelmente da morte celular ocorrida pela escassez de nutrientes.

Já quando as células foram cultivadas em placas de baixa adesão (3D), o grupo controle não demonstrou um perfil de crescimento ao longo do tempo.Isso pode ser em decorreência de um processo chamado Anoikis, uma forma de morte programada induzida (apoptose) pela perda da adesão à matriz extracelular (PATANKAR et al 2019).

Isso pode ter ocorrerido em virtude da falta de adesão e dependência de ancoragem, o que nos apresenta que esta célula do grupo contole não adquiriu propriedades tumorigênicas (LANDOLPH, 2014).O grupo que foi exposto ao carcinógeno, apresentou uma curva de crescimento crescente ao longo do tempo em cada concentração celular.

E por fim, quando comparamos o grupo CTL *versus* NNK no cultivo 3D, é possível notar que as células que foram expostas a 30 ciclos na concentração 0,1nM de NNK, apresentaram uma leitura na densidade ótica superior ao grupo controle. Essa diferença é estatisticamente relevante ($p<0,001$). Foram observadas densidades ópticas superiores nas concentrações de 5000 cels/poço nos tempos 48h e 72h ($p<0,01$) e na concentração celular 10000 cels/poço nos tempos 24h, 48h e 72h ($p<0,001$). A leitura da densidade óptica é uma ferramenta que nos informa indiretamente, sobre o perfil de crescimento celular. Portanto podemos afirmar que houve um maior crescimento celular das células expostas a dose de 0,1nM de NNK em cultivo sob condições de baixa adesão.

Esses achados podem sugerir que baixas concentrações de NNK podem contribuir com o evento de crescimento independente de ancoragem, que é uma das características de células cancerosas, células tronco e células tronco tumoral (KATAYAMA, H; 2020; YAMADA; CUKIERMAN, 2007). Este fenômeno vai de encontro com Fararjeh e colaboradores (2018), que observaram em seu estudo que, o NNK em exposições combinadas com a nicotina, em exposições de longo prazo, mesmo em baixas concentrações de 1pM (Secondhand Smoke) é capaz de conduzir a propriedades tumorigênicas, aumentou a viabilidade celular de maneira

dependente com as exposições e após ensaio de soft ágar observou-se aumento no número de colônias, o que mostra que depois de 23 ciclos estas células adquiriram a habilidade de formar colônia, ou seja, apresentaram independência de ancoragem.

O teste de tumorigênese é definido pela WHO (1998) como a população celular que foi previamente inoculada no animal e torna-se capaz de produzir tumor por meio do local da inserção ou através de metástase. Este é considerado como um teste padrão ouro (*gold standart)* para afirmação do perfil tumoral de um dado grupo celular.

Após o processamento e análise histopatológica dos órgãos não foram identificados achados significativos que demonstre perfil tumorigênico das células inoculadas, ou seja, as células AML12 expostas ao NNK 0,1nM por longo prazo não conduziram a formação de tumor no tecido subcutâneo ou região adjacente a inoculação dos animais BALB/c nude após 120 dias. Não foi observado a formação de tumor em nenhum dos grupos acompanhados.

Foi também avaliado a média do peso relativo dos órgãos, contudo tanto no baço, quanto no fígado não houve diferença estatística significante.

.

2.7 Resumo dos Achados

- As células AML12 permanecem viáveis após o protocolo de exposição de longo prazo ao carcinógeno NNK na concentração final de 0,1nM após 30 ciclos;
- As células AML12 expostas a 0,1 nM de NNK por 30 ciclos apresentaram maior índice proliferativo evidenciado pela maior proporção de células em fase S do ciclo celular em relação ao controle, na análise por citometria de fluxo;
- Observamos que as células AML12 expostas a 0,1 nM de NNK por 30 ciclos apresentaram maior capacidade de invasão em relação ao controle no ensaio do transwell;
- As células AML12 expostas a 0,1 nM de NNK por 30 ciclos mostraram maior capacidade de sobrevivência independente de ancoragem (cultivo em superfície de baixa adesão) e viabilidade celular em relação ao controle observados pelo ensaio do MTT;
- Não houve crescimento de tumor em camundongos imunodeficientes BALB/c nu/nu inoculados no subcutâneo ($1x10^7$ células/animal) com células AML12 expostas a 0,1 nM de NNK por 30 ciclos ou células AML12 controle (não expostas ao NNK).

3 CAPÍTULO - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE CURTO PRAZO E DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS AML12 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NNK

3.1 Introdução

Uma vez que as células AML12 quando expostas inicialmente a uma baixa concentração do carcinógeno NNK (0,1nM) apresentaram uma performance sutil e os testes de tumorigênese *in vivo* foram negativos, decidimos avaliar qual seria o comportamento celular após a exposição a concentrações maiores de NNK. Foram analisadas as concentrações de 10nM e 1000nM

Para compreender e avaliar a performance dos hepatócitos AML12 após a exposição ao NNK nas concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM foram realizados os ensaios de toxicidade com auxílio do ensaio do MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, ensaio que permite determinar a viabilidade celular (MOSMANN, 1983; VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

Foi também realizado o ensaio de migração celular. Este é definido como um movimento individual da célula (HULKOWER, HERBER; 2011). As células se utilizam do processo de migração no organismo, tanto em condições fisiológicas de homeostase, como em condições patológicas, já quando estão submetidas a um processo de metástase ou a outros processos patológicos tais como invasão tumoral, neoangiogênese, estas células tumorais podem migrar do tumor primário para o sistema circulatório e se estabelecem em um novo local (YAMAGUCHI; CONDEELIS, 2007). O processso de migração é complexo e requer diversos eventos inter e intra celulares, tais como reorganização do citoesqueleto, remodelação da matriz, modelação de interações célula a célula entre outros (YUE et al., 2010).

A migração das células AML12 foi avaliada após uma série de exposições com as concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK. Foi então adotada a técnica de *wound healing.* O teste de *wound healing* é um método *in vitro,* econômico e que tem sido adotado ao longo de muitos anos em diversas áreas da ciência (YUE et al., 2010). Consiste em cultivar as células previamente em placas de cultivo bidimensional e após a confluência são submetidas à lesão da monocamada e seu acompanhamento ao longo de dado período por meio de microfotografia e quantificação analítica da lesão com a adoção de ferramentas computacionais (LIANG, C; PARK,A; GUAN, J; 2007).

Neste capítulo, apresentaremos a metodologia que foi adotada para exposição a novas concentrações, a avaliação de toxicidade por meio do ensaio do MTT, migração celular e tempo

de duplicação celular, bem como os resultados obtidos após a exposição crônica ao carcinógeno NNK.

3.2 Objetivos Específicos

- Apresentar a metodologia de exposição adotada da linhagem AML12 a outras duas novas concentrações de 10nM e 1000nM de NNK.
- Avaliar a toxicidade das diferentes concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK por meio da técnica do MTT após uma única exposição.
- Avaliar a migração celular por meio da técnica de *wound healing* após a exposição de longo prazo da célula AML12 nas concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK
- Avaliar o tempo de duplicação celular da linhagem AML12 após a exposição de longo prazo a 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Protocolo de exposição das células AML12 a novas concentrações de NNK 10nM e 1000nM.

A metodologia aplicada nas células AML12 para as novas concentrações de 10nM e 1000nM de NNK, seguiram a mesma métrica que foi adotada com primeira concentração já efetuada de 0,1nM de NNK e anteriormente descrita no capítulo 2.

Os ensaios foram realizados 24h após a adesão da linhagem AML12 na garrafa de cultura, sendo submetida ao tratamento de exposição com uma solução de concentração final de 10nM e 1000nM de NNK*(N-nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1(3-pyridyl)-1butanone)* (Toronto Research Chemicals- CA), que foi previamente diluído em meio de cultura DMEM/F12 Glutamax (1x) sem SFB.

Os grupos expostos permaneceram em contato com o carcinógeno durante as próximas 48h consecutivas. A este período de total de 72h após o cultivo celular adotamos o nome de "ciclo" (Figura 19) conforme descrito por Mennecier e colaboradores (2014). Essa técnica foi então adotada, as células foram submetidas à múltiplas exposições ao NNK, conforme descrito anteriormente no capítulo 2 e repetidos durante 30 vezes. Como controle negativo, utilizamos a mesma linhagem AML12, a qual recebia as mesmas condições de cultivo e passagens da linhagem exposta ao carcinógeno, entretanto, sem quaisquer contatos com o carcinógeno, sendo nomeado como grupo controle (CTL).

Uma vez empregado esta metodologia de exposição, as culturas foram mantidas em meio DMEM/F12 com SFB 10%, devidamente suplementado com 10 µg/ml insulina, 5.5 µg/ml transferrina, 5 ng/ml selenium (ITS – insulina, Transferrina e Selenium – GIBCO® 41400-045), 40 ng/ml dexametasona (SIGMA-ALDRICH® - D8893), e 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina -B – GIBCO® – USA) e em estufa umidificada com 5% de CO_2 a 37ºC.

Após a exposição com as diferentes concentrações de NNK, estas células foram então plaqueadas na concentração de $1x10^4$ células por poço, em placas de 24 poços (CORNING – USA) e fotografadas utilizando o programa ZEN (Zeiss – GER), em contraste de fase, na objetiva de 10x (Zeiss – GER). Durante 72h, foi observada sua morfologia juntamente com o grupo controle (Figuras 23, 24, 25, 26).

Para sua manutenção, foram congeladas por meio do protocolo de congelamento, já anteriormente estabelecido (Capítulo 2) e mantidas em nitrogênio líquido para futuras análises.

Os experimentos foram realizados no laboratório de oncologia comparada da FMVZ/USP e autorizada sob o número do Comitê de ética no uso de animais - CEUA/FMVZ-USP, CEUAx N 5026060317.

Figura 18 - Ilustração do esquema experimental de exposição crônica das células AML12 em diferentes concentrações de NNK

Legenda: Exemplo da metodologia adotada para exposição das células AML12 às diferentes concentrações do carcinógeno NNK. **A:** ilustração apresenta o ciclo de exposição com a concentração 0,1nM após 30 ciclos de exposição. **B**: ilustração apresenta o ciclo de exposição com a concentração de 10nM após 30 ciclos de exposição. **C**: ilustração apresenta o ciclo de exposição com a concentração 1000nM após 30 ciclos de exposição.
Fonte: Adaptado de Mennecier et al. (2014);

3.3.2 Avaliação da toxicidade de curto prazo da célula AML12 após as diferentes diluições de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK por meio da técnica do MTT

As células AML12 foram expostas às concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK uma única vez. Para isso, foi preparada uma solução com o carcinógeno NNK devidamente diluído até a obtenção das concentrações desejadas.

Para a realização deste ensaio, as células AML12 foram cultivadas em placas de 96 poços, em sextuplicatas. Após a tripsinização, as células foram ressuspendidas em meio completo (DMEM/F12, 10%SFB, ITS, dexametasona, antibiótico-antimicótico) suplementado com 20% de meio condicionado. Foram plaqueadas 100µl/poço de suspensão celular ($0{,}3x10^4$ células/poço). Após 24h do plaqueamento celular foram adicionados ao volume inicial do poço, o volume de 100µl/poço das diferentes concentrações do carcinógeno NNK 2 vezes concentrados para alcançar a diluição final de 0,1nM, 10nM e 1000nM. A partir do momento da exposição das células ao NNK foram então estabelecidos os tempos 24h, 48h e 72h pós exposição.

Para a avaliação da viabilidade celular foram adicionados 20µl do MTT (5mg/ml) em cada poço três horas antes do término do tempo de exposição do NNK. As placas permaneceram em estufa com atmosfera umidificada a 37°C, 5% CO_2 sob abrigo da luz. Para a aferição, a placa foi então centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos, seu sobrenadante foi descartado, em seguida foi inserido 100µl de dimetilsulfóxido (DMSO, Synth) e a leitura foi realizada em 570nm no aparelho Varioskan (Thermo Fischer® – USA). Esse procedimento foi realizado para a obtenção da leitura da densidade óptica após os respectivos tempos de exposição de 24h, 48h e 72h. Para o cálculo da porcentagem de células viáveis em cada amostra foram obtidos a média de absorbância de todos os testes, inclusive do branco (somente meio) e dos controles (sem exposição ao NNK). Posteriormente, foi subtraída a média da absorbância do branco de todos os testes, inclusive do controle, sendo o valor obtido nos controles considerado como 100% de células viáveis.

3.3.3 Avaliação da migração celular por meio da técnica de wound healing após a exposição da célula AML12 a 30 ciclos nas concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK

Para avaliar a taxa de migração celular, foi realizado o ensaio do wound healing. Para isso foram plaqueados $5x10^4$ células/poço das células AML12 (CTL) e células AML12 que foram expostas a 30 ciclos do NNK nas concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK em placas de 24 poços (CORNING®-USA), em quadruplicatas. As placas foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada a 37°C, 5%CO_2. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 (Glutamax), 10% SFB, 1% antibiótico-antimicótico, suplementado com ITS e dexametasona. Após a confluência total, as células foram submetidas ao crescimento em meio de cultura livre de SFB por 24h antes do ensaio de wound healing.

A monocamada celular foi lesionada com a ponteira de uma a pipeta de 1000µl estéril. As células foram removidas de uma área discreta da monocamada confluente gerando uma área livre para a migração celular. Em seguida foi lavada com tampão Fosfato Salino (PBS 1x) para retirada dos debris celulares e novamente incubada com DMEM/F12 (Glutamax) isento de SFB. O controle positivo constituiu-se da célula AML12 cultivada com DMEM/F12 (Glutamax) suplementada com ITS e dexamentasona e 10% SFB.

O ensaio de wound healing foi observado por microscopia de luz, em aumento de 10x (Zeiss - GER) nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h com captação das respectivas imagens. A área da lesão foi avaliada com o auxílio do programa *Image J* – disponível na plataforma

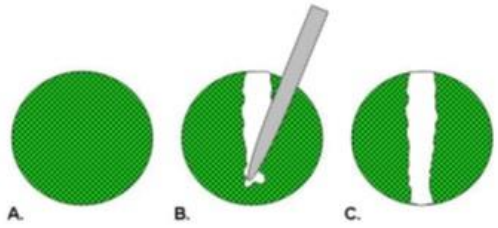
https://imagej.nih.gov/ (NIH – Bethesda/USA) – para a aferição da capacidade migratória. Desta maneira, foi então possível quantificar o percentual de fechamento da lesão após o tempo zero. Para tal metodologia foi adotado a equação apresentada na figura 20 (Yue et al.; 2010), e com isso o percentual de fechamento foi calculado.

Figura 19 - Equação adotada para fechamento da lesão do *wound healing*.

$$\%\ de\ fechamento\ = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h})}{(A_{t=0h})} x(100)$$

Legenda: Equação adotada para cálculo da lesão após mensuração no programa ImageJ. Sendo: At = 0h é a medida da área da lesão imediatamente após sua realização e At =Δh é a medida da área da lesão após 24, 48 ou 72 horas. Foram realizados três experimentos distintos em quadruplicatas.
Fonte :YUE et al. (2010)

Figura 20 - Esquema ilustrando a metodologia de *wound healing* em cultivo de monocamada.



Legenda: Esquema ilustrando a metodologia da técnica de wound healing.
FONTE: Adaptado de HULKOWER; HERBER (2011).

3.3.4 Avaliação do tempo de duplicação celular da linhagem AML12 após a exposição de longo prazo durante 30 ciclos nas concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK.

O doubling time é amplamente empregado para calcular o crescimento celular e comparar características biológicas de culturas celulares distintas (KIM, 1995). É o tempo estimado para que um grupo celular duplique a sua população. Este crescimento pode ser diferenciado dentro das diversas populações celulares.

Para a determinação do doubling time de cada grupo celular, $1x10^4$ células/poço das células AML12 e células expostas a 0,1nM, 10nM, 1000nM de NNK foram plaqueadas em triplicatas, em placas de 24 poços (SARSTED®, GERMANY). As células foram cultivadas com meio completo (DMEM/F12, 10%SFB, ITS, dexametasona, antibiótico-antimicótico) e mantidas em estufa a 37°C e 5%CO_2. Foram realizadas contagens na câmera de Newbauer após 24h, 48h, e 72h com auxílio do corante celular azul de tripan 0,4%. Para o cálculo do doubling time foi adotado a equação abaixo:

Figura 21: Equação adotada para o doubling time

$$Doubling\ Time \quad = \frac{Tempo\ x\ log(2)}{\log(contração\ final) - \log(concentração\ inicial)}$$

FONTE: DOUBLING TIME (2019)

Onde a concentração inicial é o número de células inicial e a concentração final o número de células obtidas após o tempo estabelecido de cultivo em volume determinado.

3.4 Resultados

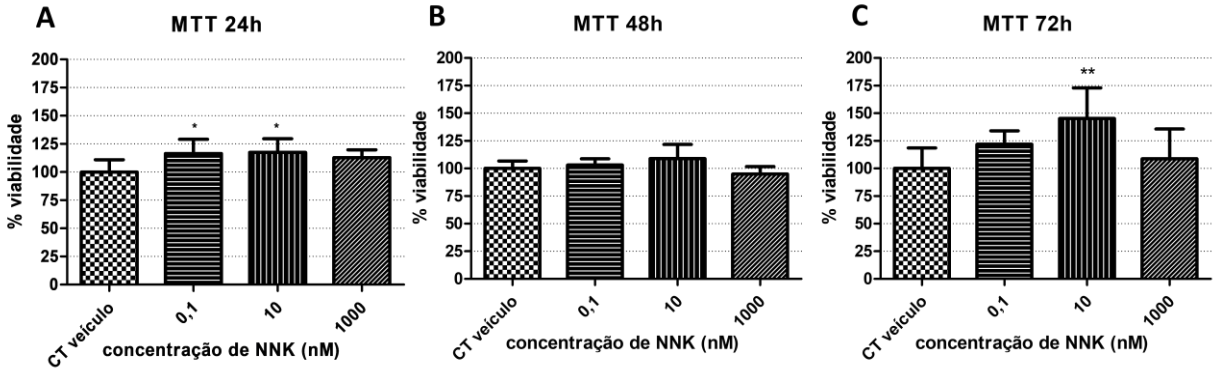
3.4.1 Avaliação da toxicidade curto prazo das diferentes diluições de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK na linhagem AML12 por meio da técnica do MTT

O presente ensaio foi realizado para avaliar a citotoxicidade de curto prazo da célula AML12 após exposição única a diferentes diluições do NNK (0,1nM, 10nM e 1000nM). Para tanto, as células AML12 foram plaqueadas e submetidas à exposição nas diferentes concentrações de NNK por 24h, 48h ou 72h.

Pode-se observar no gráfico de barras que nas primeiras 24h há um aumento no percentual de viabilidade celular, estatisticamente significativo ($p<0,05$) das células expostas à 0,1nM e 10nM de NNK em comparação ao controle. Entretanto, esse fenômeno não ocorre na leitura das 48h, onde o percentual de viabilidade permanece semelhante ao grupo controle. Já 72h após ao cultivo, pode-se observar um aumento significativo da viabilidade celular na concentração de 10nM de NNK. Pode-se observar que o percentual de viabilidade é significativamente maior quando comparado ao controle.

Esse resultado nos mostra que uma única exposição das células AML12 ao carcinógeno NNK nas diversas concentrações foi capaz de induzir um aumento na viabilidade celular, e identificar seu crescimento de maneira indireta.

Figura 22 - Gráfico em barras apresenta o percentual de viabilidade das células após tratamento com MTT

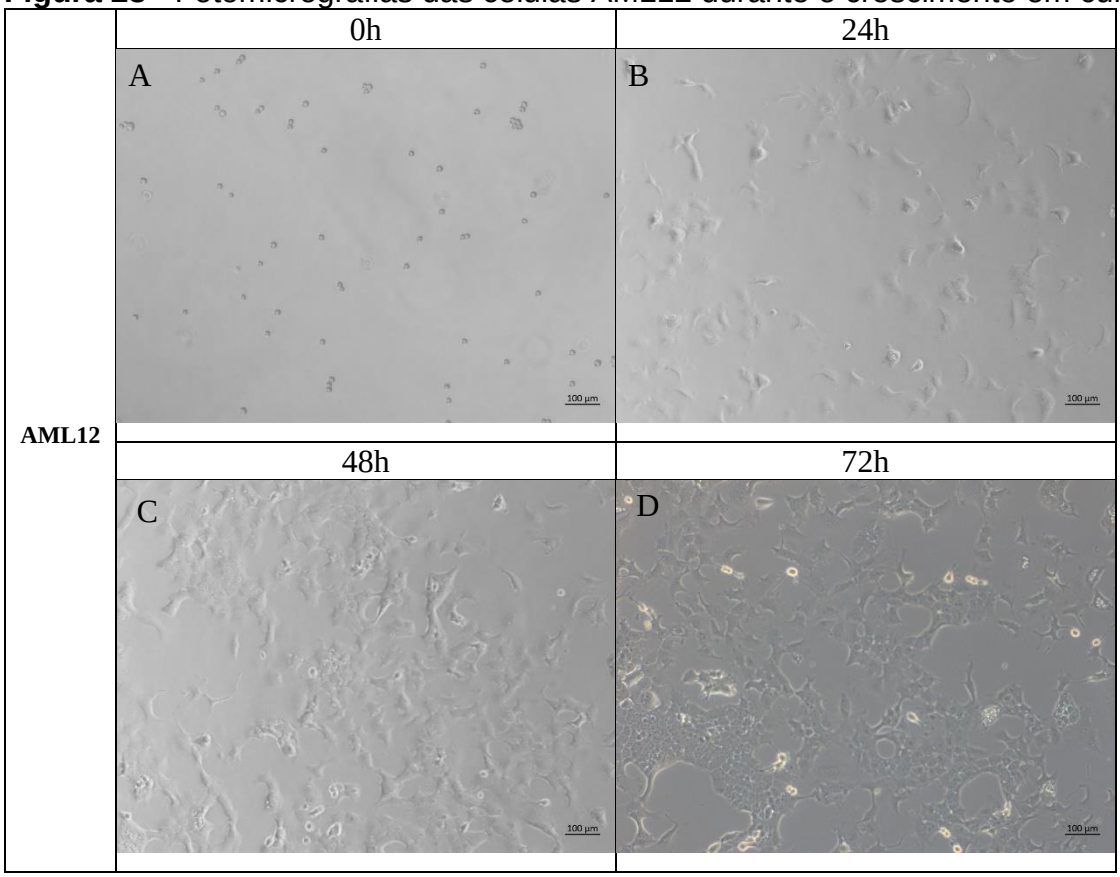


Legenda: **A**: No gáfico **A** está representado o percentual de viabilidade após 24h. **B**: Percentual de viabilidade após 48h. **C**: percentual de viabilidade após 72h. *$p<0,05$; **$p<0,01$. Foi realizado o ANOVA de uma via e pós teste de Dunnett.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

3.4.2 Acompanhamento das células AML12 após 30 ciclos de exposição as diferentes diluições de 0,1nM, 10nM, 1000nM de NNK.

