



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEONARDO CAMPOS ZANELATTO

**“AÇÃO QUIMIOPROTETORA DO MICRONUTRIENTE
SELÊNIO EM CÉLULAS HepG2:
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE ESTRESSE
CELULAR INDUZIDO POR H₂O₂”**

Londrina
2013



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

LEONARDO CAMPOS ZANELATTO

**“AÇÃO QUIMIOPROTETORA DO MICRONUTRIENTE
SELÊNIO EM CÉLULAS HepG2:
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE ESTRESSE
CELULAR INDUZIDO POR H₂O₂”**

LEONARDO CAMPOS ZANELATTO

**“AÇÃO QUIMIOPROTETORA DO MICRONUTRIENTE SELÊNIO EM
CÉLULAS HepG2:
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE ESTRESSE CELULAR
INDUZIDO POR H₂O₂”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof.Dr. Mário Sérgio Mantovani.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Z28a Zanelatto, Leonardo Campos.
Ação quimioprotetora do micronutriente Selênio em células HepG2 :
avaliação da expressão de genes de estresse celular induzido por H₂O₂/
Leonardo Campos Zanelatto. – Londrina, 2013.
62 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) –
Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Células – Estresse oxidativo – Teses. 2. Selênio na nutrição humana – Teses.
3. Células – Proteção – Teses. 4. Células cancerosas – Genética – Expressão –
Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular. III. Título.

CDU 576.385.5

LEONARDO CAMPOS ZANELATTO

**“AÇÃO QUIMIOPROTETORA DO MICRONUTRIENTE SELÊNIO EM
CÉLULAS HepG2:
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE ESTRESSE CELULAR
INDUZIDO POR H₂O₂”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Fernanda Simões de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul -
UFMS

Londrina, 22 de janeiro de 2013.

*Dedico a Deus que me protege e me orienta diariamente.
Muito obrigado por mais essa graça recebida.
Dedico aos meus pais, pelo amor incondicional que me faz seguir em frente.
Nada disso seria possível sem o apoio de vocês.*

*"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir,
mas também sonhar; não apenas planejar,
mas também acreditar."
(Anatole France)*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por mais essa conquista. Ele que sempre me dá muito mais do que eu mereço. Sempre me surpreendendo e, dessa forma, me incentivando a sempre seguir em frente com força e coragem e mostrando que todo esforço vale a pena. Muito obrigado Deus, não apenas por mais essa etapa concluída, mas por tudo que tenho na minha vida!

Muito obrigada ao meu orientador, Mário Sérgio Mantovani, por aceitar me orientar desde 2009 na graduação e agora passando pelo mestrado. Obrigado por toda dedicação e paciência.

Muito obrigado à Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e a todos os profissionais: professora Ana Lúcia, Sueli muito obrigado por ter me recebido tão bem e por sempre atender a todos com muito carinho.

Muito obrigado à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida nesses dois anos de mestrado.

Aos meus pais, quero agradecer sinceramente por tudo! Por todo apoio, todo carinho, toda dedicação que tenho recebido desde sempre! Não tenho a menor dúvida de que vocês são os melhores pais do mundo e agradeço todos os dias por ser um filho de muita sorte! Amo vocês incondicionalmente e dedico esse trabalho a vocês. Sem o apoio de vocês com certeza eu não teria chegado até aqui.

A Nathália, meu amor, muito obrigado por ter me apoiado em todos os momentos, sempre me escutando e me aconselhando. Muito obrigado por toda paciência e por todo carinho e amor que tem me dado sempre! Obrigado por escutar meus desabafos e sempre conseguir colocar um sorriso no meu rosto. Te amo muito!

Dani: Muito obrigado pela amizade, pelos conselhos, pelas risadas e por toda ajuda nesse trabalho. Agradeço imensamente por tudo!

Meninas do SAG: Li e Tati. Muito obrigado pelos momentos de descontração, pelas conversas durante o almoço e durante os cafés. Sempre com mensagens sábias para passar para nós. Muito obrigado pela companhia e amizade!

Meus sinceros agradecimentos a todos!

ZANELATTO, Leonardo Campos. **Ação quimioprotetora do micronutriente Selênio em células HepG2: avaliação da expressão de genes de estresse celular induzido por H₂O₂**. 62f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.

RESUMO

Dentre diferentes agentes analisados quanto ao potencial quimioprotetor para o câncer, os componentes da dieta são os mais bem avaliados. Tais estudos apresentam evidências de que os alimentos fornecem substâncias bioativas que podem alterar a expressão gênica. A atividade antioxidante do selênio parece ser responsável pela sua eficácia no tratamento de doenças que se correlacionam ao estresse celular. Devido a tais aspectos, têm crescido o interesse pela investigação dos papéis de diferentes compostos de selênio como agente terapêutico em diversas doenças crônicas degenerativas, tais como os cânceres. O presente estudo avaliou a ação moduladora/quimioprotetora da L-(+)-Selenometionina (SeMet) em células HepG2 frente ao estresse celular induzido pelo H₂O₂ por meio do ensaio MTT, do ensaio do cometa e da expressão gênica por RT-qPCR de genes relacionado ao estresse oxidativo (*GPX1*, *SOD*, *CATALASE*) de retículo endoplasmático (*GADD153*, *ERN1*, *TRAF2*) e de apoptose (*CASP9*). No ensaio MTT, a SeMet a 50, 100, 250 e 500 ng/mL apresentaram uma ação citoprotetora contra os danos causados por H₂O₂, enquanto que as concentrações mais elevadas (1000 e 2000 ng/mL) aumentaram o efeito citotóxico causado pelo H₂O₂. No ensaio do cometa, foi verificado que a concentração de 50 ng/mL no tratamento associado foi capaz de diminuir o efeito genotóxico provocado pelo peróxido de hidrogênio, porém o mesmo não ocorreu na concentração de 500 ng/mL. No RT-qPCR, de forma semelhante aos resultados encontrados no cometa, observou-se que a SeMet a 50 ng/mL modulou os genes testados, mostrando um efeito antioxidante e antiapoptótico. Em contrapartida, na concentração de 500 ng/mL a SeMet foi incapaz de modular os genes para a quimioproteção, por vezes perfazendo um efeito tóxico às células. Esses resultados sugerem que a SeMet é capaz de modular positivamente os genes de estresse oxidativo e de retículo endoplasmático, provocando um efeito quimioprotetor e antioxidante frente ao estresse causado pelo H₂O₂ e pode ser uma alternativa na medicina preventiva.