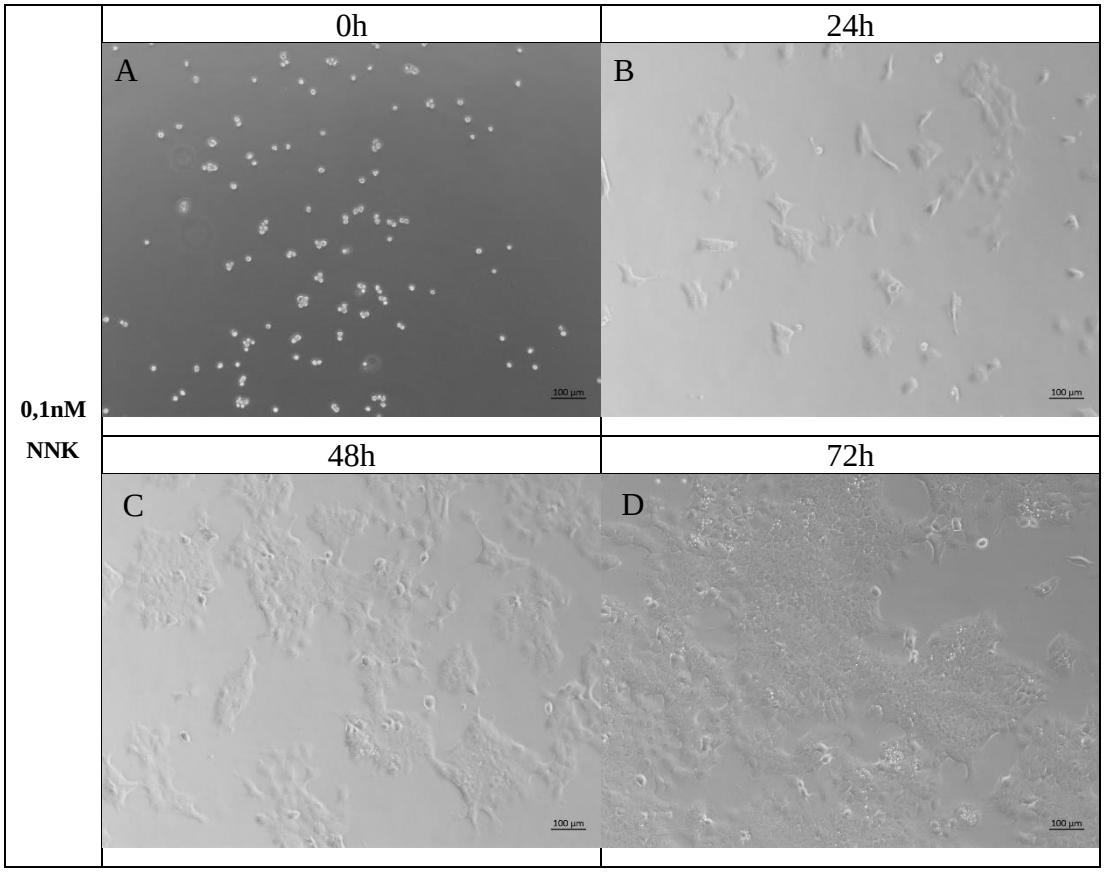
Após o estabelecimento das culturas nas as diferentes diluições de NNK, foram capturadas algumas imagens em contraste de fase com a objetiva 10x (Zeiss- GER). Após a tripsinização e ao longo de diferentes períodos, a fim de acompanhar a densidade celular e observar morfologia.

Figura 23 - Fotomicrografias das células AML12 durante o crescimento em cultura



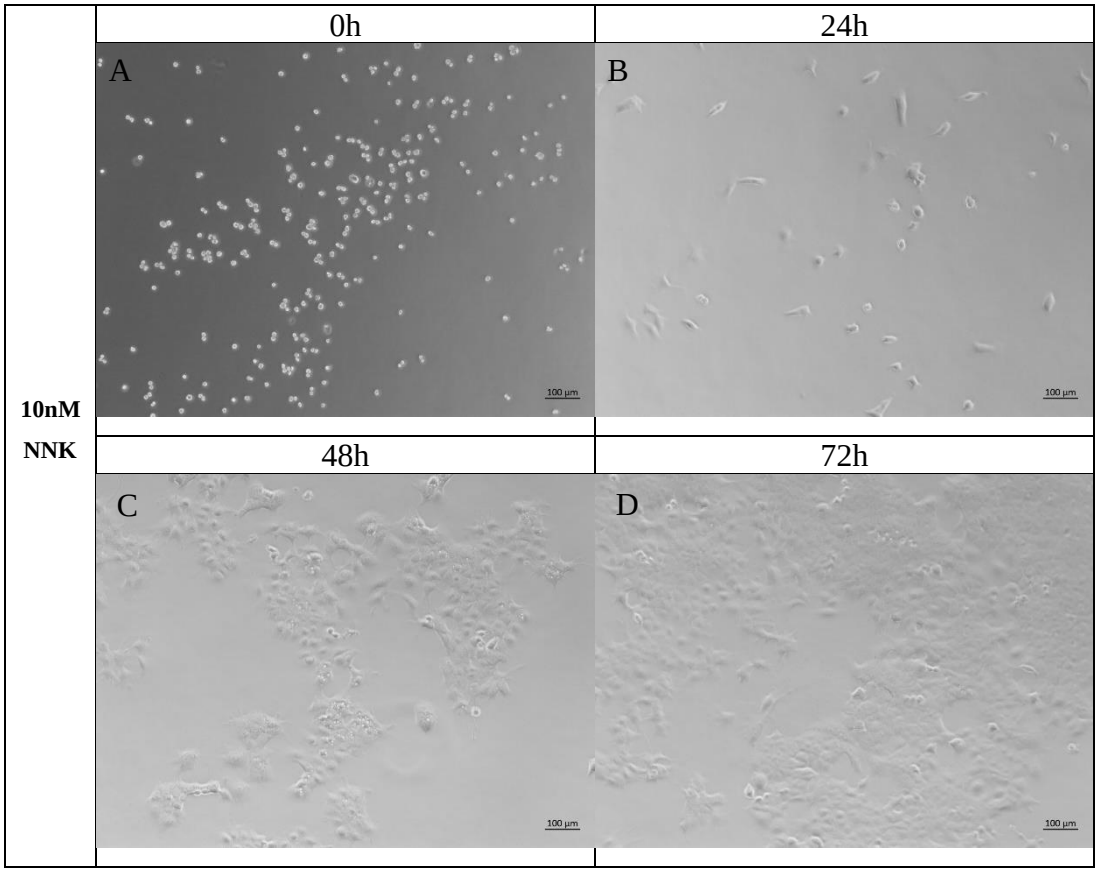
Legenda: A: célula AML12 logo após a tripsinização. **B**: célula AML12 após 24h do plaqueamento. **C**: célula AML12 após 48h do plaqueamento. **D**: célula AML12 após 72h do plaqueamento. Foram plaqueadas $1x10^4$ células por poço. Aumento de 10x. Barra de escala =100µm.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 24 - Fotomicrografias das células expostas a 0,1nM NNK durante o crescimento em cultura.



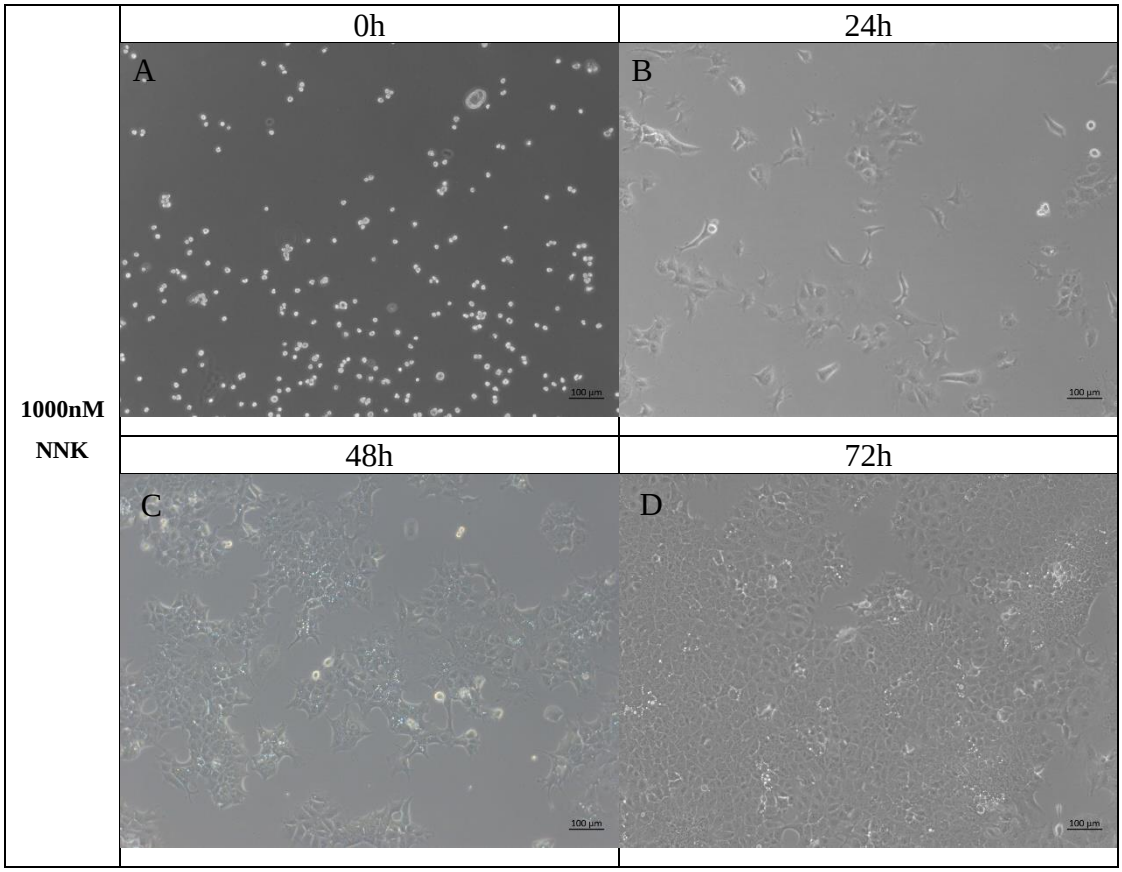
Legenda: A. célula 0,1nM NNK logo após a tripsinização. **B**. célula 0,1nM NNK após 24h do plaqueamento. **C**: célula 0,1nM NNK após 48h do plaqueamento. **D:** célula 0,1Nm NNK após 72h do plaqueamento. Foram plaqueadas $1x10^4$ células por poço. Aumento de 10x. Barra de escala =100µm.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 25 - Fotomicrografias das células expostas a 10nM NNK durante o crescimento em cultura.



Legenda: A: célula 10nM NNK logo após a tripsinização. **B**: célula 0,1nM NNK após 24h do plaqueamento. **C**: célula 0,1nM NNK após 48h do plaqueamento. **D**: célula 0,1Nm NNK após 72h do plaqueamento. Foram plaqueadas $1x10^4$ células por poço. Aumento de 10x. Barra de escala =100µm.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 26 - Fotomicrografias das células expostas a 1000nM NNK durante o crescimento em cultura.



Legenda: A: célula 1000nM NNK logo após a tripsinização. **B:** célula 1000nM NNK após 24h do plaqueamento. **C**:célula 1000nM NNK após 48h do plaqueamento. **D**: célula 1000nM NNK após 72h do plaqueamento. Foram plaqueadas $1x10^4$ células por poço. Aumento de 10x. Barra de escala =100µm.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

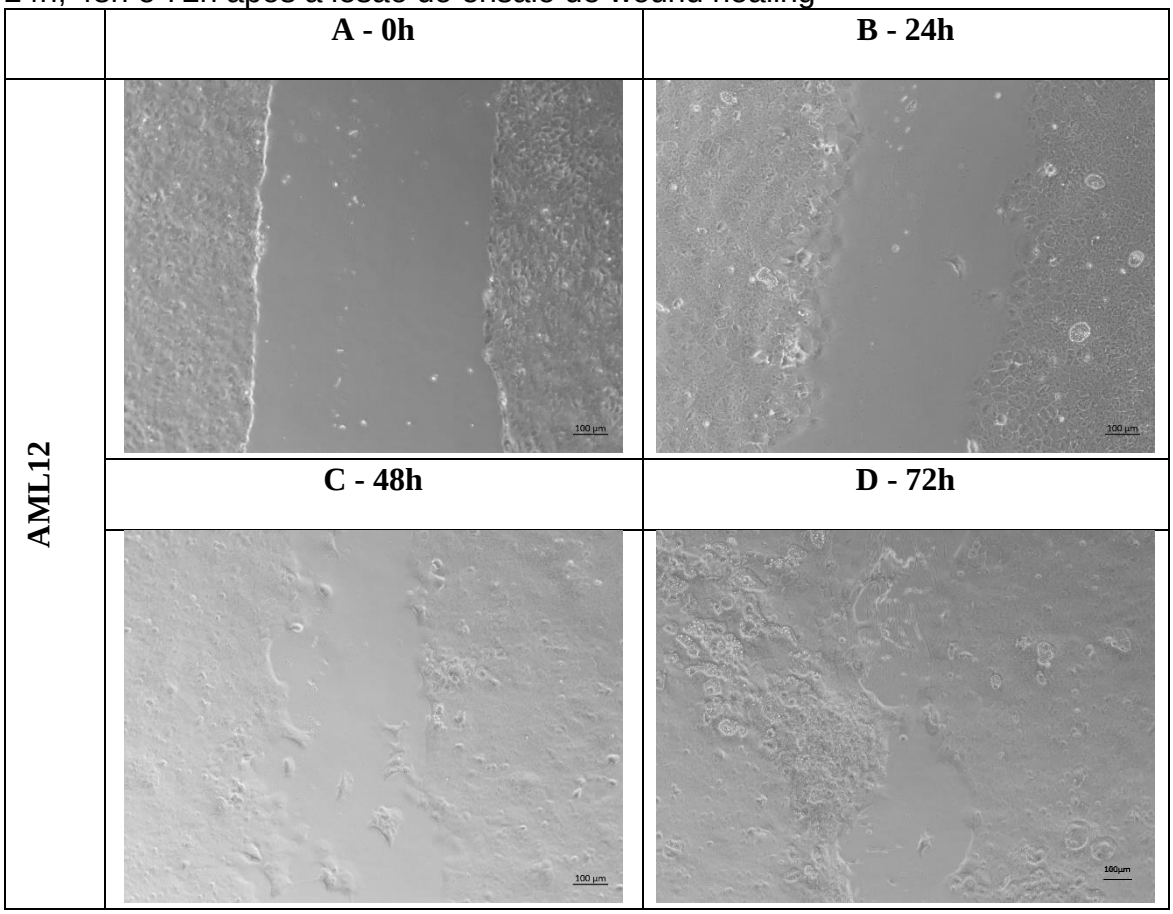
3.4.3 Avaliação da migração celular por meio da técnica de wound healing em células AML12 expostas por 30 ciclos a 0,1nM, 10nM e 1000nM NNK

As células foram cultivadas até 100 % de confluência e então lesionadas, acompanhadas ao longo dos períodos estabelecidos de 24h, 48h e 72h. Observamos que, dentre os grupos avaliados, o grupo 10nM NNK foi o grupo no qual houve o fechamento da lesão de modo mais rápido, quando comparamos com o grupo controle AML12 apresentado na figura 29.

Houve migração celular significativa no grupo, sob a concentração de 10nM de NNK logo nas primeiras 24h após a lesão, como mostra na figura 29B. Esse perfil mais ágil foi também observado nos demais tempos, figura 29C e 29D, quando comparados ao grupo controle (AML12). Esse comportamento migratório mais acelerado, pode ser observado também graficamente de maneira significativa nas 24h e 48h, com este grupo apresentando aumento superior ao grupo controle ($p<0,01$), mostrado nos gráficos de barras na figura 31. O grupo 10nM NNK demonstrou uma melhor capacidade migratória, caminhando em direção ao espaço deixado pela ferida de maneira mais eficiente e também quando comparado aos demais grupos analisados.

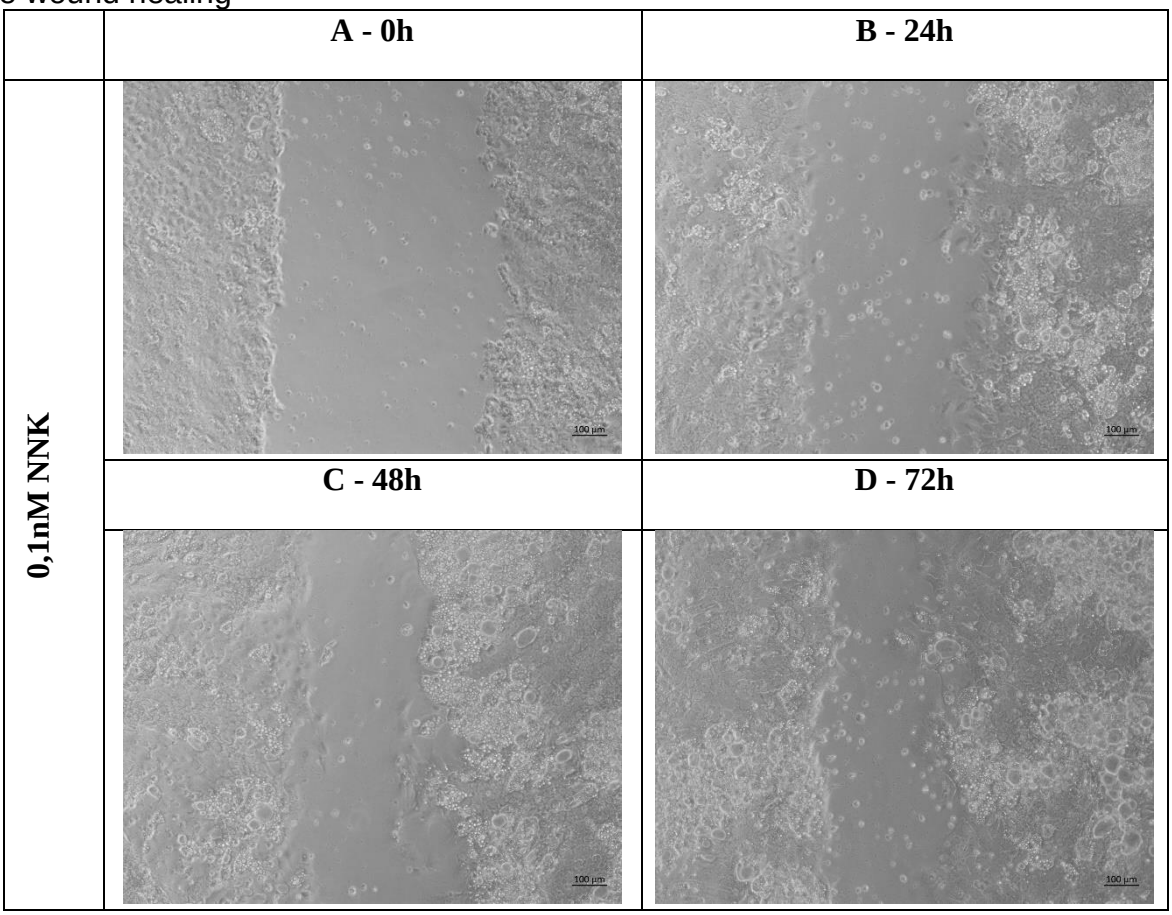
Nos grupos 0,1nM e 1000nM de NNK pode se observar nas figuras que houve o fechamento da área da lesão de maneira mais branda e apresentou a velocidade de fechamento semelhante ao grupo controle. Esses dados também podem ser observados de maneira quantitativa no gráfico de barras representado na figura 32.