Palavras-chave: SeMet. Quimioprotetor. RT-qPCR. Estresse de retículo

ZANELATTO, Leonardo Campos. **Chemoprotective action of the micronutrient selenium in HepG2 cells:** gene expression evaluation of cellular stress induced by H₂O₂. 62 p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.

ABSTRACT

Among different agents analyzed for chemoprotective potential for cancer, the components of diet are best evaluated. These studies show evidence that foods provide bioactive compounds that can alter gene expression. The antioxidant activity of selenium appears to be responsible for its effectiveness in treating diseases that have been correlated with the cellular stress. Due to these aspects, have increased interest in the investigation of the roles of different selenium compounds as a therapeutic agent in many chronic degenerative diseases, such as cancers. The present study evaluated the modulating/chemoprotective action of L-(+)-Selenomethionine (SeMet) in HepG2 cells against the cellular stress induced by H₂O₂ through the MTT assay, the comet assay and RT-qPCR of genes related to oxidative stress (GPX1, SOD, catalase), endoplasmic reticulum (GADD153, ERN1, TRAF2) and apoptosis (CASP9). In the MTT assay, the SeMet at 50, 100, 250 and 500 ng/mL showed a cytoprotective action against the damage caused by H₂O₂, whereas higher concentrations (1000 and 2000 ng/mL) increased the cytotoxic effect caused by H₂O₂. In the comet assay, it was found that the concentration of 50 ng/mL was able to reduce the genotoxic effect caused by peroxide in the associated treatment, but this did not occur in the concentration of 500 ng/mL. In RT-qPCR, similar to results found in comet, it was observed that the SeMet at 50 ng/mL was able to modulate the genes tested, showing an antiapoptotic and antioxidant effect. In contrast, SeMet at 500 ng/mL was incapable of modulating the genes, sometimes giving a toxic effect on cells. These results suggest that SeMet, although possess a short therapeutic window, is able to positively modulate genes of oxidative stress and endoplasmic reticulum, causing a chemoprotective and antioxidant effect against the stress caused by H₂O₂ and could be an alternative in preventive medicine.

Keywords: SeMet. Chemoprotective. RT-qPCR. ER stress

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1** – Estrutura molecular da metionina e selenometionina.....18
- Figura 2** - Metabolismo do selênio em mamíferos.....19

ARTIGO

- Figura 1** – Células HepG2 em Microscopia Óptica (100X).....29
- Figura 2** - Etapas do Ensaio do Cometa31
- Figura 3** – Ensaio de citotoxicidade MTT34
- Figura 4** – Ensaio do cometa.....35
- Figura 5** – Tail moment analisado pelo programa CometScore©36
- Figura 6** – Expressão relativa do gene Glutathiona peroxidase (*GPX1*).....37
- Figura 7** – Expressão relativa do gene Superóxido dismutase (*SOD1*)38
- Figura 8** – Expressão relativa do gene *CATALASE*38
- Figura 9** – Expressão relativa do gene *GADD153*39
- Figura 10** – Expressão relativa do gene *ERN1*40
- Figura 11** – Expressão relativa do gene *TRAF2*.....41
- Figura 12** – Expressão relativa do gene *CASP9*.....42

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Conteúdo de selênio em alimentos considerados fonte.....16

ARTIGO

Tabela 1 – Lista de primers que foram utilizados no estudo 32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	NUTRIGENÔMICA	14
1.2	O SELÊNIO	14
1.3	SELENOMETIONINA E SELENOPROTEÍNAS	17
1.4	O SELÊNIO E SUA AÇÃO QUIMIOPREVENTIVA E ANTITUMORAL	20
1.5	O RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (ER), O SELÊNIO E SEUS PAPÉIS FRENTE AO ESTRESSE CELULAR.....	21
1.6	ENSAIOS BIOLÓGICOS	22
1.6.1	Ensaio de Citotoxicidade (MTT)	22
1.6.2	Ensaio do Cometa	23
1.6.3	Expressão Gênica - PCR em Tempo-Real.....	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	ARTIGO	26
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO

A área de genética toxicológica visa o desenvolvimento e a aplicação de testes de mutagenicidade para identificação de substâncias prejudiciais à saúde e de riscos para populações expostas, ocupacionalmente ou não e, portanto, com maior risco para o aparecimento de doenças degenerativas. Diferentes métodos, citogenéticos e moleculares, são aplicados na identificação de grupos de risco ou mesmo de indivíduos mais susceptíveis quanto ao acúmulo de mutações no DNA.