Figura 27: Fotomicrografias em contraste de fase da linhagem AML12 (CTL) após 0h, 24h, 48h e 72h após a lesão do ensaio de wound healing



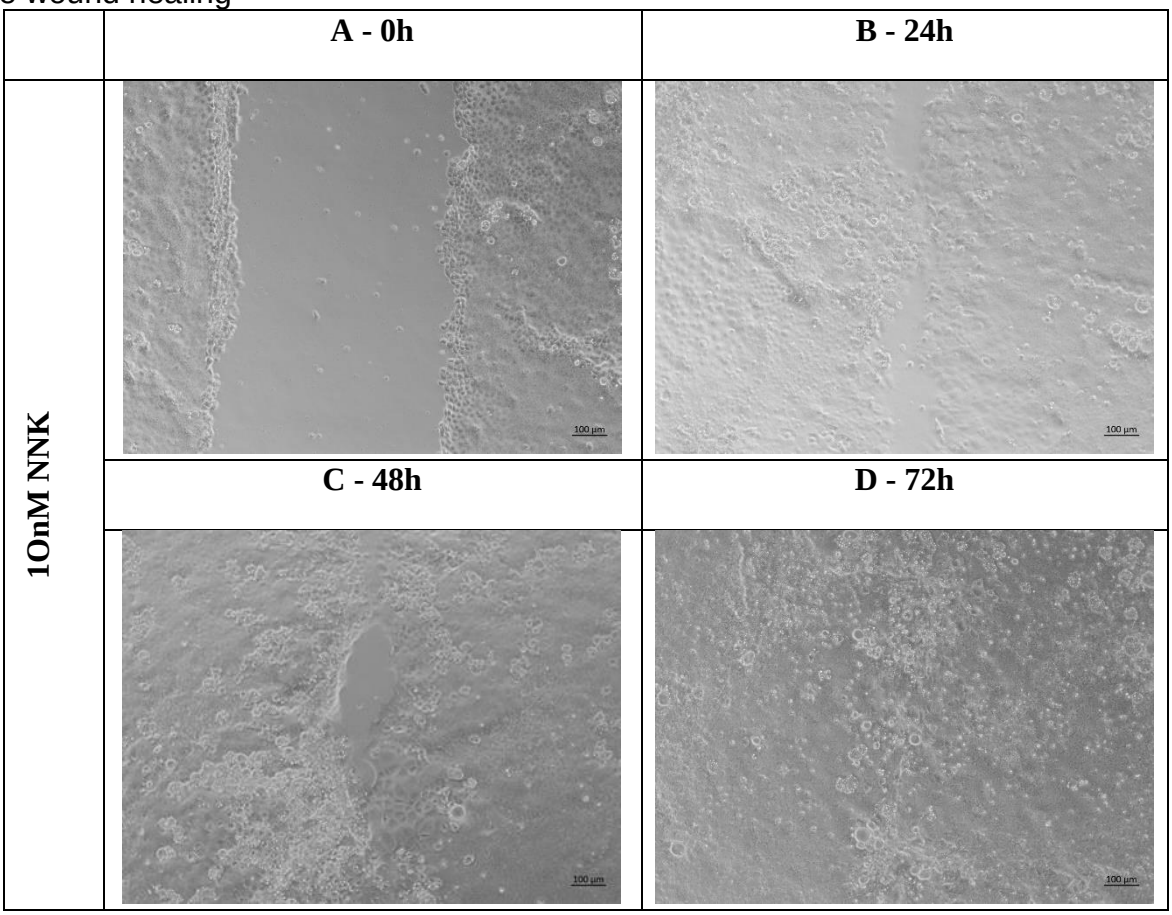
Legenda: **A:** Fotomicrografia em contraste de fase da célula AML12 (CTL) realizada logo após a lesão. **B**: Fotomicrografia realizada 24h após a lesão **C**: Fotomicrografia realizada 48h após a lesão. **D**: Fotomicrografia realizada 72h após a lesão. Foram plaqueadas $5x10^4$ células por poço. Aumento em objetiva de 10x (Zeiss – GER). Barra de escala =100µm.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 28: Fotomicrografias em contraste de fase da cultura celular, exposta durante 30 ciclos a diluição de 0,1nM de NNK após 0h, 24h, 48h e 72h após a lesão do ensaio de wound healing



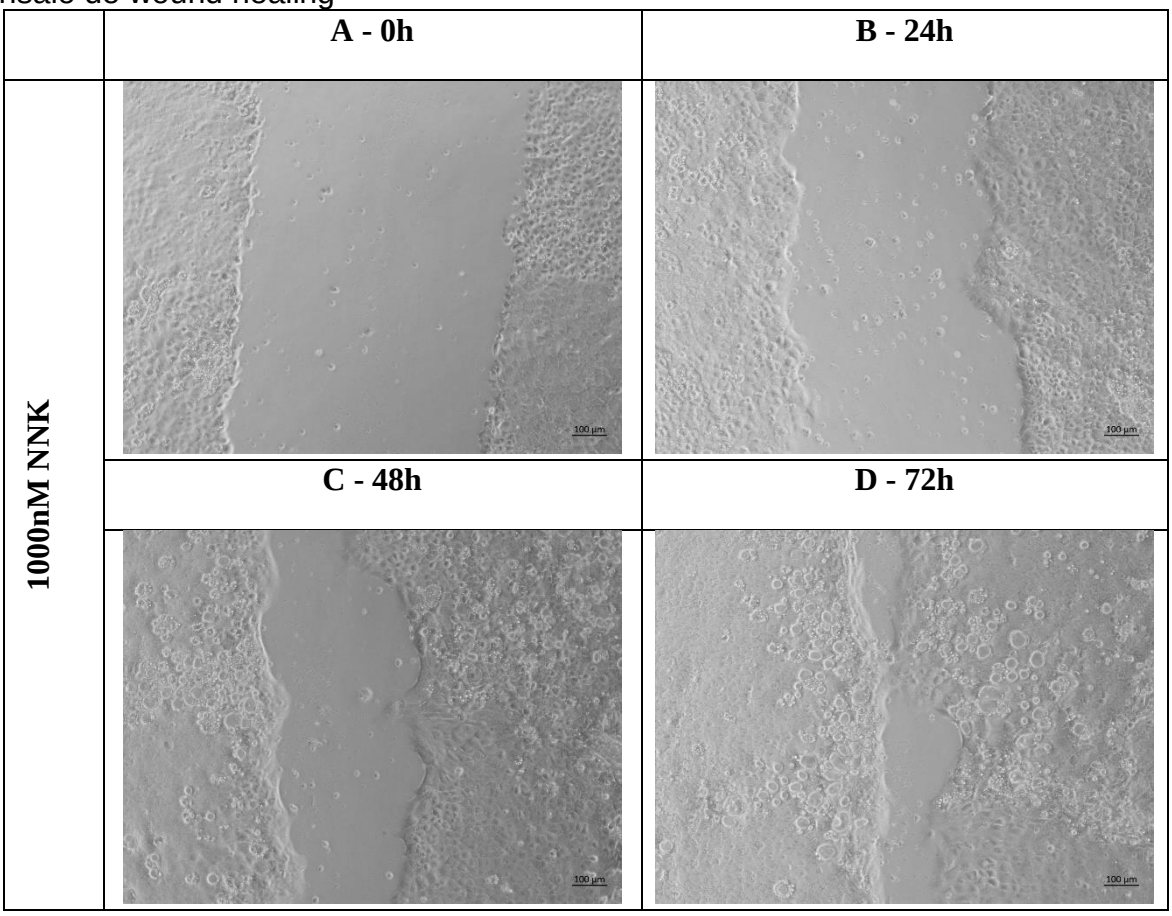
Legenda: Fotomicrografia em contraste de fase da célula exposta a diluição de 0,1nM NNK. **A**: Fotomicrografia realizada logo após a lesão. **B**: Fotomicrografia realizada 24h após a lesão **C**: Fotomicrografia realizada 48h após a lesão. **D**: Fotomicrografia realizada 72h após a lesão. Foram plaqueadas $5x10^4$ células por poço. Aumento em objetiva de 10x (Zeiss – GER). Barra de escala =100µm.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 29: Fotomicrografias em contraste de fase da cultura celular, exposta durante 30 ciclos a diluição de 10nM de NNK após 0h, 24h, 48h e 72h após a lesão do ensaio de wound healing



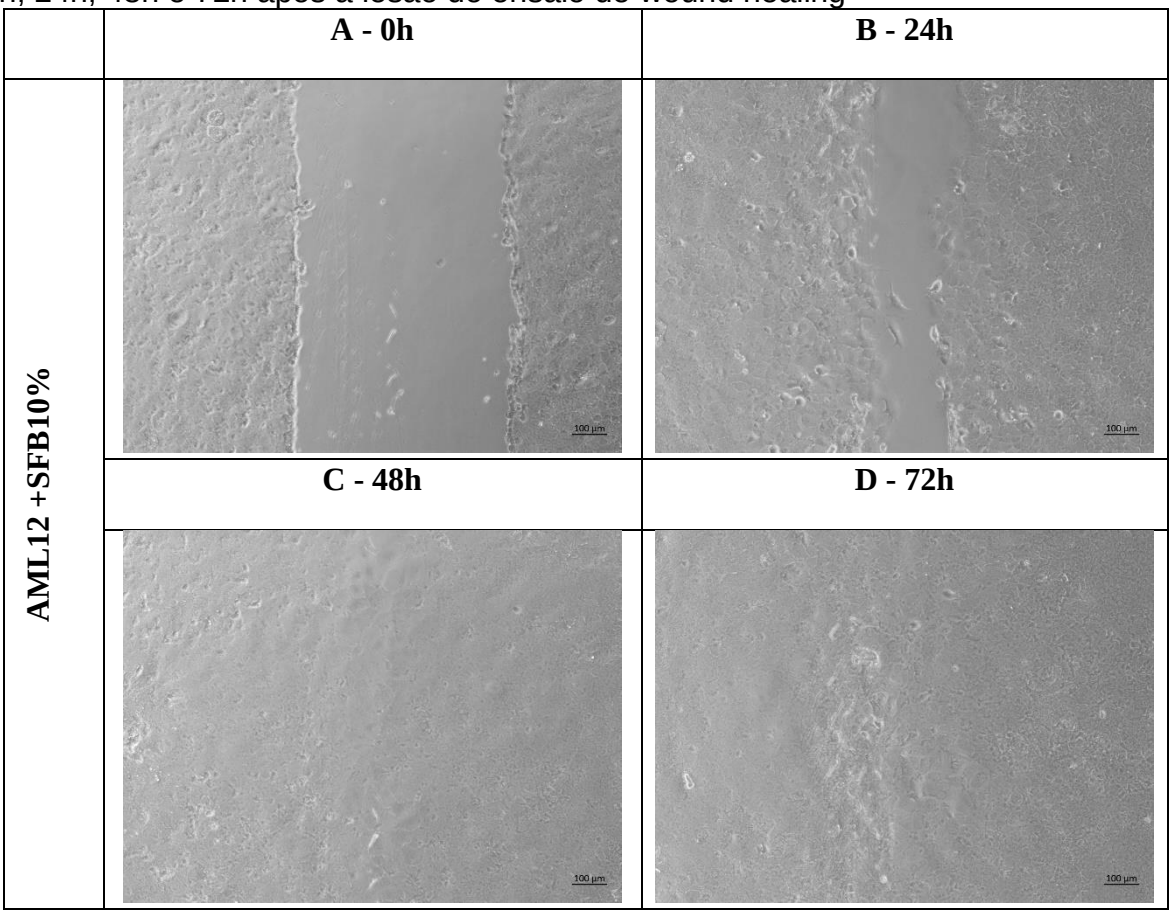
Legenda: Fotomicrografia em contraste de fase da célula exposta a diluição de 10nM NNK. **A**: Fotomicrografia realizada logo após a lesão. **B**: Fotomicrografia realizada 24h após a lesão **C**: Fotomicrografia realizada 48h após a lesão. **D**: Fotomicrografia realizada 72h após a lesão. Foram plaqueadas $5x10^4$ células por poço. Aumento em objetiva de 10x (Zeiss – GER). Barra de escala =100µm.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 30: Fotomicrografias em contraste de fase da cultura celular, exposta durante 30 ciclos a diluição de 1000nM de NNK após 0h, 24h, 48h e 72h após a lesão do ensaio de wound healing



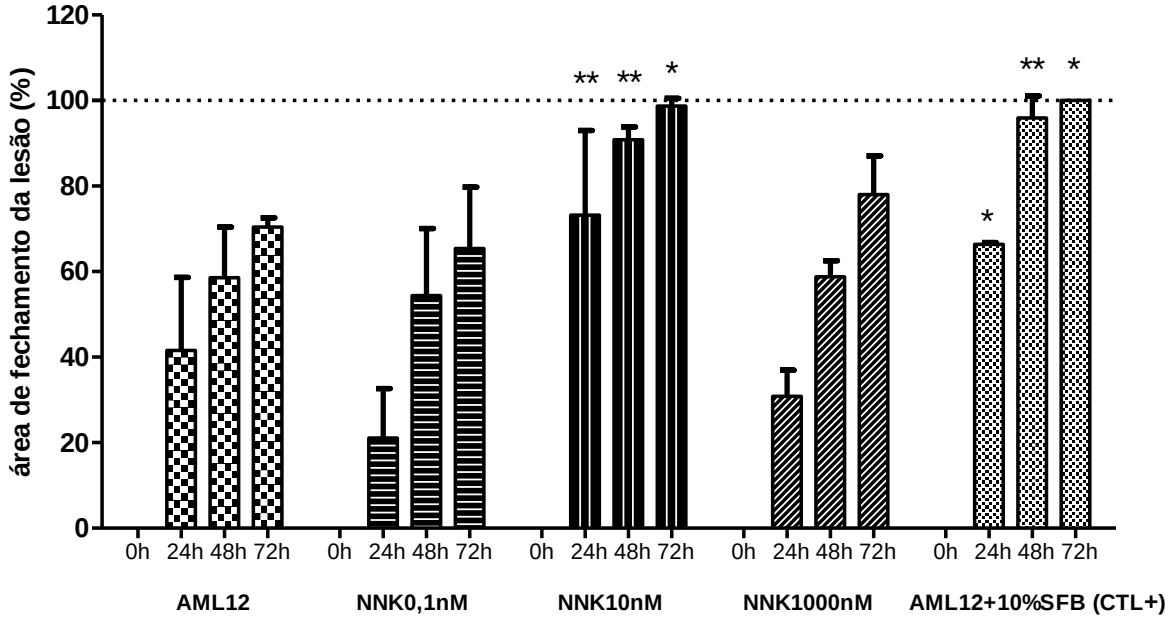
Legenda: Fotomicrografia em contraste de fase da célula exposta a diluição de 1000nM NNK. **A**: Fotomicrografia realizada logo após a lesão. **B**: Fotomicrografia realizada 24h após a lesão **C**: Fotomicrografia realizada 48h após a lesão. **D**: Fotomicrografia realizada 72h após a lesão. Foram plaqueadas $5x10^4$ células por poço. Aumento em objetiva de 10x (Zeiss – GER). Barra de escala =100µm.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 31: Fotomicrografias em contraste de fase da linhagem AML12 (CTL +) após 0h, 24h, 48h e 72h após a lesão do ensaio de wound healing



Legenda: A: Fotomicrografia em contraste de fase da célula AML12 suplementada com 10% SFB (CTL+) realizada logo após a lesão. **B**: Fotomicrografia realizada 24h após a lesão **C**: Fotomicrografia realizada 48h após a lesão. **D**: Fotomicrografia realizada 72h após a lesão. Foram plaqueadas $5x10^4$ células por poço. Aumento em objetiva de 10x (Zeiss – GER). Barra de escala =100µm.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 32: Gráficos em barra que representam o percentual da área de fechamento da lesão

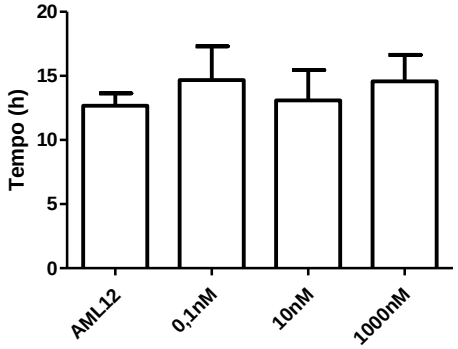


Legenda: O gráfico mostra a porcentagem de fechamento nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h após lesão na monocamada. As células expostas a 10nM de NNK por 30 ciclos apresentaram fechamento da lesão mais rápida, similar ao controle positivo (AML12 cultivadas em meio com 10%SFB). Os grupos foram comparados à AML12, nos respectivos tempos (*p<0,05; **p<0,01, ANOVA 2 vias seguida de pós teste de Bonferroni)
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

3.4.4 Avalição do tempo de duplicação celular da linhagem AML12 após a exposição de longo prazo a 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK – Doubling Time

O tempo de duplicação celular das células foi avaliado por meio da técnica do ensaio do doubling time. Não foi detectado diferença estatística no tempo de duplicação dos grupos 0,1nM (14,67 ± 2,632), 10nM (13,06 ± 2,374) e 1000nM (14,58 ± 2,061) em relação controle (12,67±0,9746) pela análise ANOVA de uma via (p=0,1533) (Figura 33).

Figura 33. Gráfico da média do tempo de duplicação celular após a exposição de longo prazo ao NNK



Legenda: Gráfico em barras apresenta a média do tempo (h) de duplicação celular da linhagem AML12 e após a exposição de longo prazo a diferentes concentrações de NNK. ANOVA de uma via (p=0,1533)
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

3.5 **Discussão**

Na avaliação de toxicidade, o objetivo desta análise foi estimar como a célula AML12 se comporta após uma única exposição de curta duração ao carcinógeno nas diferentes concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM. Foi observado que o grupo exposto a 10nM de NNK apresentou um aumento significativo no percentual de viabilidade após 24h ($p<0,05$) e após 72h ($p<0,01$) de exposição quando comparado ao grupo controle, ou seja, houve uma maior metabolização do MTT nesta concentração. Cabe ressaltar aqui que, este ensaio visou compreender o comportamento em uma única exposição curto prazo e observou-se que além do tempo de exposição, a concentração da droga pode ser considerada como um fator relevante para a análise de viabilidade célular. Diante dos resultados, observamos que a maior concentração de 1000nM de NNK não apresentou diferença com o grupo controle. Já a concentração intermediária de 10nM de NNK submetida a tratamento de curto prazo, ou seja, após uma única exposição, apresentou um perfil mais estimulante que gerou aumento na metabolização sugerindo maior quantidade de células. Nossa hipótese é que isso seja decorrente do efeito hormesis (MATTSON, 2008).

A migração celular é processo essencial para manter a organização adequada dos organismos multicelulares (TREPAT; CHEN; JACOBSON, 2012). O entendimento das etapas de migração, bem como a invasão e adesão celular são pilares importantes para o desenvolvimento de estratégias para o combate a doenças como o câncer. As células cancerosas se utilizam de estratégias de mobilidade como a migração celular mediada através do citoesqueleto celular. Atualmente, pode-se adotar as métricas geradas por meio do comportamento migratório de células cancerosas e estas podem ser empregadas na caracterização de prognósticos metastáticos do câncer (PIJUAN et al, 2019).

Curioso foi notar que no ensaio de wound healing realizado com diferentes concentrações do NNK após 30 ciclos de exposição, observou-se que o grupo exposto a concentração de 10nM de NNK foi o grupo que apresentou o maior percentual de migração quando comparado com o grupo controle. Logo após as 24h iniciais do ensaio, nota-se uma diferença significativa no percentual de fechamento da lesão ($p<0,01$), o que se repete após 48h da lesão ($p<0,01$) e após 72h ($p<0,05$). Neste momento, nos perguntamos por que a maior concentração não apresentou um perfil semelhante ou superior a concentração intermediária? Podemos sugerir que este fato ocorreu devido ao fenômeno do efeito Hormesis.

O efeito Hormesis, segundo Mattson (2008), é um termo adotado por toxicologistas para se referir a uma resposta bifásica a um agente ambiental, que pode conduzir a uma estimulação

sob baixa dose e um efeito inibidor e tóxico sob concentrações mais elevadas a um agente estressor ou agente químico. Samson e Cairns (1977) e Olivieri, Bodycote e Wolff (1984) sugeriam que as respostas a baixas doses não eram lineares como também, se apresentavam com o formato de um “U” ou “J” invertido. Esses achados na literatura, vão de encontro com os resultados obtidos no ensaio do WH e MTT de curto prazo, uma vez que a migração/viabilidade não se mostrou com comportamento crescente de acordo com a concentração e poderia nos auxiliar na resposta do porquê na maior concentração de carcinógeno NNK (1000nM) não houve um efeito estimulante ou promotor de migração celular, semelhante ou superior como o que ocorreu na dose intermediária de 10nM NNK.

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (do inglês PAH), podem ser originados da combustão incompleta do tabaco. Esta família engloba uma série de outros produtos potencialmente carcinogênicos, tais susbtâncias também podem ser derivadas da combustão incompleta do alcatrão (SAITO et al, 2015). Em estudo realizado Calabrese e Blain (2011) complementaram uma base de dados de efeito hormese elaborada no ano de 2005, com a inserção de novas dose resposta. Notaram nesta nova inclusão, a presença diversas classes químicas e também agentes físicos. Observaram que das 8962 novas dose resposta hormética 81%, estavam envolvidas com algum agente químico, destes 2% eram da família dos hicrocarbonetos aromáticos policíclicos e 2% nitrosaminas.

No ensaio de avaliação do tempo de duplicação celular, *doubling time*, pode se observar que não houve diferença relevante (p=0,1533) no tempo de duplicação da população de células que receberam o carcinógeno nas distintas concentrações do NNK e o grupo controle. Esse resultado, mostra que estas células apresentam o mesmo tempo de duplicação celular das células não expostas ao NNK.

3.6 Resumo dos Achados

- O ensaio de viabiliade celular pela técnica do MTT mostra aumento de viabilidade celular em células AML12 tratadas com uma única exposição ao carcinógeno NNK na concentração de 0,1nM e 10nM após 24h e este aumento se evidencia após 72h na concentração de 10nM;

- No ensaio de wound healing, as células expostas a 10nM de NNK por 30 ciclos tiveram o fechamento da lesão mais rápida em relação ao controle AML12 sem exposição ao carcinógeno. A velocidade de fechamento da lesão nestas células é similar ao controle AML12 suplementado com 10% de soro fetal bovino;

- O doubling time (DT) das células AML12 expostas a 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK por 30 ciclos não apresentaram diferença significativa em relação às células AML12 não expostas ao carcinógeno.

4 CAPÍTULO - AVALIAÇÃO DE MUTAGÊNESE EM CÉLULAS AML12 E CÉLULAS EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO NNK

4.1 Introdução

A mutagênese pode ser mensurada através da identificação de marcadores moleculares ou biomarcadores. Segundo Saito e colaboradores (2015), biomarcador é a uma molécula, que pode ser utilizada como indicador de uma condição biológica ou doença. Marcadores moleculares podem ser proteínas, enzimas, receptores de membrana, anticorpos, peptídeos, dentre outros. Alguns exemplos da utilização dos marcadores moleculares são a detecção de predisposição, diagnóstico e prognóstico de doenças. Um dos primeiros relatos de biomarcador adotado na medicina data-se de 1847 por Henry Bence Jones, que identificou uma molécula presente na urina de pacientes com mieloma múltiplo. Mais tarde pode-se descobrir que essa molécula se tratava da cadeia leve da imunoglobulina. Graças a evolução das tecnologias moleculares, pode-se identificar novos marcadores moleculares que nos auxiliam na rotina de identificação, mapeamento, entendimento e estadiamento de uma dada patologia (SAITO et al., 2015).

Na oncologia, podem ser chamados como marcadores tumorais ou também oncogenes. Muitos desses oncogenes fazem parte de grandes famílias gênicas como por exemplo a RAS. A família RAS é representada pelos genes H-RAS, K-RAS e N-RAS (figura 35). O gene do KRAS também chamado de *c-Kirsten-RAS protein*, em humanos está localizado no braço curto do cromossomo 12, na posição citogenética 12p12.1. Já em murinos (*Mus musculus*) localiza-se no cromossomo 6 (*https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRAS#location).* O produto gênico possui baixo peso molecular de 21kD. As proteínas RAS são GTPases que participam da rota da sinalização chamada via RAS/MAPK, sendo considerado como estrutura importante para a transdução do sinal extracelular até a recepção do sinal para no núcleo. Além da via principal RAS/RAF/MAK, faz ponte com outras diversas vias no ambiente celular. São proteínas citoplasmáticas que se translocam para a membrana plasmática, onde transmitem os sinais do fator de crescimento e conduzem à proliferação celular (ELLIS, 2000).

A ativação da proteína RAS se inicia a partir de um sinal, induzida por um fator de crescimento (do inglês, *Growth factor)*. Esta ação permite que uma célula que estava em seu estado quiescente se mova para um estado proliferativo. Em condições fisiológicas, a proteína RAS está associada à sua forma GDP (Guanidina difosfato) e não permite que sinais dos fatores do crescimento se perpetuem ao longo da célula (figura 33). Entretanto, quando ocorre uma

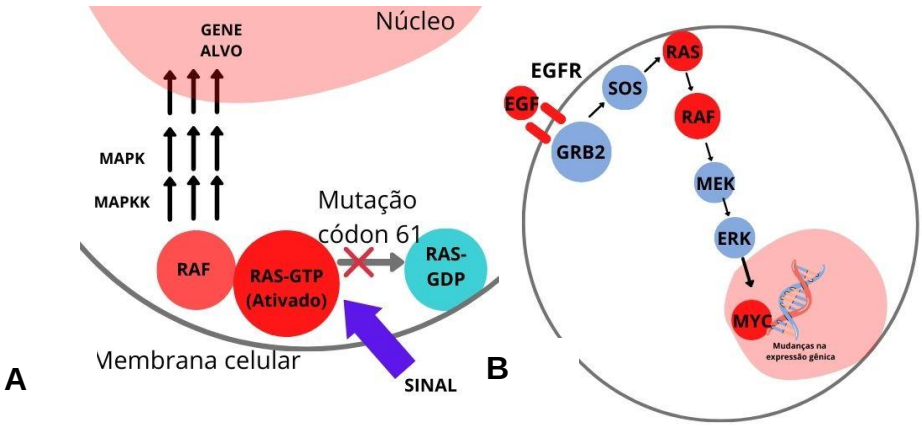
mutação, este fenômeno pode gerar uma substituição de base no códon 61 da proteína RAS. Uma vez ocorrendo essa mutação, então se inicia a transdução do sinal para a proteínas RAS, que pode se ligar a GTP (Guanosina Trifosfato) e se tornar ativa. Uma vez ativada, liga-se à RAF atuando na transmissão de sinais ativando gene Myc e promovendo alterações na expressão gênica e ativando o gatilho para a proliferação celular (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845) (MENCK, SLUYS; 2017; WALLIG et al., 2017).

O K-RAS em sua variante GTP ativada (figura 34) se torna oncogênica uma vez ligada constitutivamente. RAS é um passo obrigatório da cascata de sinalização para a transdução de sinais de receptores TK (tirosina-quinase) como receptor EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). A sinalização segue através da proteína ERK MAP-quinase (serino/treonino-quinase) e termina com a fosforilação nuclear dos fatores de transcrição, incluindo o FOS que também culmina na promoção de mudanças na expressão gênica.

Estudos confirmam a existência de duas proteínas K-RAS produzidas por splicing, o K-RAS4A e o K-RAS4B (Birchenall-Roberts MC et al., 2006). K-RAS4B, como outros membros da família RAS de proteínas, é considerada uma proteína citoplasmática que deve ser localizada na membrana para ativação. A região HVD de K-RAS4B inclui um domínio hexa-lisina contínua de resíduos com mais seis lisinas distribuídas dentro do domínio. O domínio HVD é suficiente para direcionar a proteína para a membrana plasmática, um pré-requisito para a transformação (WELMAN, 2000). Birchenall-Roberts e colaboradores (2006) demonstraram que K-RAS4B, preferencialmente expressa em humanos, interage fisicamente com a nucleolina, e esta interação resulta em uma migração da proteína K-RAS4B para o núcleo da célula. A nucleolina afeta a atividade reguladora da transcrição da proteína K-RAS4B. Segundo Srivastava (1999), a nucleina possui papel pleiotrópico, esta pode ser ubiquitinada, possui uma ação relevante nos papéis de regulação, ciclo celular e proliferação. Esta proteína foi descrita como uma proteína nuclear, com padrão de distribuição em vesículas, mas estudos anteriores a localizaram na membrana plasmática, onde atua como uma proteína transportadora entre o citoplasma e o núcleo (HOVANESSIAN et al., 2000).

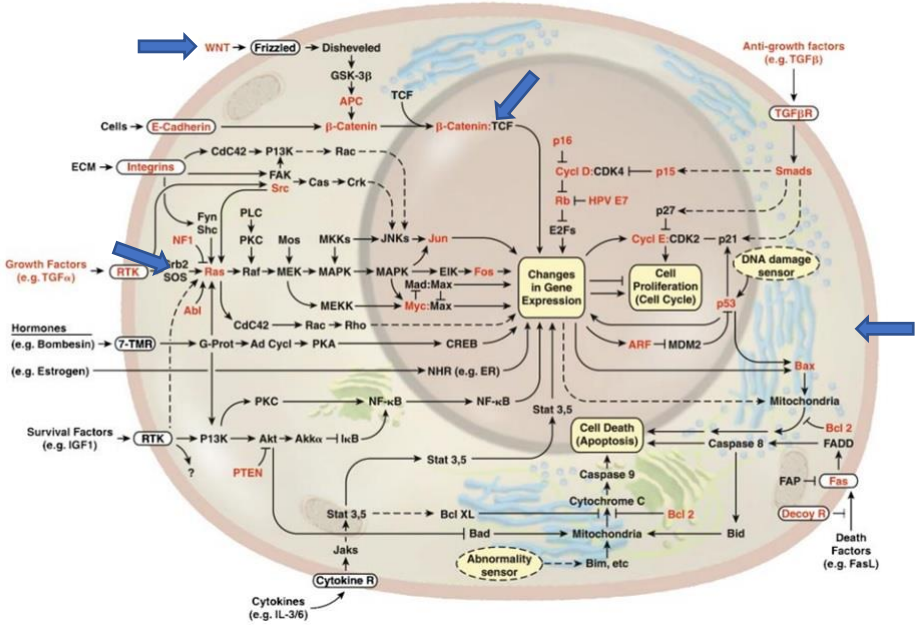
Outro fator que pode contribuir para comportamentos distintos de uma dada proteína, são as modificações pós-traducionais. Esse fenômeno aumenta a diversidade de atuação proteíca através de ligações covalentes ou até mesmo adição de grupos funcionais. Este é um grande desafio para a área da proteômica. São exemplos de modificações pós-traducionais a ubiquitinação, glicolização, fosforilação, acetilação e a sumoilação dentre outros (JENSEN, 2004). Há relatos na literatura, que a proteína RAS pode sofrer uma modificação pós-traducional (CHOI et al, 2017).

Figura 34 - Transdução de sinal via RAS



Legenda: **A**: Destaque do diagrama da ativação do oncogene RAS. **B**: Cascata de sinalização envolvendo a ação do RAS e RAF para a ativação do gene MYC no núcleo, que por consequência gera mudanças na expressão gênica.
FONTE: Adaptado de MENCK, SLUYS; (2017); WALLIG et al, (2017).

Figura 35 - Rotas de expressão gênica na célula.



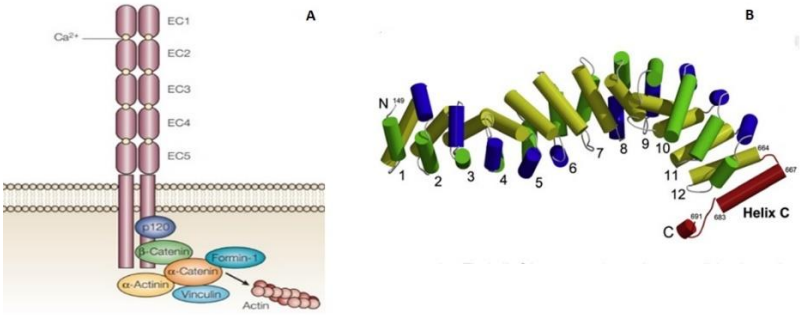
Legenda: Rotas integradas de sinalização envolvendo diversos oncogenes e genes supressores de tumor. Nos destaques das setas as vias do Wnt, RAS, β-caternina e P53.
FONTE: HANAHAN; WEINBERG, 2000

A beta-catenina (β-catenina) é outra proteína importante (figura 36a). Em humanos esta proteína é produzida pelo gene CTNNB1 que se localiza no cromossomo 3p21 (MACDONALD et al., 2009) e nos camundongos está localizado no cromossomo 9 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1499). Possui em sua estrutura, uma região N-terminal,

uma repetição central com 12 repetições armadilho e uma região C-terminal (figura 36b). As regiões terminais são levemente suscetíveis à protease e a região central é a mais conservada (HUBER et al., 1997). Regula funções essenciais como diferenciação, migração, apoptose, renovação celular, dentre outros.

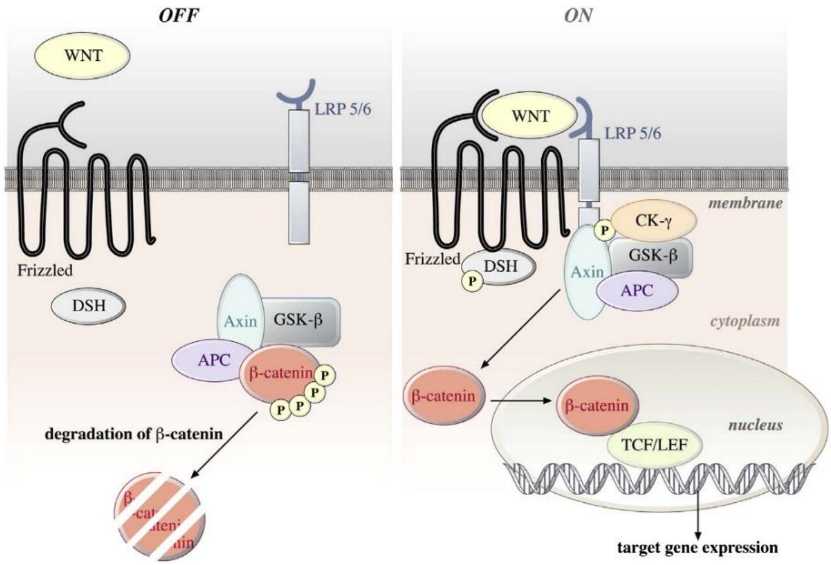
A β-catenina participa da via canônica WNT (figura 37). A abreviatura "WNT" (figura 35) resulta da síntese de dois nomes *wingless* e *int1*. Em humanos já foram identificadas mais de 19 vias WNT (MORIN, 1999; PAI et al., 2017). A via Wnt/β-Catenin foi descoberta por Nusse e Varmus em 1982, no decorrer do estudo de mecanismos oncogênicos em tumores mamários de camundongos (NUSSE; VARMUS, 1982). Nos vertebrados, a via é denominada como Wnt. A rota de sinalização wingless possui equivalentes similares em todo desenvolvimento animal (CADIGAN; NUSSE,1997), ou seja, é uma região extremamente conservada. Consiste em uma rede de proteínas que conduz sinais de receptores na superfície da célula por meio do citoplasma e finalmente para o núcleo da célula, local onde ocorre uma cascata de sinalização e acarreta a expressão de genes-alvo (WALLINGFORD; HABAS, 2005; HABAS, 2006).

Figura 36 Ilustração da cadeia de caderina clássica com a presença do domínio extracelular e citoplasmático.



Legenda: **A**: Apresenta o envolvimento da β-catenina no domínio citoplasmático durante o processo de interação da E-caderina com a actina do citoesqueleto. **B**: β-catenina- humana R1C estrutura cristal apresentando as 12 repetições armadilho e o domínio C terminal em vermelho.
Fonte: Adaptado de GUMBINER, 2005; XING et al., 2008

Figura 37– Esquema ilustrando a via canônica WNT/β-catenina.



Legenda: À esquerda via desligada seguido da degradação da β-catenina. À direita via ligada pelo receptor frizzled e posterior condução da β-catenina ao núcleo.
Fonte: Königshoff; Eickelberg, 2010

Supressores tumorais, são genes que, em condições normais atuam em funções como bloqueio do ciclo celular, ativação da apoptose, promoção e reparo do DNA. Estes são alguns dos exemplos de sua ação. Existem mais de 30 genes supressores tumorais identificados e o gene p53 é um deles. Os genes supressores podem estar envolvidos em ações como a regulação o ciclo, ou até mesmo sobrevivência celular *(gatekeepers)*. Outras ações são a manutenção da integridade genômica, inibindo a adição de novas de mutações que provoquem o processo de carcinogênese, sendo denominado *(caretakers)*. Uma vez ativo esses genes são responsáveis pela estabilidade genômica, ou seja, contribuem para que a célula seja suprimida no ciclo celular ou seja eliminada (MENCK; SLUYS, 2017).

O gene tp53 é um supressor tumoral, está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13) em humanos, e em camundongos no cromossomo 11. Codifica uma proteína de 53kDa e é também conhecido como "*guardião do genoma*". Possui um papel importante no reparo do DNA. Este gene é ativado uma vez que ocorreu algum dano no DNA.

Outro gene importante no processo de carcinogênese é o C-Myc. Em camundongos *(Mus musculus*) está localizado no cromossomo 15 e em humanos no cromossomo 8 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/17869) e seu produto possui 49kDa. É um proto-oncogene associado no controle de crescimento celular normal. Seu desequilíbrio está associado com o desenvolvimento de neoplasia (EVAN; LITTLEWOOD, 1993) e também regula a fase G1 do da maquinaria do ciclo celular (HANAHAN, 2000). O C-Myc é classificado por alguns autores

como um gene responsável pela imortalização celular. Isso se deu quando, se notou o C-Myc como o gene principal no start da atividade da telomerase (WANG et al., 1998).

A técnica de imunofluorescência (IF) é uma ferramenta amplamente disseminada. É adotada para identificação de marcadores moleculares por meio da associação de um anticorpo com um dado fluóroforo, permitindo a visualização e análise das proteínas de interesse, bem como a sua localização no microambiente celular. Realizamos a técnica com os marcadores supramencionados e nossos resultados estão apresentados a seguir, neste capítulo.

4.1.1 Lesões no DNA

A toxicidade crônica pode conduzir a danos acumulativos em órgãos ou sistemas. Danos decorrentes de exposições a longo prazo podem viabilizar a construção de agravos que se acumulam lentamente e geram um dano acumulativo (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2020).

Os danos no DNA são caracterizados como alterações na estrutura química ou genômica do DNA É um fenômeno que pode ocorrer naturalmente durante ciclo celular da célula, entretanto terapias como quimio ou radioterapia podem contribuir para o acúmulo de lesões no DNA (LU; LIU; YANG, 2017).

O ensaio do cometa é um método de identificação e quantificação de dano no DNA. É uma análise amplamente usada há mais de 30 anos (MØLLER, 2018) por conta da sua eficiência e facilidade de manuseio. O teste do cometa pode ser utilizado para avaliação de toxicidade, ensaio pré-clinicos de fármacos (LU; LIU; YANG, 2017).

4.1.2 Avaliação de genotoxicidade – análise do cometa

O ensaio do cometa foi inicialmente introduzido há mais de trinta e cinco anos por Ostling e Johnson (1984). Foi adotado para detecção de danos no DNA ocasionados por meio da radiação. Na época, já foi possível quantificar e mensurar os padrões de migração dos fragmentos de material genético, foi avaliado as vantagens da utilização da técnica, tais como a adoção do número reduzido de células requeridas para análise. Desde então, a técnica se tornou uma ferramenta para avaliação de genotoxicidade. Em 1999, ocorreu o *International Workshop on Genotoxicity Testing* (IWGT). Neste evento procurou-se desenvolver um painel de divulgação e desenvolvimento de diretrizes para eletroforese de uma única célula (*SCGE* –

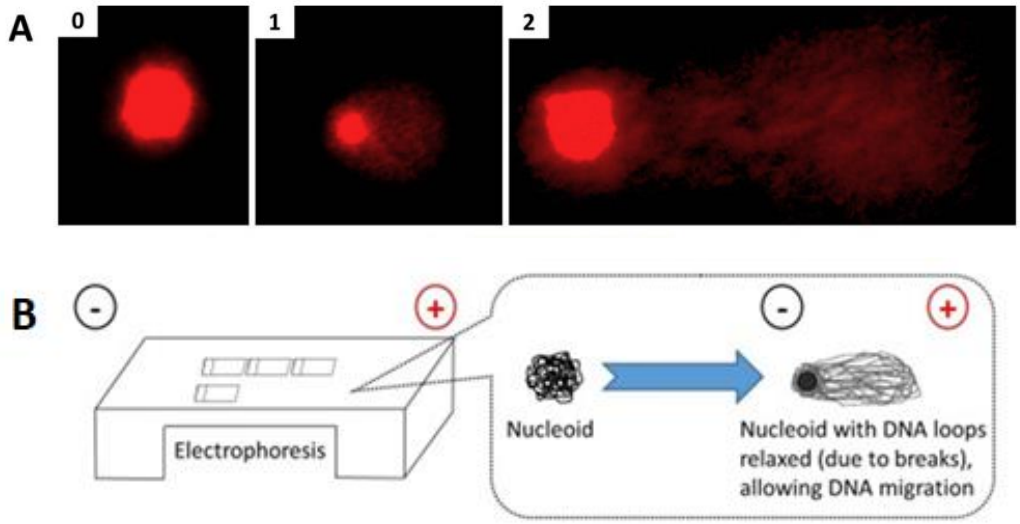
Single Cell Gel Eletrophoresis) bem como a adoção da técnica do teste do cometa na área de toxicologia genética e alguns anos após houve a adoção do teste do cometa junto a OECD (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico) na diretriz para testes -*TG 489* (*Test Guidelines*) em 2016. Diante disto, viu se a necessidade para a elaboração de um guia prático, no qual foi desenvolvido a primeira diretriz para a utilização do ensaio do cometa *in vitro* e *in vivo* a fim de avaliar a genotoxicidade (VASQUEZ; FRÖTSCHL, 2016). Isso somente ocorreu, pelo aumento do rigor regulatório (FRÖTSCHL, 2015).

A análise do teste do cometa também pode ser adotada como um biomarcador molecular humano, em virtude de sua atuação na carcinogênese. Muitos são os fatores que podem conduzir ao dano tais como, radiação de fonte natural ou artificial, produtos químicos ou genotóxicos, através da exposição endógena de substâncias reativas de oxigênio, ou até mesmo como resultado de erros de replicação. Em humanos, o ensaio do cometa tem sido adotado como um marcador de exposição para detectar danos do DNA promovidos por agentes genotóxicos em trabalhadores expostos em ambientes ocupacionais (AZQUETA et al., 2020).

O teste do cometa *(CA- Comet Assay)* é também conhecido como Eletroforese de uma Única Célula *(SCGE)*. É comumente adotado até hoje para identificar lesões genômicas. Segundo Araldi e colaboradores (2015), o teste do cometa é amplamente reconhecido por sua robustez bem como sua sensibilidade. É uma técnica na qual se faz possível avaliar a genotoxicidade de algum composto que entra em contato com o material genético.