A literatura indica que a grande maioria dos tumores humanos é causada por agentes químicos ligados ao estilo de vida (fumo, bebida, sedentarismo) e à dieta. Desde então, surgiram importantes avanços sobre os mecanismos pelos quais muitos desses carcinógenos químicos levam ao surgimento de células neoplásicas em seres humanos, possibilitando, assim, as bases para a prevenção e tratamento de diversos tipos de tumores (DOLL & PETO, 1981).

A carcinogênese está diretamente relacionada com o prolongado acúmulo de injúrias em diferentes níveis biológicos, que alteram as células tanto do ponto de vista genético quanto bioquímico. Uma nova estratégia para reduzir a sua incidência relaciona-se a programas de intervenção voltados para a dieta e nutrição, bem como para o desenvolvimento de produtos farmacológicos que poderiam funcionar como quimiopreventivos (DA SILVA et al., 2003). Desta forma, a prevenção contra o câncer pode ser alcançada evitando substâncias carcinogênicas/mutagênicas e favorecendo a utilização de fatores protetores.

O desenvolvimento de estratégias preventivas contra doenças crônicas tem contribuído para o aumento da expectativa e qualidade de vida da população, sendo a prevenção amplamente utilizada (DE FLORA & FERGUSON, 2005). Mais de 500 agentes químicos estão sendo analisados em relação à sua atuação na quimioprevenção do câncer e cerca de 30 classes de substâncias químicas diferentes apresentam esse potencial (FERGUSON, 1994; DE FLORA & FERGUSON, 2005).

Dentre os agentes analisados quanto ao potencial quimioprotetor para o câncer, os componentes da dieta têm sido os mais bem avaliados, visto que o consumo adequado de determinados alimentos tem a propriedade de proteger o DNA e, conseqüentemente, evitar o desenvolvimento de diversos cânceres (POOL-ZOBEL et al., 2002). Nesse sentido, estudos epidemiológicos demonstram associações estatisticamente significativas entre dieta e estilo de vida, com aumento da incidência e severidade de doenças crônicas (KOLONEL et al., 2004).

Por razões metabólicas, ambientais e/ou genéticas, os indivíduos apresentam diferentes respostas a nutrientes e alimentos, e isso se reflete em diferentes níveis de benefícios e riscos à ingestão dos mesmos. Assim, a ingestão particular de um nutriente pode oferecer risco a alguns indivíduos, mas não a outros, ou um benefício a alguns indivíduos e não a outros (KAPUT et al., 2007b). Dessa forma, entende-se a necessidade de se avaliar diversos micronutrientes e a sua interação com o genoma celular.

1.1 NUTRIGENÔMICA

Evidências sugerem que diferenças genéticas entre indivíduos sejam responsáveis pelas variadas respostas ao ambiente, em particular a dieta, a qual é um dos maiores e mais constantes fatores a que os genes estão expostos durante a vida (FOGG-JONHSON & KAPUT, 2003).

Nesse contexto surgiu a ciência nutrigenômica, integrando duas áreas de pesquisa antes não correlatas: a genética e a nutrição. A abordagem mais conhecida da nutrigenômica é o estudo das associações dieta - gene - fenótipo, a qual utiliza métodos epidemiológicos e de genética molecular para encontrar associações estatísticas entre genes, alimentos e características biológicas, incluindo doenças (KAPUT & RODRIGUES, 2004).

Os resultados desses estudos trazem informação e conhecimento sobre as influências ambientais na manutenção da saúde e no desenvolvimento e evolução da doença, e como os alimentos podem alterar a expressão molecular da informação genética em cada indivíduo (KAPUT et al., 2007b; FOGG-JONHSON & KAPUT, 2003) e/ou em grupos populacionais.

Assim sendo, o objetivo da nutrigenômica é personalizar a dieta e contribuir na prevenção de doenças, ampliando os conhecimentos moleculares e científicos para o mercado consumidor. Assim, por meio da análise da expressão genética, *single nucleotide polymorphism* (SNP), haplótipos, resultados bioquímicos e fisiológicos, pesquisadores têm alcançado essa meta, verificando respostas individuais e de grupos que atendem de forma muito particular a diferentes dietas (FOGG-JONHSON & KAPUT, 2003).

1.2 O SELÊNIO

O elemento-traço Selênio (Se) foi descoberto em 1817 pelo químico suíço Berzelius, que o nomeou em homenagem à deusa da lua, *Selena*, da Grécia. Hoje, quase 200

anos depois, o Se está bem estabelecido como um micronutriente essencial de fundamental importância para a saúde humana (PAPP et al., 2007). Esse fato é cada vez mais evidente em novas pesquisas que demonstram um papel até então não-aparente para este elemento em áreas importantes da biologia humana (RAYMAN, 2000).

O Se compartilha propriedades físicas e químicas com o enxofre (S). Tal similaridade permite a substituição do enxofre (S) por selênio (Se) em diversas reações químicas que ocorrem nos sistemas biológicos. Por outro lado, as diferenças nas propriedades físicas e químicas entre esses elementos constituem a base de seus respectivos papéis biológicos (BARBOSA, 2006).

Compostos de selênio têm a capacidade do “ciclo redox” são metabolizados aos estados mais reduzidos, enquanto compostos de enxofre tornam-se mais oxidados. Estas diferenças são propostas para explicar porque compostos de selênio são antioxidantes mais eficazes e agentes câncer-preventivos mais potentes que seus análogos de enxofre (IP & GANTHER, 1992; WHANGER, 2004; PAPP et al., 2007). Logo, esta propriedade torna o selênio capaz de reduzir dissulfetos e sulfóxidos, sendo esta uma importante característica biológica, já que estes compostos atuam diretamente na atividade de enzimas de detoxificação, como a glutatona-peroxidase (GPx), tiorredoxina-redutase (TrxR), entre outras.