É uma grande ferramenta, que consiste em uma metodologia *in vitro*, que avalia a lise do DNA após o contato com alguma substância danosa. Se trata de uma técnica eletroforética de uma única célula, sendo possível identificar se houve alguma lesão. Após a corrida eletroforética bem como sua coloração pela técnica de fluorescência, caso haja alguma quebra no DNA desta célula, será possível a visualização de uma imagem semelhante à de um cometa. Isto se dá, pois os pequenos fragmentos de DNA migram em direção ao ânodo (Figura 38). (PRETTI et al., 2007; ARALDI, 2017; BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009). Sendo assim, sua metodologia de análise se baseia no grau dos pequenos fragmentos do DNA gerados por meio da migração eletroforética, o que resulta na “cauda”, que quando associada ao núcleo lisado, acarreta uma imagem semelhante à de um cometa. O ensaio do cometa é considerado como uma ferramenta eficiente para a mensuração de quebras em fita única ou dupla fita em nível celular (LU, LIU, YANG; 2017).

Figura 38- Imagem ilustrando as diferentes classes de cometa e sua formação



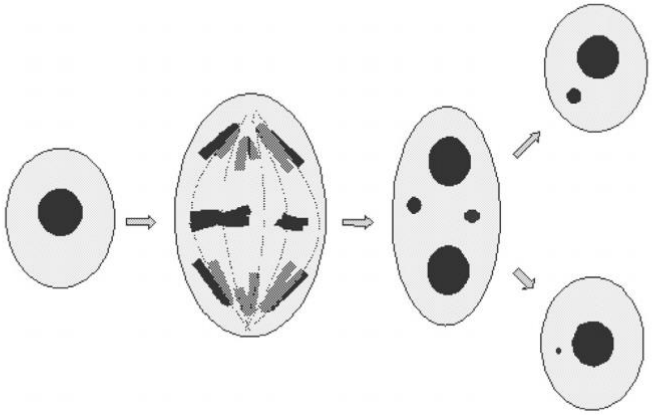
Legenda: **A:** Classificação em ordem crescente de lesão clastrôgenica apresentando cometa de classe 0, 1 e 2 respectivamente. **B**: Formação do cometa após a eletrofose. Fonte: Adaptado de Araldi et al. (2015) e Azqueta (2020).

4.1.3 Teste de micronúcleo (MN)

Micronúcleos são definidos como corpos cromáticos produzidos no decorrer da divisão celular oriundos de defeitos nos centrômeros ou fragmentos cromossômicos, podendo ser até um cromossomo por inteiro que foi perdido em decorrência de danos induzidos (BOLLER et al., 1970). Micronúcleos são estruturasras que foram inicialmente descritas há mais de um século atrás (figura 39) e foram chamadas inicialmente de *"Howell-Jolly bodies"* e posteriormente como "*fragmentos de material nuclear*". Essas estruturas eram identificadas de maneira constante após a exposição das células à radiação, e são derivados de fragmentos acêntricos que foram excluídos das duas células filhas nos estágios finais da mitose.

A primeira sugestão da adoção do uso da frequência de micronúcleos como medida para avaliação do dano cromossomal foi realizada por Evans e colaboradores (1959). Muitos anos depois Countryman e Heddle (1976), adotaram a metodologia para o uso em linfócitos para identificação de danos cromossômicos, adotando o micronúcleo como marcador (KIRSCH-VOLDERS, 2003). O teste do micronúcleo é uma das metodologias de segurança toxicológica adotadas e recomendadas pela OECD e é utilizada na elaboração de testes *in vitro* para averiguação de danos genéticos.

Figura 39 - Ilustração apresentando o processo de formação do micronúcleo.



Legenda: Diagrama apresentando a formação de micronúcleos.
Fonte: Adaptado do DOHERTY (2016)

Neste capítulo iremos avaliar o perfil de mutagênese das células AML12 após a exposição de longo prazo ao NNK e qual o comportamento de alguns marcadores moleculares após a exposição, bem como suas consequências pós-exposição no microambiente celular.

4.2 Objetivos Específícos

- Avaliar a expressão de β-catenina, K-RAS, p53 e C-Myc por meio de ensaios de imunoflurescência nas linhagens de hepatócitos murinos AML12 (CTL) e após exposição de longo prazo nas concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK

- Avaliação do efeito clastogênico das diferentes concentrações de exposição de longo prazo de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK nas células AML12 por meio da técnica do cometa.

- Avaliação do potencial genotóxico, por meio da técnica do micronúcleo nas linhagens de hepatócitos murinos AML12 (CTL) pós exposição crônica as concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK

4.3 Material e métodos

4.3.1 Ensaio de imunoflurescência na linhagem de hepatócitos murinos AML12 (CTL) e pós exposição crônica às concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK

As células foram cultivadas seguindo protocolo já estabelecido, sobre lamínulas de 24 mm x 24 mm em placas de 6 poços. Após 48h de cultivo em com DMEM/F12 devidamente suplementado e acrescido de 10% SFB, este foi removido e as células lavadas com PBS 1x e em seguida fixadas em etanol 70% durante 20 minutos, a -20ºC. Posteriormente, foram submetidas a exposição antigênica com tampão EDTA pH 9,0 aquecido a 90ºC por 20 minutos.

Após esta etapa, as lamínulas foram novamente lavadas com PBS 1x acrescido de Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA), em seguida, foram acomodadas em câmera úmida, *overnight* a 4°C, com 100µl anticorpos primários apresentados no Quadro 1. Após esta incubação, foram submetidas a uma nova lavagem com PBS 0,1% Triton X-100 e novamente incubadas com os respectivos anticorpos secundários monoclonais ou policlonais, estes associados com Alexa flúor 488 (Dako, Carpinteria, CA, USA, 1:100) por uma hora sob abrigo da luz, finalizando-as com a última lavagem com PBS 0,1% Triton X-100. As células foram devidamente marcadas com iodeto de propídeo, na diluição 1:1000. Posteriormente, as lâminas foram montadas com Vectashield que possui ação anti-fading e evita o esgotamento da fluorescência (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA) e vedadas com esmalte. Em seguida, as fotomicrografias foram capturadas no microscópio Nikon Eclipse E800 (Nikon, Tóquio, Japão) no aumento de 40x.

Os experimentos foram realizados no laboratório de oncologia comparada da FMVZ/USP e autorizada sob o número do Comitê de ética no uso de animais - CEUA/FMVZ-USP, CEUAx N 5026060317.

Quadro 1: Padronização com os respectivos anticorpos e diluições aplicadas na técnica de imunofluorescência

ANTICORPO	EMPRESA	CÓD.	ESPECIFICIDADE	ORIGEM	DILUIÇÃO
K-RAS	Abcam	Ab180772	Policlonal	Coelho	1:100
p53	Serotec–Biorad	MCA909 (aa213-217)	Monoclonal	Camundongo	1:100
C-Myc	Abcam	Ab32072	Monoclonal	Coelho	1:100
β-catenina	Invitrogen	138400	Monoclonal	Camundongo	1:100

Fonte: MIYAKE MIZUSAKA, 2020

4.3.2 Ensaio do teste do cometa

Para a realização do teste do cometa foram utilizadas lâminas 26x75mm (Knittell - Germany), as lâminas foram devidamente limpas, em seguida foram submersas em agarose normal melting (NMP) a 1,5% (Invitrogem - USA). Foi realizado a limpeza da face que não recebeu a amostra, a camada de agarose foi seca em temperatura ambiente *overnight*. Em seguida, as células AML12, e células expostas a 0,1nM,10nM e 1000nM de NNK foram submetidas à tripsina 0,05% durante 10 min em estufa a 37°C para desagregação celular e lavadas em PBS 1x. Após a lavagem, foi ressuspendida em um volume aproximado de 10^3 céls /500µl de PBS 1x. Para a montagem do ensaio, foram utilizados 20µl dessa suspensão e adicionado 170µl de agarose *low melting* (LMA – Gibco). Este volume de190 µl foi então distribuído na superfície da lâmina que já foi previamente coberta com agarose NMP. A área foi cuidadosamente coberta com uma lâmina, em seguida foi incubada durante 30 minutos a 4°C. Removeu-se a lamínula cuidadosamente, e incubou-se as lâminas em uma solução de lise contendo NaCl à 2,5M, EDTA à 100mM, Tris-HCl à 10mM com Triton X-100 e DMSO por 60 min à 4°C sob abrigo da luz (ARALDI et al., 2015).

Para a realização da eletroforese, foi utilizado solução tampão NaOH a 300mM e EDTA 1mM pH >13,0 a 4°C. As lâminas ficaram nesta solução um período de 20 a 40 minutos, para remoção das histonas (AZQUETA, COLLINS, 2013). A corrida eletroforética foi realizada durante 20 minutos a 300mA e 25V. Ao término da corrida eletroforética, as lâminas foram neutralizadas em solução contendo Tris-HCl 400mM pH 7,5, durante 5 minutos sob abrigo da luz. Após a secagem, foi realizado a fixação das lâminas com etanol absoluto PA (Synth). A coloração com iodeto de propídeo (4,0mg/ml) foi realizada somente no momento da análise. As imagens foram capturadas no aumento de 40x no Axiophot (Zeiss- GERMANY).

4.3.3 Teste do micronúcleo nas células AML12 após exposição de longo prazo às diferentes concentrações de NNK 0,1nM, 10nM, 1000nM.

Para realização do ensaio do teste do micronúcleo, as lamínulas 24x24mm foram previamente lavadas e autoclavadas, em seguida, as lamínulas foram dispostas na placa de 6 poços e submetidas a irradiação UV por 20 minutos, dentro do fluxo laminar. Foram adicionados 2,0mL de meio de cultivo DMEM/F12 devidamente suplementado com 10 µg/ml insulina, 5.5 µg/ml transferrina, 5 ng/ml selenium (ITS – insulina, Transferrinae Selenium –

GIBCO® 41400-045), 40 ng/ml dexametasona (SIGMA-ALDRICH® - D8893), e 1% de antibiótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina -B – GIBCO® – USA). Em seguida, foram semeadas 3,0 x 10^5 células por poço, suavemente agitado para crescimento de forma homogênea e incubadas por 48h a 72h. Após esse período foram lavadas três vezes com PBS 1x estéril por 5 min. As células foram então fixadas com metanol a -20°C por 60 minutos e posteriormente coradas com Giemsa 100% por 5 minutos. Para a retirada do excesso de corante procedeu-se três vezes a lavagem com PBS 1x por 5 min. Em seguida as lâminas secaram naturalmente em temperatura ambiente, foram montadas com entelan e analisadas com microscópio com objetiva de 100x. Para a análise, foram contadas 1000 células avaliando o número de células mononucleadas e com e sem micronúcleo. O experimento foi realizado em triplicatas.

4.4 **Resultados**

4.4.1 Ensaio de imunoflurescência para avaliação dos marcadores K-RAS, p53, C-Myc e β-catenina.

Após o cultivo da linhagem de hepatócitos AML12 foram submetidos a manutenção de 30 ciclos de exposição sob as diferentes concentrações do carcinógeno NNK, realizamos ensaios de imunofluorescência com os diferentes marcadores, para avaliar sua expressão frente após o tratamento com o NNK. Observamos a expressão e imunomarcação do K-RAS (figura 40), p53 mutante (figura 41) c-Myc (figura 42) e β-catenina (figura 43).

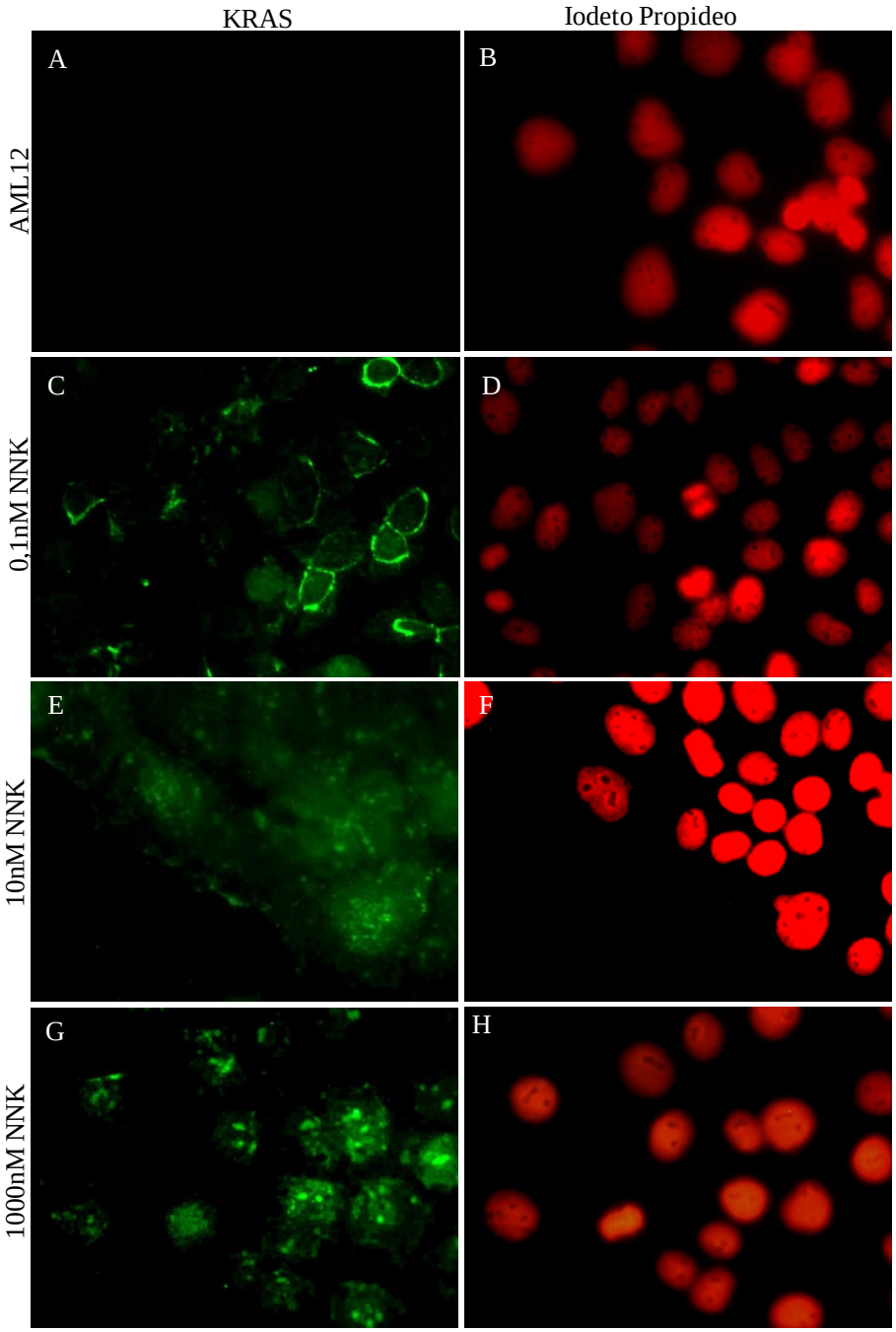
A proteína K-RAS apresentou expressão na membrana quando submetido à menor concentraçãode exposição ao carcinógeno (0,1nM), demonstrando que nesta concentração o K-RAS está ativo. Entretanto é interessante notar que com o aumento da concentração do NNK, ocorre a transição da região membranar para a região perinuclear e nuclear, conforme figura 40.

Já o marcador p53 apresentou uma marcação puntiforme dispersa pelo citoplasma, tanto no controle, quanto nas células expostas às diferentes concentrações de carcinógeno após 30 ciclos de exposição. Contudo, nas concentrações de 10nM e 1000nM apresentou um perfil de marcação puntiforme com diâmetro maior, entretanto em menor quantidade de *spots* de marcação.

O marcador c-Myc, no presente ensaio apresentou marcação predominantemente nuclear. Pode-se ainda observar que a intensidade da marcação é diretamente proporcional o aumento da concentração do carcinógeno após os 30 ciclos, apresentando na última concentração marcação intensa no núcleo, como se pode visualizar na figura 42.

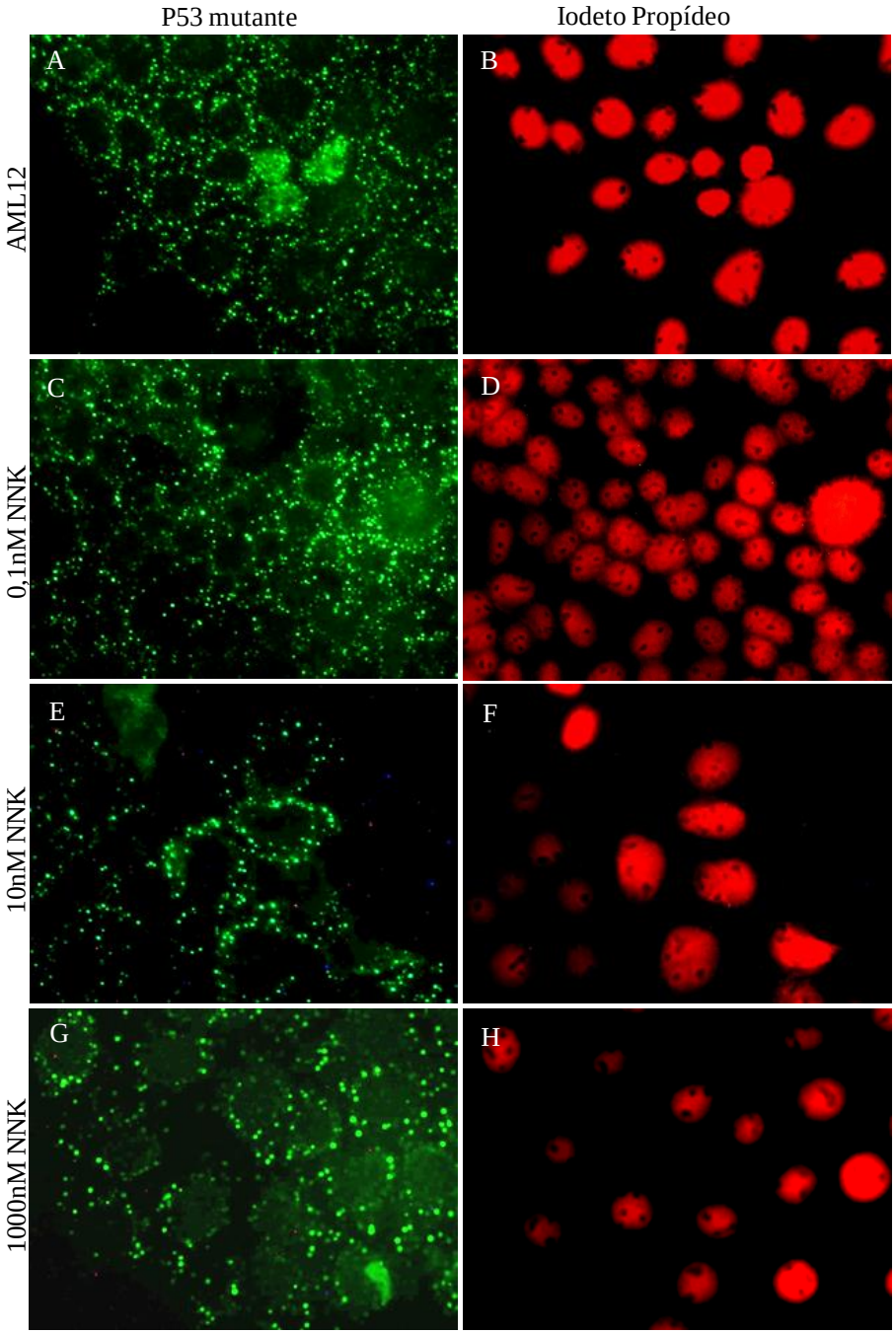
Na presente avaliação, foram detectadas a marcação da proteína β-catenina na região membranar, no grupo controle e nas concentrações de 0,1nM com uma sutil marcação na região da membrana, já em 10nM de NNK pode-se observar que há uma marcação mais intensa e retilínea na região membranar, e por fim, na concentração de 1000nM de NNK a β-catenina altera seu perfil de marcação e foi visualizada sob a forma de *spots* somente na região do núcleo e perinuclear das células após a exposição de 30 ciclos (figura 43).

Figura 40: Fotomicrografia representativa da expressão de K-RAS na linhagem AML12 (CTL) e após a exposição crônica a diferentes concentrações do NNK.