O exemplo mais conhecido desta função redox é a redução de lipídios prejudiciais e hidroperóxidos de fosfolípidios a produtos não tóxicos (água e álcoois) pela família das glutatona-peroxidases selênio-dependentes (DIPLOCK, 1994; SUNDE, 1997; ALLAN et al., 1999; RAYMAN, 2000). Esta função ajuda a manter a integridade da membrana e reduz a probabilidade de propagação do dano oxidativo a biomoléculas como lipídios, lipoproteínas e DNA, evitando o aumento do risco associado a doenças como a aterosclerose e o câncer (DIPLOCK, 1994; NÉVE, 1996; RAYMAN, 2000).

O aporte nutricional do selênio dá-se pelo consumo das plantas, que absorvem o elemento na sua forma inorgânica selenato (SeO_4^{-2}) e selenito (SeO_3^{-2}) do solo (MUSHAK, 1985; SURAI, 2006).

Nas plantas, o selênio é convertido em formas orgânicas, como os aminoácidos selenometionina (SeMet) e selenocisteína (Sec). SeMet é o seleno-composto principal em grãos de cereais, legumes e soja. Embora ele sirva como um importante precursor para a síntese de Sec em animais, metabólitos adicionais de selênio também estão disponíveis para este processo (WHANGER, 2002; PAPP et al., 2007).

O Se é principalmente encontrado em oleaginosas, como a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa L.*), cereais integrais, ostras e crustáceos, carne suína, aves, carne bovina e de peixes. Na Tabela 1, apresentam-se os alimentos que são fontes de selênio e a quantidade presente em cada um deles (em ug) por meio da medida utilizada pela população, segundo Ferreira e colaboradores (2002).

Tabela 1 - Conteúdo de selênio em alimentos considerados fonte (em medida usual utilizada).

ALIMENTO	MEDIDA USUAL	QUANTIDADE (g)	SELÊNIO (µg)
Grupo das oleaginosas			
Cast.-do-Brasil	2 unidades	8	153,4
Soja cozida	1 ½ colher de Sopa	36	6,9
Soja assada	1 ½ colher de sopa	36	2,6
Lentilha cozida	5 colheres de sopa	120	3,6
Grupo das carnes			
Salmão cozido	2 filés	200	114,4
Atum em óleo	2 ½ colher de sopa	112,5	67,6
Bacalhau cozido	1 pedaço	135	50,8
Camarão no Vapor	13 unidades	104	39,6
Fígado cozido	1 unidade	100	36,1
Peito de Peru assado	1 filé	100	29,1
Peito de frango	1 unidade	100	27,6
Grupo de leite, queijo e iogurte			
Iogurte desnatado	1 ½ copo	330	11,88
Queijo mussarela	3 fatias	50	8,5
Leite desnatado	1 copo	270	6,75
Leite integral	1 xícara de chá	182	6,7
Iogurte Integral	1 copo	165	3,6
Grupo dos carboidratos			
Macarrão cozido	3 ½ colheres de sopa	105	26,4
Arroz branco cozido	4 colheres de sopa	125	11,6

Fonte: Adaptado de Ferreira et al., (2002).

Os níveis teciduais de selênio são diretamente influenciados pela dieta, que sofrem variações segundo as diferenças geográficas na disponibilidade do selênio no solo (BROWN & ARTHUR, 2001). Focos de deficiência de Se foram identificados em várias regiões do mundo, assim como no Brasil (MORAES et al., 1999). De acordo com estudos recentes, muitos países na Europa e outras partes do mundo ainda têm uma ingestão de selênio abaixo do que é recomendado por agências de saúde reguladoras (COMBS, 2001; RAYMAN, 2005; PAPP et al., 2007).

A dosagem nutricional do selênio depende da viabilidade regional e dos tipos de alimentos consumidos. Devido a fatores geográficos, socioeconômicos, culturais e interindividuais, e principalmente pelo fato do selênio ser um mineral que possui uma estreita janela terapêutica, não há um consenso quanto à dose diária necessária ideal.

A dose de referência (RfD) do selênio (Se) para um humano adulto de 70 kg juntando-se todas as fontes nutricionais (dieta + suplementação) é de 350 ug/dia, correspondendo à 5 ug de Se/kg de massa corpórea/dia (SCHRAUZER, 2000). Desta forma, não existe dúvida de que quantidades adequadas de selênio são necessárias para a saúde humana ideal. Muitos de seus papéis fisiológicos são atribuídos diretamente à sua presença dentro das selenoproteínas. Deficiência de selênio moderada tem sido associada a várias condições, tais como aumento do risco de câncer, infecção, infertilidade masculina, diminuição da função imune e da tireóide, além de várias condições neurológicas, incluindo Alzheimer e a doença de Parkinson (RAYMAN, 2000).

1.3 SELENOMETIONINA E SELENOPROTEÍNAS

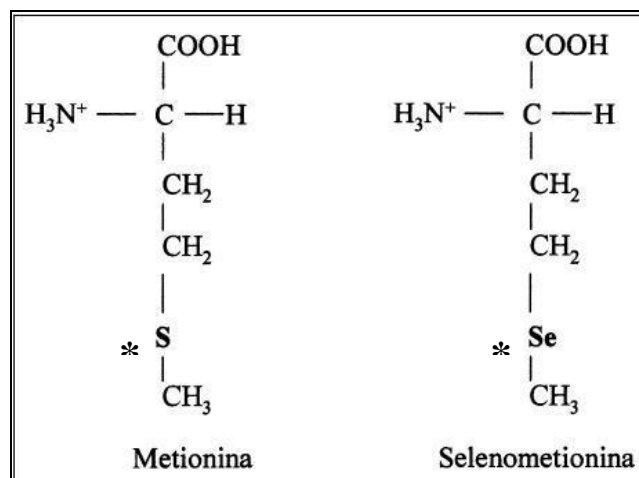
O selênio é conhecido principalmente por sua atividade antioxidante e, em aspectos terapêuticos, por suas propriedades quimio preventivas, antiinflamatórias e antivirais (RAYMAN, 2000).

As funções fisiológicas do Se são resultado da existência de selenoproteínas, nas quais está presente o aminoácido selenocisteína (Sec) e/ou a selenometionina. Tradicionalmente, pensava-se que havia cerca de 20 aminoácidos. No entanto, a descoberta de selenoproteínas levou à definição de 21 aminoácidos, incluindo a selenocisteína (Sec). Este aminoácido é muito semelhante à cisteína, mas incorpora selênio ao invés de enxofre. O selênio foi primeiramente demonstrado como o componente essencial da glutathione-peroxidase (GPx) e, em seguida, foi encontrado em 25 diferentes proteínas de mamíferos (STADTMAN, 2000; HATFIELD & GALDYSHEV, 2002; KRYUKOV et al., 2003). O

aminoácido selenocisteína é incorporado à sequência de aminoácidos das selenoproteínas durante a tradução, sendo reconhecido por meio do códon UGA na região codificadora do RNA mensageiro (Renan) (HATFIELD & GALDYSHEV, 2002). A incorporação do selênio requer estruturas específicas na região 3' não-traduzida nos Renan das selenoproteínas. Dessa forma, a expressão de selenoproteínas depende de dois importantes fatores: o consumo alimentar de selênio e fatores genéticos (BERRY, 2005).

Devido ao L-isômero de selenometionina (Semet) ser uma das principais formas naturais de selênio encontradas nos alimentos, a L-(+)-SeMet sintética ou fontes de alimento enriquecidas das mesmas, como selênio de levedura, são formas complementares apropriadas de selênio para os humanos. Logo, SeMet pode ser metabolizada diretamente para formas reativas de selênio ou armazenadas no lugar da metionina em proteínas do corpo (SCHRAUZER, 2000).

Figura 1 - Estrutura molecular da metionina e selenometionina, mostrando a localização dos átomos de enxofre e selênio (*). A substituição do átomo de selênio por enxofre na estrutura molecular da selenocisteína ocorre de modo similar ao observado entre metionina e selenometionina.

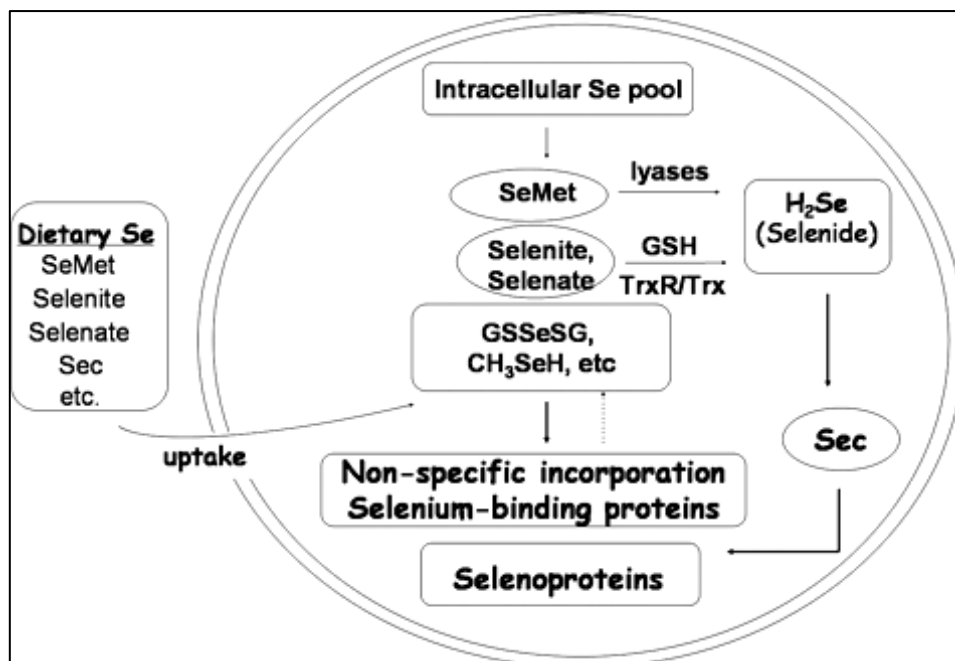


Fonte: Gierus (2007).

Em razão da semelhança, o organismo converte o Se principalmente em Semete o incorpora em proteínas no lugar da metionina (Met), porque o tRNA-Met não faz distinção entre Met e Semet. A substituição da Met por Semet via de regra não altera significativamente a estrutura da proteína, mas pode influenciar a atividade das enzimas. Semet substituir Met nas proximidades do sítio ativo (SCHRAUZER, 2000). Geralmente, a atividade enzimática torna-se aumentada, como no caso da ação antioxidante da enzima glutatona-peroxidase (GPx).