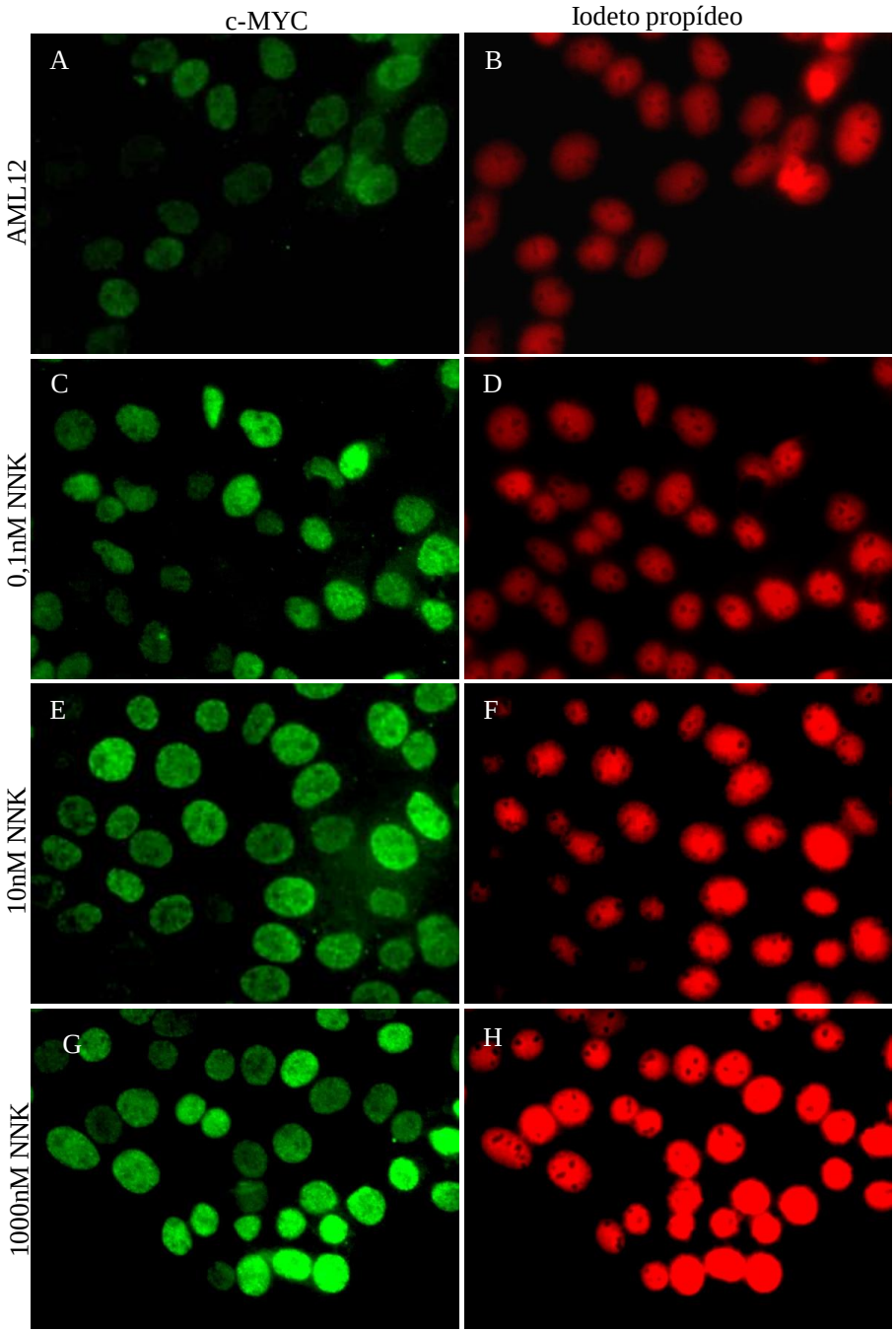
Legenda: AML12 (CTL) (**A**, **B**), 0,1nM NNK (**C**, **D**), 10nM NNK (**E**, **F**) e 1000nM NNK (**G**, **H**). Objetiva de 40x.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 41: Fotomicrografia representativa da expressão de p53 na linhagem AML12 (CTL) e após a exposição crônica a diferentes concentrações do NNK.



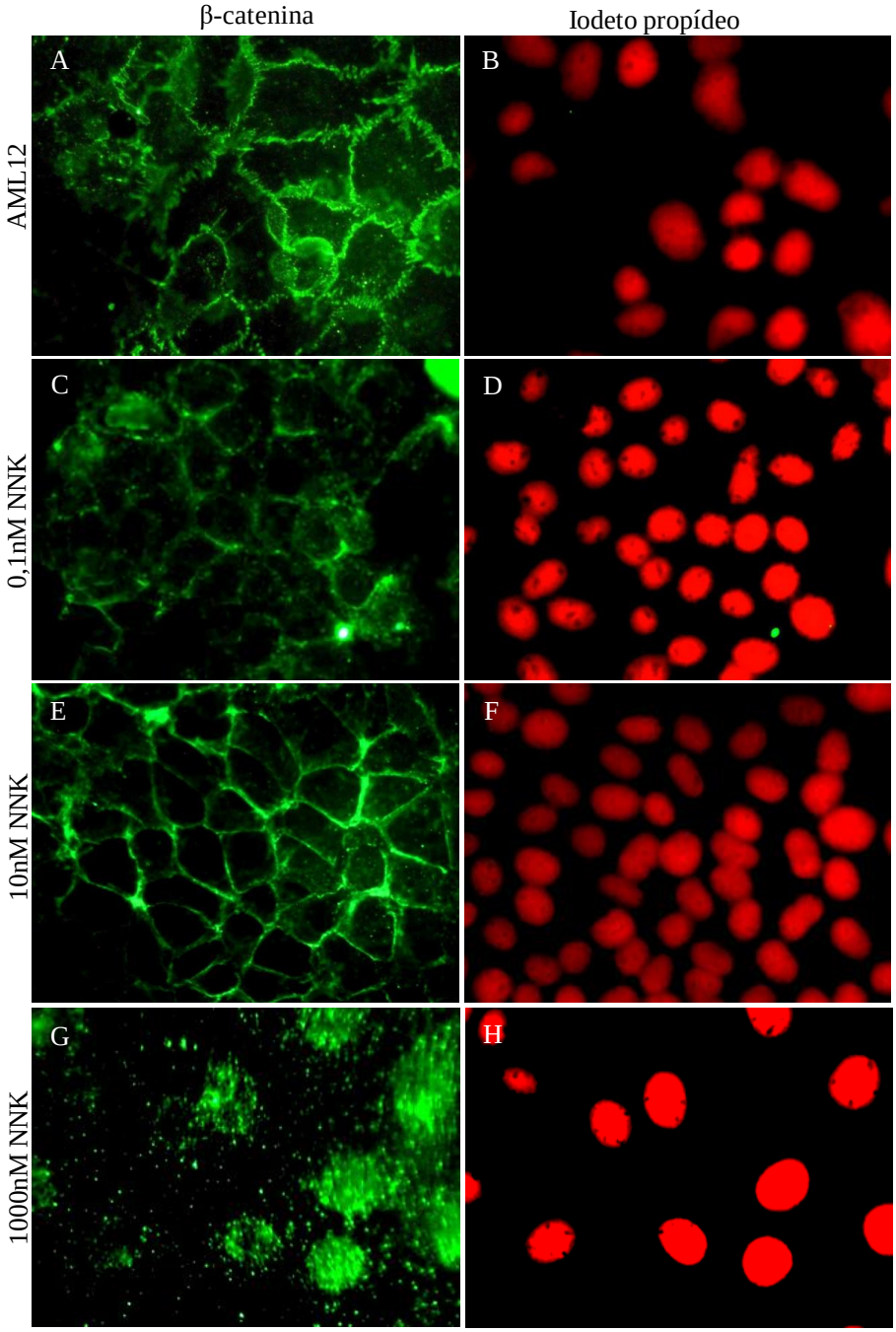
Legenda: AML12 (CTL) (**A**, **B**), 0,1nM NNK (**C**, **D**), 10nM NNK (**E**, **F**) e 1000nM NNK (**G**, **H**). Objetiva de 40x.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 42 - Fotomicrografia representativa da expressão de c-Myc na linhagem AML12 (CTL) e após a exposição crônica a diferentes concentrações do NNK.



Legenda: AML12 (CTL) (**A**, **B**), 0,1nM NNK (**C**, **D**), 10nM NNK (**E**, **F**) e 1000nM NNK (**G**, **H**). Objetiva de 40x.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

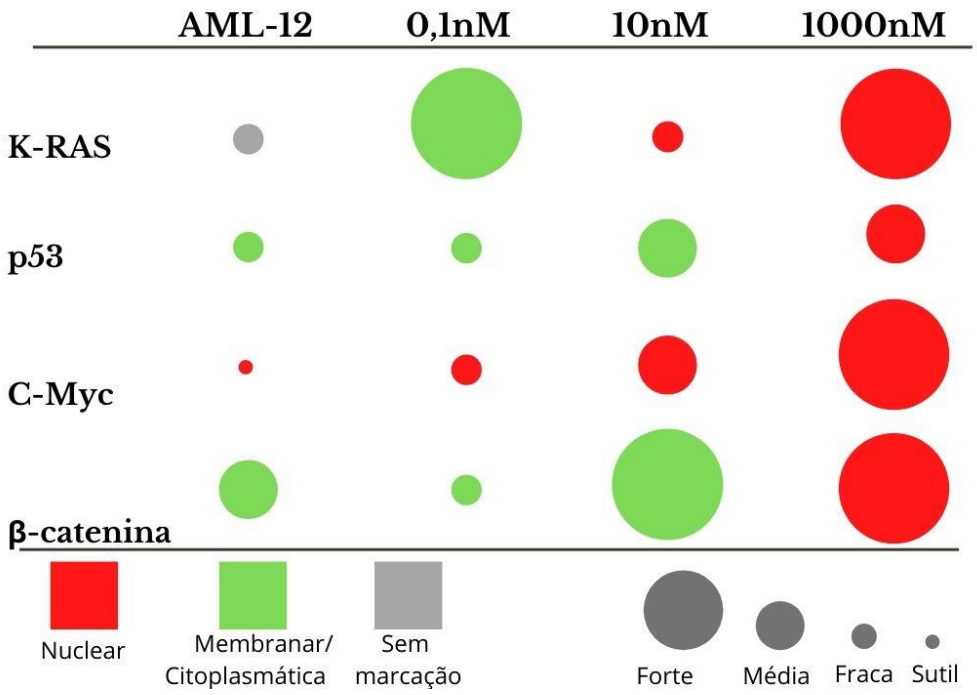
Figura 43 - Fotomicrografia representativa da expressão de β-catenina na linhagem AML12 (CTL) e após a exposição crônica a diferentes concentrações do NNK.



Legenda: AML12 (CTL) (**A**, **B**), 0,1nM NNK (**C**, **D**), 10nM NNK (**E**, **F**) e 1000nM NNK (**G**, **H**). Objetiva de 40x.
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Podemos resumir de maneira mais didática, como se deu a marcação da IF nas células AML12 (CTL) e pós exposição ao carcinógeno pela seguinte ilustração abaixo (Figura 44).

Figura 44 - Esquema didático com a intensidade da marcação sugerida para os marcadores adotados no ensaio de IF.



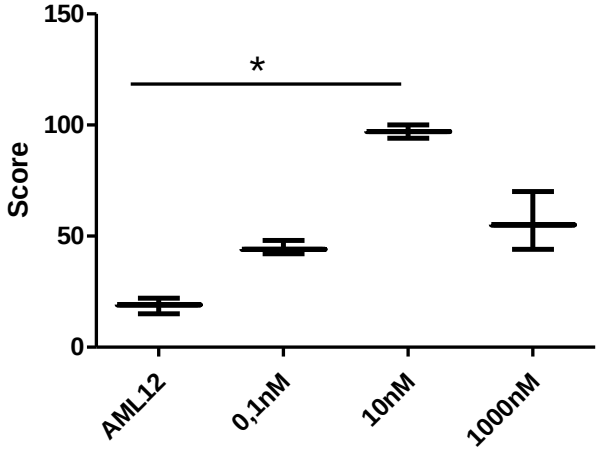
Legenda: Os círculos ilustram a intensidade da marcação, as cores identificam onde ocorreu esta marcação (membranar, citoplasmática ou nuclear) no ensaio de Imunofluorescência realizado: Grande=forte, intermediário=média, pequeno=fraca. Na primeira linha da figura, estão dispostos os grupos com as concentrações adotadas de NNK, na coluna à esquerda se encontram os marcadores adotados (K-RAS, p53, C-Myc, β-catenina).
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA,2020

4.4.2 Avaliação do efeito clastogênico após exposições de longo prazo a distintas concentrações de 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK nas células por meio da técnica do cometa

Os dados do ensaio do cometa foram avaliados e pode-se observar que na concentração de 10nM de NNK apresentou um maior efeito clastogênico, quando comparado ao grupo controle, conforme podemos observar no gráfico da figura 45.

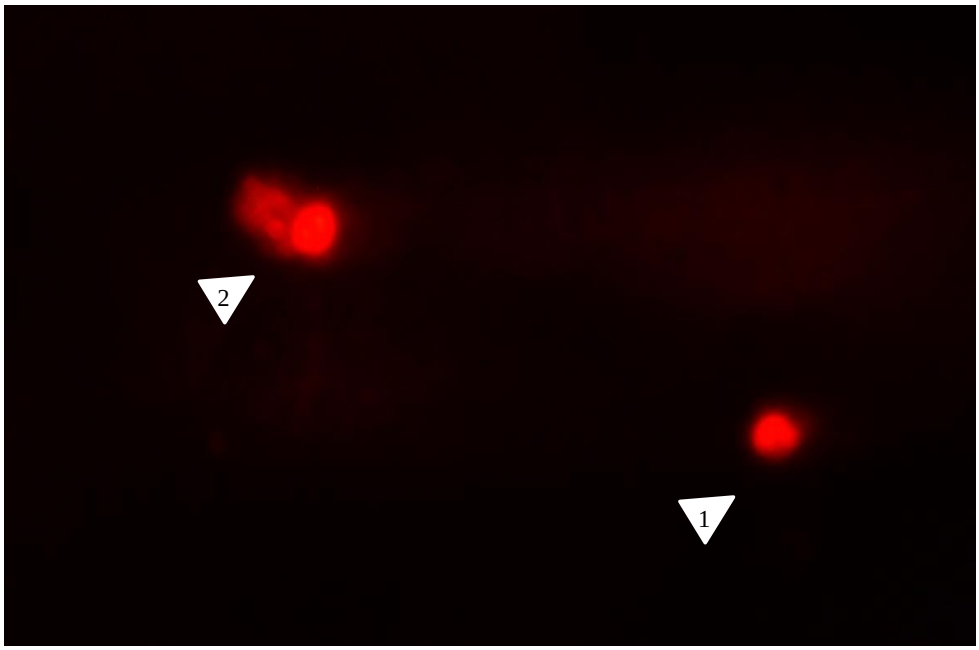
Esse efeito clastogênico mais elevado, foi estatisticamente significante ($p<0,05$) mostrando que as células apresentaram maior dano nesta concentração. Interessante notar que na maior concentração do carcinógeno NNK de 1000nM após 30 ciclos de exposição, não houve diferença significativa quando comparado ao grupo controle.

Figura 45 - Gráfico em box plot apresenta o escore de clastogenicidade das células AML12 (CTL) e células expostas por 30 ciclos ao NNK



Legenda: Apresentação do Score dos grupos avaliados no teste do cometa. Análise estatística de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn. (*$p<0,05$)
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020)

Figura 46- Fotomicrografia com classificação dos nucleóides provenientes do ensaio do cometa.

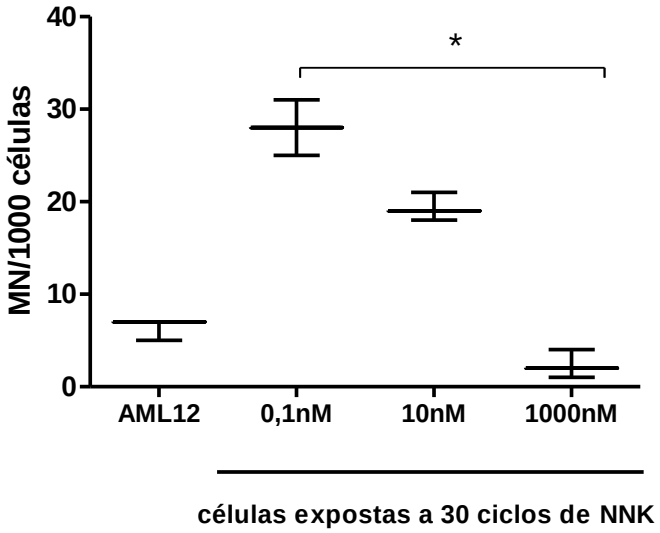


Legenda: Nucleóide de classe 1 (dano intermediário) e nucleóide de classe 2 (dano máximo) da dose de 10nM de NNK. Tempo de exposição 600ms. Marcação com Iodeto de propídeo. Aumento de 40x. Fonte: MIYAKE MIZUSAKA (2020).

4.4.3 Avaliação do teste do micronúcleo nas células AML12 após exposição crônica às diferentes concentrações de NNK 0,1nM, 10nM, 1000nM.

Os resultados do ensaio do micronúcleo em células submetidas às diferentes concentrações de NNK mostram que não houve diferença estatística entre o controle AML12 e as células expostas às distintas concentrações do NNK após 30 ciclos. Entretanto, na presente análise (figura 45) houve diferença estatística ($p<0,05$) entre a menor concentração de 0,1nM de NNK e 1000nM de NNK.

Figura 47- Gráfico em box plot apresenta o escore de clastogenicidade das células AML12 e células expostas a 30 ciclos de NNK após análise do micronúcleo.



Legenda: Apresentação dos grupos avaliados no teste do micronúcleo Análise estatística de Kruskal-Wallis test seguido de post hoc de Dunn. (*p<0,05).
Fonte: MIYAKE MIZUSAKA, (2020).

4.5 **Discussão**

A técnica da imunoflurescência (IF) é uma ferramenta amplamente difundida nos diversos campos da ciência. Por meio dela, pode-se identificar a marcação qualitativa e a localização de um dado marcador, onde uma vez positiva, ocorre a amplificação do por meio de uma reação de fluorescência

Nossos resultados de IF para a marcação do gene K-RAS nas células AML12 após 30 ciclos de exposição ao carcinógeno NNK, apresentaram uma marcação membranar nas células tratadas com a concentração de 0,1nM de NNK. Contudo, esta marcação membranar quase desaparece nas células que foram submetidas à concentração de 10nM e 1000nM de NNK, mostrando maior marcação em região nuclear.

É nítida a transição do sinal de fluorescência da área membranar para a região do núcleo e perinuclear, da menor para a maior concentração. O gene K-RAS é de grande relevância para o comportamento celular, em condições homeostáticas. O RAS está associado à sua forma GDP, desta maneira não há contato com o RAF, portanto não há *start* na cascata de sinalização (WALLIG et al., 2017). Entretanto, uma vez que esta célula sofre um estímulo externo, podendo ser uma mutação no códon, por meio de uma translocação de base, hormônios, fatores de crescimento ou citocinas, este fenômeno gera a dissociação da sua forma RAS-GDP *"inativo"*, e torna-se *"ativado"* para sua forma RAS-GTP (Figuras 34A, 34B). Uma vez ativo, se associa ao gene RAF que está envolvido na cascata de sinalização que ativa o gene MYC e desencadeia mudanças na expressão gênica, como por exemplo, aumento na proliferação celular (ELLIS; CLARK, 2000).

Nossos dados mostram que, após a exposição crônica das células AML12 nas diversas concentrações do carcinógeno NNK, as células tiveram seu comportamento fisiológico natural comprometido. Na concentração de 0,1nM de NNK, a marcação foi na região membranar, já na concentração intermediária de 10nM e na concentração mais elevada a marcação da IF para o anticorpo anti-KRAS foi, predominantemente nuclear e perinuclear. Diante dos nossos achados, a hipótese que podemos sugerir é que a proteína K-RAS passou por um processo de sumoilação do K-RAS (CHOI et al., 2018) após a elevada exposição ao carcinógeno NNK, por um período de 12 semanas.

A sumoilação consiste em uma modificação pós-traducional, que envolve uma ligação covalente com a proteína SUMO (*Small Ubiquitin-Related Modifier*), que possui aproximadamente 100 aminoácidos e 11kDa, (DI BACCO; GILL, 2006). Ela pode se ligar covalentemente através do substrato da proteína por meio de uma ligação de isopeptídeo a uma

lisina. Ao se ligar, modificam as propriedades, ou interações com outras proteínas que atuam como efetoras pelo reconhecimento de uma região de interação específica (ULRICH, 2009; WILKINSON; HENLEY, 2012). Este processo, é um dos principais reguladores de funções proteicas e possui um importante papel em uma ampla gama de processos celulares.

Esta modificação pós traducional pode gerar implicações moleculares que conduzem a consequências funcionais em um determinado substrato de síntese proteíca. Entretanto, são difíceis de predizer de maneira global. Contudo, a modificação proteica através da SUMO pode conduzir a três efeitos não mútuos. Seriam eles: 1. A sumoilação pode mascarar o receptor de ligação que interage com o substrato da proteína e conduzir a oclusão de maneira dependente, diminuindo a ligação de proteínas. 2. A SUMO pode atuar como um pivô, recrutando interações com novas proteínas de maneira não covalente, interagindo com parte da SUMO ou por meio da interação com o domínio na nova interface gerada por SUMO-Substrato. 3. SUMOilação pode conduzir uma mudança conformacional no substrato SUMOilado atuando diretamente na regulação da função (WILKINSON, HENLEY, 2012).

As proteínas RAS são sintetizadas no citosol e necessitam de algumas modificações pós traducionais que as torna apta para se associar a membrana plasmática (PRIOR; HANCOCK, 2012). São proteínas que estão sujeitas a modificações postraducionais tais como fosforilação, ubiquitinação, acetilação, SUMOilação e S-Nitrosilação (CHOI et al., 2018). A sumoilação atua na regulação da estabilidade, atividade e localização subcelular, este fenômeno é capaz de regular a sinalização da rota da RAS (ZHANG; LUO, 2016) e se apresenta como um importante fato para a ativação da RAS. Choi e colaboradores (2018) foram pioneiros que apresentaram que a RAS pode ser modificada por esse processo de SUMOilação. Observaram que a Lisina 42 (K42), que é extremamente conservada nas isoformas RAS, possui um papel importante na SUMOilação e este processo pode impactar na regulação da atividade da RAS afetando a sinalização downstream, ou seja a sinalização para o núcleo.

Em estudo realizado com células de câncer de cabeça e pescoço (Hep-2, KB e HEK293T), Zhou e colaboradores (2016) identificaram a SUMOilação como uma modificação pós-traducional não descrita anteriormente do sinal de transdução STAT3 e SENP3 como um modulador positivo, extremamente relevante na ativação da STAT3 induzida por tabaco ou alguma citocina. Observaram que a fumaça gerada por um cigarro em paciente com câncer de cabeça e pescoço podem apresentar microambiente com elevado NNK e metabólitos tóxicos, gerando a ativação e superexpressão da proteína SENP3 e esse cenário pode contribuir de maneira significativa ativação persistente da STAT3. A STAT3 é um membro de uma família com sete proteínas, modula a transcrição de genes envolvidos na regulação de diversas funções

essenciais no microambiente celular, tais como proliferação, diferenciação, angiogênese, dentre outros (JOHNSTON; GRANDIS, 2011)

Diante desses achados podemos sugerir que o tratamento com uma elevada concentração de NNK pode ter contribuído para a modificação pós traducional do K-RAS por meio de um processo de SUMOilação, promovendo sua modulação em direção ao núcleo.

O gene p53 codifica uma proteína de 53kD que atua como supressor tumoral. Está envolvido na regulação de muitas vias de sinalização da homeostase celular. Possui como principal ação a parada do ciclo celular, apoptose, reparo de danos DNA, sejam estes de origem química ou física (SAITO et al., 2015; KRAMATA et al., 2005). O p53 é o gene mais comum de ser mutado em canceres humanos. O anticorpo adotado em nosso ensaio é capaz de nos indicar se o gene p53 está mutado (Serotec– Biorad/Cód. MCA 909), ou seja, se está associado a oncogênese.

A Tp53 proteína tumoral (*Tumor Protein*), pertence a uma pequena família de genes que inclui, em mamíferos, dois correspondentes adicionais, TP63 e TP73. As proteínas p63 e p73 são funcionalmente semelhantes a p53 regulam fatores de transcrição e modificações pós-traducionais singulares, essas proteínas possuem inúmeras funções importantes, dentre elas seu envolvimento na supressão tumoral. A família p53 atua como uma "organização" de sinalização que integra e conecta sinais para o desenvolvimento, para o metabolismo, de controle de estresse celular, diferenciação, longevidade, proliferação e morte (CONSTANZO et al., 2014). No trabalho realizado por Ishimoto e colaboradores (2002) a existência do gene p73, denominada Delta Np73(DNp73), identificou efeito inibitório sobre o gene p53, induziu a apoptose e por conta disto pode estar associado a oncogênese.

Observamos em nossos resultados que, houve marcação para o p53 mutado tanto no grupo controle, como nos demais grupos que foram submetidos a diferentes concentrações do carcinógeno NNK. Todavia, pode-se observar que no grupo CTL e na concentração 0,1nM, a marcação se deu de maneira puntiforme, muito semelhante ao controle, com maior intensidade nos pequenos *spots*. Já nas concentrações de 10nM e 1000nM, esses *spots* se apresentaram em menor número, entretanto com uma área sutilmente maior (diâmetro), o que nos leva a inferir que nas concentrações de 10nM e 1000nM NNK possam ter contribuido para o aumento do seqüestro do p53, o qual forma complexos com o p63 e p73 permanecendo no citoplasma.

Portanto, apesar de raramente mutado, o p73 pode atuar indiretamente como um oncogene quando superexpresso, por inibir o p53. Diante desses relatos existe a possibilidade da formação destes complexos que seqüestrariam o p53 no citoplasma celular. Isso seria uma

das hipósteses que justificaria os nossos resultados nas células AML12. Entretanto, maiores estudos se fazem necessários para melhor elucidação deste fenômeno.

Podemos sugerir que, esta marcação se deu por conta dessas células serem derivadas de hepatócitos de camundongos transgênicos para TGFα, que possuem capacidade de replicação de forma independente sem necessidade de agente mitógeno externo (WU et al., 1994).

O gene p53 é frequentemente mutado em tumores humanos, segundo dados da literatura, com uma frequência de >50%, (SAITO et al.; 2015). As mutações geram a perda da função da proteína p53. Em carcinomas hepatocelulares humanos, há uma alta frequência de uma mutação específica no códon 249, no gene p53 e está associado a HCC (HSU et al., 1991; OGUEY et al., 1996). Em um estudo realizado, foi avaliado qual o papel desta mutação. Para isso, a célula AML12 foi transfectada com p53ser246, que no humano corresponde ao códon 249 (DUMENCO et al., 1995). Os resultados desse trabalho mostram que houve uma vantagem no crescimento em meio isento de SFB, quando comparado ao seu controle, no qual houve uma deleção de p53. Entretanto, a superexpressão de p53 mutante não foi capaz de transformar os hepatócitos.

Mesmo sendo células derivadas de um organismo geneticamente modificado, não podemos nos abster do impacto nas células do contato contínuo do carcinógeno NNK. Há relatos na literatura que apresentam a influência que o NNK exerce na instabilidade cromossomal em células pulmonares, conduzindo a perturbação do fuso ao cinetócoro, o que impacta na dinâmica do fuso, e em consequência disso, na divisão celular. Esta ação causa um bloqueio no alvo do p53 no centrossomo no decorrer da mitose, o que gera defeitos de alinhamento e em conseqüência disto, pode gerar instabilidade cromossômica, causando o aumento de carcinogêneses em células pulmonares (PARK et al., 2017).

O C-MYC é um fator de transcrição que regula cerca de 10-15% dos genes do genoma humano, e uma vez que esteja desequilibrado mesmo de maneira sutil é o suficiente para iniciar uma transformação neoplásica (MAI; MUSHINSKI, 2003). É um gene que é ativado por meio do receptor α-nicotínico de acetilcolina, através do influxo de cálcio, que ativa a rota mitogênica. Nossos resultados mostram que houve um aumento da intensidade da marcação nuclear para o C-MYC nas células que foram expostas à diferentes concentrações de NNK por 30 ciclos. Esse aumento na intensidade de marcação ocorreu de maneira dose dependente, exibindo que a concentração mais elevada apresentou marcação nuclear mais intensa. Segundo dados da literatura, a exposição subcrônica ao NNK pode estimular o receptor α7nAChR (*α7 nicotinic acetylcholine receptor*) bem como as vias mitogênicas associadas (SCHULLER et al.; 2003). Outros estudos mostram que o NNK em baixas concentrações (0,1nM), a mesma

concentração inicial adotada neste estudo, estimula a fosforilação dos oncogenes Bcl-2 e C-MYC por meio do receptor α7nAChR, promovendo o aumento da proliferação das células pulmonares de carcinoma humano. Esses dados sugerem que o NNK pode contribuir para a cooperação do Bcl2 e C-MYC conduzindo para a regulação da proliferação e sobrevivência celular (JIN et al., 2004). Diante disto podemos sugerir que o NNK foi capaz de auxiliar no aumento da expressão do C-MYC de maneira progressiva de acordo com o aumento da concentração.

A β-catenina é uma proteína multifuncional e tem um papel relevante atuando como proteína de adesão, bem como fator de transcrição das vias de sinalização (MACDONALD et al., 2009). Há diversos estudos que apresentam a participação da β-catenina na invasão e metástase em neoplasias humanas (MORIN et al., 1999). Mutações na β-catenina tem sido reportada em carcinomas hepatocelulares (HCC) (MIYOSHI et al.1998). Cinquenta por cento dos HCC que são desenvolvidos em camundongos transgênicos expressam C-MYC ou H-RAS no fígado e apresentam mutações na β-catenina, sugerindo que a ativação da via da β-catenina pode vir a contribuir com C-MYC ou RAS auxiliando na progressão do HCC (DE LA COSTE et al., 1998).

Em nossos estudos, a expressão da β-catenina foi predominantemente membranar no grupo controle, com um padrão de marcação intenso e desorganizado. Já na concentração de 0,1nM de NNK, a marcação da β-catenina apresentou uma redução na intensidade de marcação membranar, apresentando tambem marcação citoplasmática em algumas células. Na concentração de 10nM de NNK a marcação apresentou um padrão bem definido, retílineo e predominantemente membranar e na maior concentração de NNK (1000nM) a marcação da β-catenina foi somente nuclear. Esses nossos resultados mostram que a β-catenina está sendo modulada para núcleo quando submetida a concentração mais elevada do carcinógeno NNK (1000nM). Há dados da literatura que a β-catenina pode de alguma maneira, se transpor ou até mesmo realizar um *bypass* da sua destruição no citoplasma e acarretar o aumento dos níveis de β-catenina no citoplasma e então, ser translocada para o núcleo (VALENTA et al., 2012). Os níveis de β-catenina no núcleo são reguladas pelo GSK3b (*Glycogen Synthase Kinase-3b*), esse fosforila resíduos de serina 33, 37 e treonina 41 (Ser33/37/Thr41) da β-catenina para a degradação proteossomal (HUELSKEN; BIRCHMEIER, 2001). O GSK3b torna-se inativo, uma vez que sofreu a fosforilação da serina 9 em decorrência dos sinais WNT/PI3K/Akt. Este fenômeno conduz o acúmulo citosólico e subsequente translocação da β-catenina ao núcleo. No ambiente nuclear, a β-catenina auxilia na ativação da expressão de genes envolvidos na sobrevivência celular e proliferação (DING et al., 2000, BEHRENS et al.1996, MILLER et al

1996). Fonseca (2019) em seu trabalho, também observou aumento de expressão de β-catenina nuclear, em linhagem canina D17 com aumento da atividade transcricional e elevação no índice proliferativo. Diante disto, nossos resultados mostram que células AML12 após 30 ciclos sob 1000nM de NNK apresentaram somente a expressão de β-catenina no núcleo e podemos sugerir que este fenômeno está auxiliando na transcrição e ativação de genes de proliferação. Isso também explicaria a forte marcação de C-MYC nesta concentração.

Realizamos também o teste do cometa, o qual tem por objetivo avaliar o índice de clastrogenicidade na célula eucariótica, ou seja, o dano derivado do contato de longo prazo com o carcinógeno NNK. Esse é um processo realizado *in vitro* que analisa a quebra de fita simples ou dupla fita de DNA por meio de uma técnica eletroforética, também amplamente conhecido como *Sigle cell gel eletrophoresis* (SCGE). Para tanto, sabe se que este ensaio foi padronizado pelo International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (HARTMANN et al., 2003) e estabelecido com recomendações técnicas do 4th International Workshop on Genotoxicity Tests (BURLINSON et al., 2007) e este ensaio tem sido adotado por sua solidez, sensibilidade (ARALDI et al., 2015), poder estatístico para avaliar quebras de DNA e tem sido considerado como um dos marcadores para mutagenicidade (OECD, 2014; HEUSER et al.; 2008).

Em nossa análise do ensaio do cometa, os resultados obtidos nos apresentaram que, após 30 ciclos de exposição das células AML12 em diferentes concentrações do carcinógeno NNK (0,1nM, 10nM e 1000nM), observou-se que a concentração de 10nM foi a que apresentou maior índice clastôgenico, ou seja, de quebra de DNA quando comparado ao controle apresentando diferença estatística significativa ($p<0,05$). Entretanto, curioso notar que na maior concentração avaliada, o efeito identificado de lesões no DNA foi inferior ao da concentração intermediária de 10nM. Esses resultados corroboram com outros resultados anteriores apresentados ao longo desse trabalho, no qual a concentração mais elevada produziu menor lesão ou performance maligna inferior à concentração intermediária de 10nM de NNK. Diante disto, podemos sugerir que este fenômeno é mais um indício da presença do efeito hormesis (MATTSON et al., 2008) que se apresentou nessas células após a exposição crônica do carcinógeno.

A técnica do micronúcleo (MNA) associado ao teste do cometa (CA) são considerados testes de extrema importância para a análise de mutagenicidade. Essas análises, têm sido adotadas por diversas agências regulatórias em todo mundo, tais como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) no Brasil, FDA (Food and Drug Administration) nos EUA e EMA (European Medicines Agency) na Europa por conta de sua sensibilidade de detecção. O micronúcleo pode ser gerado por meio da quebra cromossomal ou através da perturbação e rompimento do aparelho mitótico (BONASSI et al., 2007). O teste do micronúcleo é bem

estabelecido como um teste padrão para a avaliação de toxicidade em nível cromossomal (HEDDLE, 1973).

O teste do micronúcleo é capaz de identificar, por ventura, se os fragmentos cromossômicos se perderam ao longo da divisão celular devido a eventos clastogênicos. Nossos resultados mostram que, na análise do teste do micronúcleo (MN), a clastogenicidade que ocorreu nas células AML12 expostas à menor concentração de carcinógeno NNK (0,1nM) não foi estatisticamente significante em relação ao controle, entretanto, mostra diferença significativa quando comparado às celulas que foram expostas à 1000nM de NNK ($p<0,05$).

Podemos supor que a maior quantidade de MN encontrada nas células tratadas com concentrações de 0,1nM NNK seriam decorrentes de lesões menores no DNA, que não seriam suficientes para conduzir a morte celular. No entanto, estas células albergariam erros que seriam perpetuados para as celulas filhas. Já o menor número de MN apresentado na maior concentração de 1000nM NNK, talvez se deva ao fato que as células tratadas com uma concentração mais alta, poderia ter levado à lesões mais severas comprometendo a sobrevivência destas células e conduzindo à morte celular. Essa morte pode não ter sido detectada no ensaio do MTT por uma limitação da própria técnica. O ideal seria realizar uma avaliação de morte celular (Azul de tripan ou Anexina V) logo após o tratamento com o carcinógeno para nos certificarmos de que esse fenômeno realmente ocorre.

Podemos sugerir que esse fenômeno seja derivado de danos no ocorridos no DNA após a exposição ao NNK. O teste do micronúcleo é considerado como padrão ouro, é amplamente adotado para a avalição de citogenética. Segundo a literatura, o MN pode ter diversas origens de formação, tais como defeitos nas proteínas de envelope nuclear, defeitos na fixação durante a divisão, falhas na estrutura do centrômero ou quebras na dupla fita de DNA (KISURINA-EVGENIEVA; SUTIAGINA, 2016). Sabe-se que a o NNK e seus intermediários como o NNK-acetato podem conduzir a lesões como quebra da dupla fita (DNA *double strand breaks – DSBs*). Estes danos podem ser identificados por meio da avaliação da γH2AX.

A histona 2AX é fosforilada em resposta as quebras na dupla fita de DNA, se torna γH2AX (GARCIA-CANTON, 2013; ZHANG, 2018). Sendo assim, diante do entendimento do potencial mutagênico de agentes químicos como o NNK, juntamente com a presença de micronúcleos, isso nos sugere que ocorreram danos em seu DNA. Contudo, maiores estudos se fazem necessários para confirmar essa hipótese. Isso poderia ser avaliado através da análise da γH2AX nos hepatócitos, pois este pode ser adotado como um possível marcador para danos no DNA, uma vez que a ação dos carcinógenos químicos, consiste na formação de compostos

covalentes, que aumentam a probabilidade de ocorrerem erros de inserção de bases no DNA durante o processo de replicação (SAITO et al., 2015).

4.6 Resumo dos Achados

- No ensaio de imunoflurescência, após os 30 ciclos de exposição ao NNK, o marcador K-RAS apresenta marcação mais definida e membranar nas células expostas à concentração 0,1nM de NNK, havendo um aumento da marcação e transição da região membranar para a região nuclear e perinuclear nas células expostas à 10nM e 1000nM de NNK. As células AML12 não expostas ao NNK não apresentaram marcação;
- Houve marcação do p53 em todas as células testadas para o anticorpo, tanto nas células expostas ao NNK quanto nas células não expostas. A marcação se caracterizava por ser puntiforme e difusa no citoplasma e perinuclear;
- O marcador C-Myc apresentou marcação nuclear em todos os grupos testados, inclusive as células sem exposição ao NNK. Entretanto, a marcação nas células AML12 não expostas ao carcinógeno apresentaram um padrão de sutil de marcação. A intesiddade da marcação parece estar relacionada à concentração de NNK, sendo maior nas células tratadas com 1000nM de NNK;
- A marcação da β-catenina nas células AML12 não expostas ao NNK mostrou um padrão membranar, permanecendo com este padrão membranar nas células expostas à 0,1nM e 10nM de NNK. As células expostas à 1000nM de NNK mostraram um padrão de marcação nuclear e puntiforme difuso citoplasmático;
- No teste do cometa, observamos que após a exposição ao NNK por 30 ciclos, as células AML12 tratadas com 10nM de NNK apresentaram maior escore em relação às células não expostas, mostrando maior lesão em DNA nestas células. As células expostas às concentrações de 0,1nM e 1000nM não foram significativamente diferentes do controle;
- O ensaio do micronúcleo (MN) mostra que não houve diferença estatística nas células AML12 expostas ao NNK em relação às células não expostas. Entretanto, o grupo tratado com 0,1nM de NNK mostra quantidade significativamente maior de micronúcleos quando comparada com o grupo tratado com 1000nM de NNK.

5 CONCLUSÕES

5.1 Conclusão Geral

Diante de nossos resultados podemos avaliar que os efeitos do NNK, mesmo sob baixas concentrações de 0,1nM foi capaz de alterar o comportamento celular dos hepatócitos AML12 após exposição a longo prazo.

As células permanceram viáveis em cultivo celular mesmo após extensas exposições ao NNK sob diferentes concentrações.

5.2 Conclusões Específicas

As células se mantiveram viáveis após o protocolo de exposição de longo prazo sob baixa concentração (0,1nM de NNK) e apresentaram maior índice proliferativo (células em fase S do ciclo celular) avaliados pela citometria. Estas células apresentaram maior capacidade de invasão no ensaio do transwell, mostraram maior capacidade de sobrevivência independente de ancoragem (cultivo em superfície de baixa adesão), porém não foram capazes de formar tumor em camundongos imunodeficientes BALB/c nu/nu inoculados com as células.

As células AML12 quando submetidas a diferentes concentrações de 0,1nM e 10nM apresentaram aumento de viabilidade celular pela técnica do MTT após uma única exposição ao carcinógeno. No ensaio de wound healing, as células expostas a 10nM de NNK após exposição de longo prazo, apresentaram o fechamento da lesão mais rápida em relação ao controle. No ensaio do tempo de duplicação celular, as células AML12 expostas a 0,1nM, 10nM e 1000nM de NNK por 30 ciclos não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (células AML12 não expostas ao carcinógeno).

Na análise de IF após exposição de longo prazo foi observado que: o marcador K-RAS apresentou marcação mais definida e membranar nas sob à concentração 0,1nM de NNK, com um aumento da marcação e transição da região membranar para a região nuclear e próxima ao núcleo na concentração de 10nM e 1000nM de NNK; o p53 foi identificado em todas as células testadas para o anticorpo, tanto nas células expostas ao NNK quanto nas células não expostas; o C-Myc apresentou marcação nuclear em todos os grupos testados, incluindo o grupo CTL que apresentou um padrão mais sutil, e que nas células expostas ao carcinógeno apresentou marcação gradativamente mais intensa com o aumento da concentração do NNK; a β-catenina

nas células AML12 não expostas ao NNK mostrou um padrão membranar, observado também nas células expostas à 0,1nM e 10nM de NNK, enquanto na maior concentração de 1000nM de NNK houve a translocação para a marcação nuclear. Observamos que no teste do cometa após 30 ciclos, as células AML12 tratadas com 10nM de NNK apresentaram maior escore em relação às células não expostas, mostrando maior lesão em DNA nestas células. O ensaio do micronúcleo (MN) mostra que não houve diferença estatística nas células AML12 expostas ao NNK em relação às células não expostas.

Concluímos dizendo que este trabalho se faz relevante, não somente por conta de seu papel no melhor entendimento de um dos mais de 7000 componentes tóxicos do cigarro que é o NNK. Podemos notar que este carcinógeno mesmo sob baixa concentrações pode comprometer a dinâmica celular a longo prazo. A compreensão do NNK, bem como sua relevância nos aspectos epidemiológicos de uma patologia global caracterizada pela dependência física e psicológica que é tabagismo ressaltam a necessidade de trabalhos como este. O tabagismo acarreta danos econômicos e sanitários impactando na economia de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Diante disto, a compreensão do impacto na fisiologia celular se torna importante para a promoção de medidas regulatórias, sanitárias e de controle dos danos malignos do cigarro e seus derivados às populações vulneráveis. Embora nosso trabalho tenha identificado algumas particularidades do comportamento da célula AML12 após a exposição de longo prazo ao em diferentes concentrações de NNK, alguns aspectos ainda permanecem obscuros e necessitam de maiores estudos para a sua elucidação, tais como uma análise mais profunda nos aspectos moleculares pós exposição e suas possíveis consequências na análise da proteômica.

6 REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, S. Z. et al. Role of polymorphic CYP2E1 and CYP2D6 genes in NNK-induced chromosome aberrations in cultured human lymphocytes: **Pharmacogenetics**, v. 10, n. 3, p. 239–249, abr. 2000.

AIZAWA, K. et al. Tobacco carcinogen induces both lung cancer and non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinomas in ferrets which can be attenuated by lycopene supplementation: Tobacco carcinogen induces NAFLD, NASH and HCC in ferrets. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 5, p. 1171–1181, 1 set. 2016.

ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74–82, maio 2015.

ARALDI, R. P. **Linhagens celulares derivadas de cultivos primários de neoplasias infectadas pelo BPV como modelo de estudo da transição epitélio-mesênquima.** Doutorado em Biotecnologia—São Paulo: Universidade de São Paulo, 1 out. 2018.

AZQUETA, A. et al. Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 783, p. 108288, jan. 2020.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 949–968, jun. 2013.