O selênio é especificamente incorporado em proteínas na forma de selenocisteína (Sec) e não especificamente como selenometionina (SeMet) no lugar de metionina, que são utilizados para a síntese de selenoproteínas incluindo a glutatona-peroxidase, tioredoxina-redutase (TrxR), selenoproteína P e outras enzimas (RIKIISHI, 2007).

Figura 2 - Metabolismo do selênio em mamíferos. (Se: selênio; GSS e SG: seleno diglutatona; CH₃SeH: metilselenol; H₂Se: seleneto; SeMet: selenometionina; Sec: selenocisteína; GSH: glutatona; TrxR: tioredoxina-redutase; Trx: tioredoxina).



Fonte: Papp et al., (2007).

Estas enzimas contribuem para a atividade antioxidante, além de atuarem no armazenamento, metabolismo e transporte do Selênio (PAPP et al., 2007). No entanto, ainda não é certo se isso ocorre in vivo, visto que um estudo recente não conseguiu mostrar um efeito protetor com proteínas do plasma humano (HONDAL et al., 1999). Porém, outro estudo demonstra que a selenometionina também tem propriedades radio protetoras e protege contra danos na pele induzidos por luz UV em ratos (SHIMAZU & TAPPEL, 1964; BURKE et al., 1992; SCHRAUZER, 2000).

Desta forma, sendo o Se um micro nutriente envolvido na manutenção da homeostase celular, ele atua nas células diretamente ou associando-se a inúmeras selenoproteínas e estas enzimas por sua vez estão relacionadas à proteção celular contra inúmeros agentes exógenos ou endógenos causadores de estresse, atuando, principalmente, como agente antioxidante e de reparo de lesões no DNA (COMBS & GRAY, 1998).

1.4 O SELÊNIO E SUA AÇÃO QUIMIOPREVENTIVA E ANTITUMORAL

A atividade anticarcinogênica do selênio foi relatada 12 anos após sua descoberta como elemento-traço essencial, relacionando-se a deficiência do Se com o aumento do desenvolvimento de diversos cânceres (BECK et al., 1998; BECK et al., 2003).

A atividade quimioprotetora do Se contra diferentes neoplasias parece ser oriunda de variados mecanismos. Dentre estes, cita-se que em doses terapêuticas tais efeitos parecem estar associados ao fato de o Se ser componente de enzimas antioxidantes como a glutathiona-peroxidase (GPx) e a superóxido-dismutase (SOD) (BARBOSA, 2006).

O selênio exerce suas funções biológicas em grande parte pela sua presença nas selenoproteínas. No entanto, alguns compostos de baixo peso molecular, como a selenometionina, são relatados como agentes antitumorígenicos eficientes em estudos em animais e em modelos *in vitro* (GANTHER, 1999; IP et al., 2000; WHANGER, 2004). Embora as funções de muitas selenoproteínas ainda não estejam esclarecidas, pelo menos três delas, a tioredoxina-redutase-1 (TrxR1), TrxR2 e a glutathiona-peroxidase-4 (GPx4), são essenciais para a vida, como demonstrado em modelos de camundongos *knockout* (PAPP et al., 2007).

As selenoproteínas são também conhecidas por apresentarem papel importante no controle de processos como a divisão celular, a detoxificação, o sistema auto-imune e a inativação de oncogenes (RAMAKISHNAN et al., 1996; COMBS & GRAY, 1998; FLEMING et al., 2001).

Outro evento de atuação anticarcinogênica relacionada ao Se é a apoptose (VIARO et al., 2001). Como anteriormente descrito, o Se é componente essencial do sítio ativo de diversas enzimas de atividade óxido-redutora, em especial as glutathionas (HESKETH, 2009). No entanto, estas enzimas apresentam diversas funções celulares em adição às suas propriedades antioxidantes, participando da transdução de sinais e na expressão gênica relacionada ao processo de apoptose (LARSSON et al., 1983; ARRIGO, 1999; SIES, 1999; VOEHRINGER, 1999; TEW, 2001).

Por outro lado, sabe-se também que a citotoxicidade de altas doses de selênio, via produção de radicais livres e oxidação de tióis, é responsável por grande parte de seus efeitos como agente anticarcinogênico (FLEMING et al., 2001; SPALHOZ et al., 2001).

Apesar das descrições anteriores, os mecanismos moleculares precisos que fundamentamos efeitos do selênio em condições fisiológicas e patológicas permanecem

desconhecidos (PAPP et al., 2007). Por isso torna-se importante mais estudos que permitam uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de quimioprevenção e anticarcinogênese.

1.5 O RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (ER), O SELÊNIO E SEUS PAPÉIS FRENTE AO ESTRESSE CELULAR

O retículo endoplasmático (*endoplasmic reticulum*, ER) é um das maiores organelas celulares, sendo que suas membranas constituem mais da metade do total das membranas de uma célula. O lúmen do ER, o espaço interno, representa mais de 10% do volume celular (PAHL, 1999).

Aproximadamente um terço de todas as proteínas celulares são translocadas para o lúmen do ER, onde modificações pós-traducionais, dobramentos e oligomerizações ocorrem (KAUFMAN, 1999).

Dada a importância dessa organela, sua função adequada é essencial para a célula. Portanto, parece natural que os mecanismos evoluíram para sinalizar qualquer distúrbio na função do retículo (PAHL, 1999).

O ER é extremamente sensível a alterações na homeostase, onde, sobre uma variedade de estímulos diferentes, os sinais são transduzidos do ER para o citoplasma e o núcleo. Esses sinais, por sua vez, resultam em adaptação para a sobrevivência ou a indução de apoptose (KAUFMAN, 1999).

A resposta imediata ocorre no aparelho de tradução, enquanto mudanças na expressão gênica promovem adaptação à longo prazo ou a morte celular por apoptose (KAUFMAN, 1999). A via de sinalização intracelular que participa desta regulação foi denominada “UPR” (*unfolded protein response*) (RON & WALTER, 2007).

Um desequilíbrio (chamado de estresse ER) entre a carga de proteínas desdobradas que entram no ER e a capacidade da maquinaria celular que lida com esta carga define três principais respostas em movimento, das quais as duas primeiras são retificadoras. Primeiramente, há uma redução na carga de proteína que entra no ER, uma adaptação transitória que é conseguida pela redução da síntese de proteínas translocadas para o ER. Posteriormente, há um aumento na capacidade do ER em lidar com proteínas desdobradas, que é uma adaptação à longo prazo que envolve ativação transcricional de genes-alvo UPR, incluindo aqueles que funcionam como parte da maquinaria de dobramento de proteínas do ER. Se a homeostase não puder ser reestabelecida, um

terceiro mecanismo, a morte celular, é disparado, supostamente para proteger o organismo a partir de células que exibem proteínas deformadas (RON & WALTER, 2007).

A indução de danos oxidativos por agentes endógenos ou exógenos ou uma desregulação da via UPR podem levar à uma condição adversa, em que são produzidas e exportadas proteínas alteradas (*unfolded-proteins*), o que afeta os processos fisiológicos, principalmente no caso de proteínas regulatórias (COUX et al., 1996; HOCHSTRASSER, 1996).

Falhas no funcionamento da UPR têm sido relacionadas a diversas doenças, principalmente as neurodegenerativas (doença de Parkinson), síndromes genéticas (fibrose cística) e o surgimento de diversos tumores (PAUL, 2008). Desta forma, torna-se importante a busca de agentes quimioprotetores que tenham ação na modulação de genes da via UPR visando a medicina preventiva.

Com relação à ação do selênio em genes de estresse de retículo endoplasmático (ação quimioprotetora/moduladora) não há nenhum dado na literatura, o que indica o pioneirismo desse estudo tendo em vista o papel dessa organela em inúmeros processos celulares e a importância dessa via na sobrevivência celular. Dessa forma, torna-se importante entender os mecanismos envolvidos em células humanas (HepG2) quando estas estão submetidas a tratamentos com selênio, para que seja possível compreender a atuação desse micronutriente quanto ao seu potencial quimioprotetor e antioxidante.

1.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

1.6.1 Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

Os testes de citotoxicidade são importantes para definir os limites de concentração a serem utilizados em experimentos de indução de mutação e apoptose (EISENBRAND et al., 2002).

O ensaio MTT, proposto por Mossmann em 1983, é um dos mais empregados e um dos mais sensíveis testes para a detecção de citotoxicidade após a exposição das células a substâncias tóxicas (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). Testes colorimétricos como este, apresentam vantagens como sua rapidez e precisão (MOSSMANN, 1983).

O método envolve a conversão, pelas células, do MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], um sal tetrazolium, em um formazan de coloração roxa (MOSSMANN, 1983).

Tal reação geralmente é atribuída à atividade das mitocôndrias, porém o exato mecanismo da redução do MTT ainda não está bem esclarecido (VELLONEN et al., 2004). Como o produto formado é impermeável às membranas celulares, este se acumula nas células vivas. Após a exposição das células ao composto teste e ao período de incubação das mesmas em contato com o MTT, as amostras passam pelo leitor de microplacas, onde são medidas espectrofotometricamente em 550 nm.

1.6.2 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Ele não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo ensaio do cometa são passíveis de correção. Assim sendo, o ensaio do cometa pode também ser utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite interferir a fidedignidade do processo de reparo. Uma vez que danos no DNA são freqüentemente célula e tecido específicos, uma metodologia como o ensaio do cometa que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos (GONTIJO & TICE, 2003).

1.6.3 Expressão Gênica- PCR em Tempo Real

A PCR em tempo real representa um salto tecnológico que abriu novas e poderosas aplicações para os pesquisadores de todo o mundo. Isto é, em parte, devido à enorme sensibilidade da PCR associada à precisão oferecida pelo monitoramento em “tempo real” dos produtos de PCR assim que são gerados (VALASEK& REPA, 2005).

A maior limitação das DNA-polimerases (e da PCR) é que geralmente usam DNA como molde. Elas não podem, por exemplo, amplificar RNA de modo similar. Este problema pode ser superado por outra enzima, a transcriptase reversa, que gera DNA complementar (ou cDNA) a partir de um molde de RNA (VALASEK& REPA, 2005). Ensaio baseado em *Reverse Transcription* (RT)-PCR atualmente são os métodos mais

comuns para caracterização e confirmação de padrões de expressão gênica e para comparar níveis gênicos em diferentes populações (MOCELLIN et al., 2003).

Muitos eventos celulares, sobre a sobrevivência, crescimento e diferenciação são refletidas nos padrões alterados da expressão gênica e a capacidade de quantificar os níveis de transcrição de genes específicos tem sido essencial para qualquer investigação sobre a função do gene (ZAMORANO et al., 1996).

A quantificação relativa determina as mudanças nos níveis de RNAm de um gene frente à várias amostras, e é expressa em relação aos níveis de um controle interno ou normalizador, o qual frequentemente é um gene constitutivo. Consequentemente, a quantificação relativa não requer padrões de concentrações conhecidas. É fundamentada nos níveis de expressão de um gene em relação ao gene constitutivo, sendo indicada para a investigação fisiológica de alterações nos padrões de expressão gênica. Para calcular a expressão dos genes, o valor do *cycle threshold* (Ct) do gene constitutivo será comparado com o valor do gene alvo.