BALBO, S. et al. Carcinogenicity and DNA adduct formation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and enantiomers of its metabolite 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in F-344 rats. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 12, p. 2798–2806, dez. 2014.

BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO. **Data Sheet AML12**, 2014. Disponível em: <http://bcrj.org.br/celula/0354>

BEHRENS, J. et al. Functional interaction of β-catenin with the transcription factor LEF-1. **Nature**, v. 382, n. 6592, p. 638–642, ago. 1996.

BESARATINIA, A. B.; KLEINJANS, J. C. S.; SCHOOTEN, F. J. V. Biomonitoring of tobacco smoke carcinogenicity by dosimetry of DNA adducts and genotyping and phenotyping of biotransformational enzymes: a review on polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biomarkers**, v. 7, n. 3, p. 209–229, jan. 2002.

BIRCHENALL-ROBERTS, M. C. et al. K-Ras4B proteins are expressed in the nucleolus: Interaction with nucleolin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, n. 2, p. 540–549, set. 2006.

BOLLER, K.; SCHMID, W. Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon. **Human Genetics**, v. 11, n. 1, p. 35–54, 1970.

BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625–631, 18 ago. 2006.

BRASIL Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2016**. INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2011

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Organização Pan-Americana da Saúde. **Pesquisa especial de tabagismo – PETab: Relatório Brasil** / Organização Pan-Americana da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J. L. V. DE; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, ago. 2009.

BURLINSON, B. et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 1, p. 31–35, fev. 2007.

CADIGAN, K. M.; NUSSE, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. **Genes & Development**, v. 11, n. 24, p. 3286–3305, 15 dez. 1997.

CALABRESE, E. Hormesis: Path and Progression to Significance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 2871, 21 set. 2018.

CALALB, M. B. et al. Focal Adhesion Kinase Tyrosine-861 Is a Major Site of Phosphorylation by Src. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 228, n. 3, p. 662–668, nov. 1996.

CALALB, M. B.; POLTE, T. R.; HANKS, S. K. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 2, p. 954–963, fev. 1995.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - US GOV (UK). **The GATS Atlas Global Adult Tobacco Survey**. In: The GATS Atlas Global Adult Tobacco Survey. 65. ed. UK: MYRIAD EDITIONS, 2015. Disponível em: http://gatsatlas.org/downloads/GATS-whole-book-12.pdf.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (org.). NNAL (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol) Factsheet. 2019. CDC USA. Disponível em: https://www.cdc.gov/biomonitoring/. Acesso em: 11 maio 2020.

CHOI, B. H. et al. RAS GTPases are modified by SUMOylation. **Oncotarget**, v. 9, n. 4, p. 4440–4450, 12 jan. 2018.

COHEN, N.; FEDEWA, S.; CHEN, A. Y. Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 381–395, nov. 2018.

COSTANZO, A. et al. *TP63* and *TP73* in cancer, an unresolved “family” puzzle of complexity, redundancy and hierarchy. **FEBS Letters**, v. 588, n. 16, p. 2590–2599, 19 ago. 2014.

COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 41, n. 2–3, p. 321–331, dez. 1976.

DE LA COSTE, A. D. L. et al. Somatic mutations of the -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 15, p. 8847–8851, 21 jul. 1998.

DE LUCIA, R., OLIVEIRA-FILHO, R M. Farmacologia integrada. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, c2004. 678p.

DI BACCO, A.; GILL, G. SUMO-Specific Proteases and the Cell Cycle. **Cell Cycle**, v. 5, n. 20, p. 2310–2313, 15 out. 2006.

DING, V. W.; CHEN, R.-H.; MCCORMICK, F. Differential Regulation of Glycogen Synthase Kinase 3β by Insulin and Wnt Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 32475–32481, 20 out. 2000.

DOHERTY, A.; BRYCE, S. M.; BEMIS, J. C. The In Vitro Micronucleus Assay. In: **Genetic Toxicology Testing**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 161–205.

DUMENCO, L. et al. Introduction of a murine p53 mutation corresponding to human codon 249 into a murine hepatocyte cell line results in growth advantage, but not in transformation. **Hepatology**, v. 22, n. 4, p. 1279–1288, out. 1995.

EKPU, V. U.; BROWN, A. K. The Economic Impact of Smoking and of Reducing Smoking Prevalence: Review of Evidence. **Tobacco Use Insights**, v. 8, p. TUI.S15628, jan. 2015.

ELLIS, C. A.; CLARK, G. The importance of being K-Ras. **Cellular Signalling**, v. 12, n. 7, p. 425–434, jul. 2000.

EVAN, G. I.; LITTLEWOOD, T. D. The role of c-myc in cell growth. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 3, n. 1, p. 44–49, fev. 1993.

EVANS, H. J.; NEARY, G. J.; WILLIAMSON, F. S. The Relative Biological Efficiency of Single Doses of Fast Neutrons and Gamma-rays on Vicia Faba Roots and the Effect of Oxygen: Part II. Chromosome Damage: The Production of Micronuclei. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine**, v. 1, n. 3, p. 216–229, jan. 1959.

FARARJEH, A. S. et al. Long-term exposure to extremely low-dose of nicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induce non-malignant breast epithelial cell transformation through activation of the a9-nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathway. **Environmental Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 73–82, jan. 2019.

FONSECA, J. M. DA. **Efeitos da Toxina de bacillus antracis (PA-U2R200A+ PAL1I210A+LF) em osteossarcomas humanos**. Tese (Doutorado)—Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas IV: Universidade de São Paulo, 2019.

FROTSCHL, R. Experiences with the in vivo and in vitro comet assay in regulatory testing. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 51–57, 1 jan. 2015.

GARCIA-CANTON, C.; ANADON, A.; MEREDITH, C. Genotoxicity evaluation of individual cigarette smoke toxicants using the in vitro γH2AX assay by High Content Screening. **Toxicology Letters**, v. 223, n. 1, p. 81–87, out. 2013.

GE, G.-Z.; XU, T.-R.; CHEN, C. Tobacco carcinogen NNK-induced lung cancer animal models and associated carcinogenic mechanisms. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 47, n. 7, p. 477–487, jul. 2015.

GONIEWICZ, M. L. et al. Elimination Kinetics of the Tobacco-Specific Biomarker and Lung Carcinogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanol. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 12, p. 3421–3425, 1 dez. 2009.

GUMBINER, B. M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 8, p. 622–634, ago. 2005.

HABAS, R. Canonical Wnt Signaling: An Unexpected New Player. **Developmental Cell**, v. 11, n. 2, p. 138–139, ago. 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HANEEF, M. et al. Molecular Docking of Known Carcinogen 4-(Methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) with Cyclin Dependent Kinases towards Its Potential Role in Cell Cycle Perturbation. **Bioinformation**, v. 10, n. 8, p. 526–532, 30 ago. 2014.

HANG, B. Formation and Repair of Tobacco Carcinogen-Derived Bulky DNA Adducts. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, p. 1–29, 2010.

HARTMANN, A. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45–51, 1 jan. 2003.

HECHT, S. S. A biomarker of exposure to environmental tobacco smoke (ETS) and Ernst Wynder's opinion about ETS and lung cancer. **Preventive Medicine**, v. 43, n. 4, p. 256–260, out. 2006.

HECHT, S. S. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 424, n. 1–2, p. 127–142, mar. 1999.

HECHT, S. S. et al. A Tobacco-Specific Lung Carcinogen in the Urine of Men Exposed to Cigarette Smoke. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 21, p. 1543–1546, 18 nov. 1993.

HEDDLE, J. A rapid in vivo test for chromosomal damage☆. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 187–190, maio 1973.

HEUSER, V. et al. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell Biology International**, v. 32, n. 10, p. 1223–1229, out. 2008.

HOVANESSIAN, A. G. et al. The Cell-Surface-Expressed Nucleolin Is Associated with the Actin Cytoskeleton. **Experimental Cell Research**, v. 261, n. 2, p. 312–328, dez. 2000.

HOWLAND, R. D.; MYCEK, M. J. **Farmacologia Ilustrada**. 3. ed. Rio Grande do Sul: Artmed, 2008.

HSU, I. C. et al. Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. **Nature**, v. 350, n. 6317, p. 427–428, abr. 1991.

HUBER, A. H.; WEIS, W. I. The Structure of the β-Catenin/E-Cadherin Complex and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by β-Catenin. **Cell**, v. 105, n. 3, p. 391–402, maio 2001.

HUELSKEN, J.; BIRCHMEIER, W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 11, n. 5, p. 547–553, out. 2001.

HULKOWER, K. I.; HERBER, R. L. Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 107–124, 11 mar. 2011.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER**. Tobacco smoke and involuntary smoking. Monograph**, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans v. 83, p. Volume 83, 2004

ISHIMOTO, O. et al. Possible Oncogenic Potential of ΔNp73: A Newly Identified Isoform of Human p73. **Cancer Research**, v. 62, n. 3, p. 636–641, 1 fev. 2002.

ITALIA. Food and Agriculture Organizaion of United Nations. **Projections Of Tobacco Production, Consumption And Trade To The Year 2010**. 2003. Disponível em: http://www.fao.org/3/Y4956e/y4956e00.htm#Contents. Acesso em: 11 ago. 2020.

JENSEN, O. N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 33–41, fev. 2004.

JIN, Z. et al. Tobacco-specific Nitrosamine 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone Promotes Functional Cooperation of Bcl2 and c-Myc through Phosphorylation in Regulating Cell Survival and Proliferation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 40209–40219, 17 set. 2004.

JOHNSTON, P. A.; GRANDIS, J. R. STAT3 SIGNALING: Anticancer Strategies and Challenges. **Molecular Interventions**, v. 11, n. 1, p. 18–26, 1 fev. 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Báscia**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KATAYAMA, H. Mechanism of anchorage-independency and tumor formation of cancer cells: possible involvement of cell membrane–bound laminin-332. **Cell and Tissue Research**, v. 379, n. 2, p. 255–259, fev. 2020.

KIM, D. K. Estimating doubling time of cells in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 31, n. 6, p. 419–420, jun. 1995.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 540, n. 2, p. 153–163, out. 2003.

KISURINA-EVGENIEVA, O. P.; SUTIAGINA, O. I.; ONISHCHENKO, G. E. Biogenesis of micronuclei. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 5, p. 453–464, maio 2016.

KÖNIGSHOFF, M.; EICKELBERG, O. WNT Signaling in Lung Disease: A Failure or a Regeneration Signal? **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 21–31, jan. 2010.

KRAMATA, P. et al. Patches of Mutant p53-Immunoreactive Epidermal Cells Induced by Chronic UVB Irradiation Harbor the Same p53 Mutations as Squamous Cell Carcinomas in the Skin of Hairless SKH-1 Mice. **Cancer Research**, v. 65, n. 9, p. 3577–3585, 1 maio 2005.

LACKMANN, G. M. et al. Metabolites of a Tobacco-Specific Carcinogen in Urine From Newborns. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 5, p. 459–465, 3 mar. 1999.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, fev. 2007.

LU, Y.; LIU, Y.; YANG, C. Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 128, p. 56450, 11 out. 2017.

MACDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/β-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. **Developmental Cell**, v. 17, n. 1, p. 9–26, jul. 2009.

MAI, S.; MUSHINSKI, J. F. c-Myc-Induced Genomic Instability. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 22, n. 3, p. 179–200, 2003.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing Research Reviews**, v. 7, n. 1, p. 1–7, jan. 2008.

MENCK, C. F. M.; SLUYS, M. V. **Genética Molecular Básica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MENNECIER, G. et al. Chronic exposure of lung alveolar epithelial type II cells to tobacco-specific carcinogen NNK results in malignant transformation: A new in vitro lung carcinogenesis model: A NEW IN VITRO LUNG CARCINOGENESIS MODEL. **Molecular Carcinogenesis**, v. 53, n. 5, p. 392–402, maio 2014.

MILLER, J. R.; MOON, R. T. Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. **Genes & Development**, v. 10, n. 20, p. 2527–2539, 15 out. 1996.

MIYOSHI, Y. et al. Activation of the β-Catenin Gene in Primary Hepatocellular Carcinomas by Somatic Alterations Involving Exon 3. **Cancer Research**, v. 58, n. 12, p. 2524–2527, 15 jun. 1998.

MØLLER, P. The comet assay: ready for 30 more years. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 1–7, 24 fev. 2018.

MORIN, P. J. β-catenin signaling and cancer. **BioEssays**, v. 21, n. 12, p. 1021–1030, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. National Institute Of Health (org.). Liver (Hepatocellular) Cancer Prevention (PDQ®)–Health Professional Version. 2020. Disponível em: https://www.cancer.gov/types/liver/hp/liver-prevention-pdq#_197_toc

NUSSE, R.; VARMUS, H. E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. **Cell**, v. 31, n. 1, p. 99–109, nov. 1982.

OGUEY, D. et al. Analysis of the tumorigenicity of the X gene of hepatitis B virus in a nontransformed hepatocyte cell line and the effects of cotransfection with a murine p53 mutant equivalent to human codon 249. **Hepatology**, v. 24, n. 5, p. 1024–1033, nov. 1996.

OLIVIERI, G.; BODYCOTE, J.; WOLFF, S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. **Science**, v. 223, n. 4636, p. 594–597, 10 fev. 1984.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**. Paris: OECD Publishing, 2014.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 452: Chronic Toxicity Studies**. [s.l.] OECD, 2018.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291–298, ago. 1984.

PAI, S. G. et al. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 101, dez. 2017.

PARK, J. E.; JANG, Y. L.; JANG, C.-Y. The tobacco carcinogen NNK disturbs mitotic chromosome alignment by interrupting p53 targeting to the centrosome. **Toxicology Letters**, v. 281, p. 110–118, nov. 2017.

PATANKAR, M. et al. KRAS and BRAF mutations induce anoikis resistance and characteristic 3D phenotypes in Caco-2 cells. **Molecular Medicine Reports**, 20 set. 2019.

PETERSON, L. A. Context Matters: Contribution of Specific DNA Adducts to the Genotoxic Properties of the Tobacco-Specific Nitrosamine NNK. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 420–433, 17 jan. 2017.

PETRICK, J. L. et al. Tobacco, alcohol use and risk of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: The Liver Cancer Pooling Project. **British Journal of Cancer**, v. 118, n. 7, p. 1005–1012, abr. 2018.

PFALLER, W. et al. Novel Advanced *In Vitro* Methods for Long-term Toxicity Testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 29, n. 4, p. 393–426, jul. 2001.

PIJUAN, J. et al. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, p. 107, 14 jun. 2019.

PINTO, M. T. et al. Estimativa da carga do tabagismo no Brasil: mortalidade, morbidade e custos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 6, p. 1283–1297, jun. 2015.

PRETTI, E. et al. **Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e muatgenicidade no peixe neotropical prochilodus lineatus expostos à fração solúvel da gasolina**. . In: VIII CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL. Caxambú- Minas Gerais: Sociedade Ecologia do BRASIL, set 2007Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Claudia_Martinez2/publication/240622872_.pdf>

PRIOR, I. A.; HANCOCK, J. F. Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 23, n. 2, p. 145–153, abr. 2012.

RABINOVITCH, P. **Introduction to cell cycle analysis**Phoenix Flow Systems, Inc, , [s.d.]. Disponível em: <http://www.phnxflow.com/Introduction%20to%20Cell%20Cycle%20Analysis.pdf>

RODGMAN, A.; PERFETTI, T. A. **The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke**. [s.l.] CRC Press, 2016.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959.

SAITO, R. DE F. et al. Fundamentos de oncologia molecular. 2015.

SAMET, J. M. Tobacco Smoking. **Thoracic Surgery Clinics**, v. 23, n. 2, p. 103–112, maio 2013.

SAMSON, L.; CAIRNS, J. A new pathway for DNA repair in Escherichia coli. **Nature**, v. 267, n. 5608, p. 281–283, maio 1977.

SCHAFER, K. A. The Cell Cycle: A Review. **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 6, p. 461–478, nov. 1998.

SCHULLER, H. M.; PLUMMER, H. K.; JULL, B. A. Receptor-mediated effects of nicotine and its nitrosated derivative NNK on pulmonary neuroendocrine cells. **The Anatomical Record**, v. 270A, n. 1, p. 51–58, jan. 2003.

SHEN, J. et al. NNK promotes migration and invasion of lung cancer cells through activation of c-Src/PKCι/FAK loop. **Cancer Letters**, v. 318, n. 1, p. 106–113, maio 2012.

SIRICA, A. E.; PITOT, H. C. Drug metabolism and effects of carcinogens in cultured hepatic cells. **Pharmacological Reviews**, v. 31, n. 3, p. 205–228, 1 set. 1979.

SIRIWARDHANA, N.; CHOUDHARY, S.; WANG, H.-C. R. Precancerous model of human breast epithelial cells induced by NNK for prevention. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 109, n. 3, p. 427–441, jun. 2008.

SRIVASTAVA, M.; POLLARD , H. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. **FASEB J.**, v. 13, n. 14, p. 1911–1922, 1999.

TREPAT, X.; CHEN, Z.; JACOBSON, K. Cell Migration. In: TERJUNG, R. (Ed.). . **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. p. c110012.

ULRICH, H.**SUMO Protocols**: springer protocols. Springer, 2009. 324 p. (497)

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Coordinating Center for Health Promotion, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2006.

UN. ECE. SECRETARIAT; UN. COMMITTEE OF EXPERTS ON THE TRANSPORT OF DANGEROUS GOODS AND ON THE GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELLING OF CHEMICALS. **Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals: GHS**. 4th rev. ed ed. New York: United Nations, 2011.

UNITED NATIONS. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS): Fourth Revised Edition**. [s.l.] UN, 2011.

VALENTA, T.; HAUSMANN, G.; BASLER, K. The many faces and functions of β-catenin: β-Catenin: a life by, beyond, and against the Wnt canon. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 12, p. 2714–2736, 13 jun. 2012a.

VALENTA, T.; HAUSMANN, G.; BASLER, K. The many faces and functions of β-catenin: β-Catenin: a life by, beyond, and against the Wnt canon. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 12, p. 2714–2736, 13 jun. 2012b.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: CREE, I. A. (Ed.). . **Cancer Cell Culture**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. v. 731p. 237–245.

VASQUEZ, M. Z.; FRÖTSCHL, R. The In Vivo Comet Assay Test. In: **Genetic Toxicology Testing**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 345–382.

WALLIG, M. A. et al. **Fundamentals of Toxicologic Pathology: Third Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

WALLIG, M. A.; MAHLER, B. W. **Fundamentals of toxicologic pathology**. 3. ed. Illinois, EUA: Academic Press, 2017.

WALLINGFORD, J. B.; HABAS, R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governingcell fate and cell polarity. **Development**, v. 132, n. 20, p. 4421–4436, 15 out. 2005.

WANG, J. et al. Myc activates telomerase. **Genes & Development**, v. 12, n. 12, p. 1769–1774, 15 jun. 1998.

WANG, Y. et al. Involvement of twist in NNK exposure-promoted lung cancer cell migration and invasion. **Toxicology in Vitro**, v. 63, p. 104740, mar. 2020.

WEI, P.-L. et al. Tobacco-Specific Carcinogen Enhances Colon Cancer Cell Migration Through α7-Nicotinic Acetylcholine Receptor: **Annals of Surgery**, v. 249, n. 6, p. 978–985, jun. 2009.

WELMAN, A.; BURGER, M. M.; HAGMANN, J. Structure and function of the C-terminal hypervariable region of K-Ras4B in plasma membrane targetting and transformation. **Oncogene**, v. 19, n. 40, p. 4582–4591, set. 2000.

WHITLATCH, A.; SCHICK, S. Thirdhand Smoke at Philip Morris. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 21, n. 12, p. 1680–1688, 19 nov. 2019.

WILKINSON, K. A.; HENLEY, J. M. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. **Biochemical Journal**, v. 428, n. 2, p. 133–145, 1 jun. 2010.

WOOTEN, M. W. et al. Nerve Growth Factor Stimulates Multisite Tyrosine Phosphorylation and Activation of the Atypical Protein Kinase C's via a src Kinase Pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 24, p. 8414–8427, 15 dez. 2001.

WU, J. C.; MERLINO, G.; FAUSTO, N. Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 2, p. 674–678, 18 jan. 1994.

XING, Y. et al. Crystal Structure of a Full-Length β-Catenin. **Structure**, v. 16, n. 3, p. 478–487, mar. 2008.

XU, L.; DENG, X. Tobacco-specific Nitrosamine 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone Induces Phosphorylation of μ- and m-Calpain in Association with Increased Secretion, Cell Migration, and Invasion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 51, p. 53683–53690, 17 dez. 2004.

XUE, J.; YANG, S.; SENG, S. Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. **Cancers**, v. 6, n. 2, p. 1138–1156, 14 maio 2014.

YALCIN, E.; DE LA MONTE, S. Tobacco nitrosamines as culprits in disease: mechanisms reviewed. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 107–120, mar. 2016.

YAMADA, K. M.; CUKIERMAN, E. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. **Cell**, v. 130, n. 4, p. 601–610, ago. 2007.

YAMAGUCHI, H.; CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 5, p. 642–652, maio 2007.

YUE, P. Y. K. et al. A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 15, n. 4, p. 427–433, abr. 2010.

ZHANG, H.; LUO, J. SUMO wrestling with Ras. **Small GTPases**, v. 7, n. 2, p. 39–46, 2 abr. 2016.

ZHANG, S. et al. Genotoxicity analysis of five particle matter toxicants from cigarette smoke based on γH2AX assay combined with Hill/Two-component model. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 131–140, mar. 2018.

ZHOU, Z. et al. SUMOylation and SENP3 regulate STAT3 activation in head and neck cancer. **Oncogene**, v. 35, n. 45, p. 5826–5838, nov. 2016.