Os usos típicos da PCR em tempo real são: detecção de patógenos, análise de expressão gênica, polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), análise de aberrações cromossômicas e mais recentemente a detecção de proteínas pela imuno PCR em tempo real.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a possível ação quimioprotetora/moduladora do micronutriente Selênio (L-(+)-Selenometionina) em células HepG2 submetidas à injúria com H₂O₂.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito citoprotetora L-(+)-Selenometionina em tratamento por 24 horas, e também seu efeito associado com H₂O₂ em células de carcinoma hepatocelular (HepG2), por meio do ensaio de citotoxicidade MTT;
- b) Avaliar o efeito genotóxico (danos ao DNA) e antígenotóxico da L-(+)-Selenometionina associada ao peróxido de hidrogênio pelo teste do cometa;
- c) Avaliar a expressão por PCR em tempo-real de genes de estresse oxidativo (*GPXI*, *CATALASE*, *SOD1*), de estresse de retículo endoplasmático (*GADD153*, *ERN1*, *TRAF2*) e de apoptose (*CASP9*) induzidos por H₂O₂ em células HepG2 tratadas com L-(+)-Selenometionina.

3 ARTIGO

Ação quimioprotetora do micronutriente Selênio em células HepG2 na avaliação da expressão de genes de estresse celular induzido por H₂O₂

Chemoprotective action of the micronutrient selenium in HepG2 cells in the evaluation of gene expression of cellular stress induced by H₂O₂

Artigo a ser submetido ao periódico *Cell Biology and Toxicology*

Ação quimioprotetora do micronutriente Selênio em células HepG2 na avaliação da expressão de genes de estresse celular induzido por H₂O₂

Zanelatto, LC^{1*}; Sartori, D¹; Ribeiro, LR²; Mantovani, MS¹

RESUMO

Dentre diferentes agentes analisados quanto ao potencial quimioprotetor para o câncer, os componentes da dieta são os mais bem avaliados. Tais estudos apresentam evidências de que os alimentos fornecem substâncias bioativas que podem alterar a expressão gênica. A atividade antioxidante do selênio parece ser responsável pela sua eficácia no tratamento de doenças que se correlacionam ao estresse celular. Devido a tais aspectos, têm crescido o interesse pela investigação dos papéis de diferentes compostos de selênio como agente terapêutico em diversas doenças crônicas degenerativas, tais como os cânceres. O presente estudo avaliou a ação moduladora/quimioprotetora da L-(+)-Selenometionina (SeMet) em células HepG2 frente ao estresse celular induzido pelo H₂O₂ por meio do ensaio MTT, do ensaio do cometa e da expressão gênica por RT-qPCR de genes relacionado ao estresse oxidativo (*GPX1*, *SOD*, *CATALASE*) de retículo endoplasmático (*GADD153*, *ERN1*, *TRAF2*) e de apoptose (*CASP9*). No ensaio MTT, a SeMet a 50, 100, 250 e 500 ng/mL apresentaram uma ação citoprotetora contra os danos causados por H₂O₂, enquanto que as concentrações mais elevadas (1000 e 2000 ng/mL) aumentaram o efeito citotóxico causado pelo H₂O₂. No ensaio do cometa, foi verificado que a concentração de 50 ng/mL no tratamento associado foi capaz de diminuir o efeito genotóxico provocado pelo peróxido de hidrogênio, porém o mesmo não ocorreu na concentração de 500 ng/mL. No RT-qPCR, de forma semelhante aos resultados encontrados no cometa, observou-se que a SeMet a 50 ng/mL modulou os genes testados, mostrando um efeito antioxidante e antiapoptótico. Em contrapartida, na concentração de 500 ng/mL a SeMet foi incapaz de modular os genes para a quimioproteção,

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

² Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

* Autor correspondente: Departamento de Biologia Geral – CCB. Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário

P.O. Box 6001, Londrina, Paraná, Brazil.

CEP: 86051-990

e-mail: lczanelatto@yahoo.com.br

Phone: 55 43 3371-4977

por vezes perfazendo um efeito tóxico às células. Esses resultados sugerem que a SeMet é capaz de modular positivamente os genes de estresse oxidativo e de retículo endoplasmático, provocando um efeito quimioprotetor e antioxidante frente ao estresse causado pelo H₂O₂ e pode ser uma alternativa na medicina preventiva.

Palavras-chave: SeMet. Quimioprotetor. RT-qPCR. Estresse de retículo

1 INTRODUÇÃO

O retículo endoplasmático (*endoplasmic reticulum*, ER) é uma das maiores organelas celulares, sendo que suas membranas constituem mais da metade total das membranas de uma célula. O lúmen do ER representa mais de 10% do volume celular (PAHL, 1999).

Aproximadamente um terço de todas as proteínas celulares são translocadas para o lúmen do ER, onde modificações pós-traducionais, dobramentos e oligomerizações ocorrem (KAUFMAN, 1999). Dada a importância dessa organela, sua função adequada é essencial para a sobrevivência da célula. Portanto, parece natural que os mecanismos evoluíram para sinalizar qualquer distúrbio na função do retículo (PAHL, 1999).

O ER é extremamente sensível a alterações na homeostase, onde, sobre uma variedade de estímulos diferentes, os sinais são transduzidos do ER para o citoplasma e o núcleo para eventualmente resultar em adaptação para a sobrevivência ou a indução de apoptose (KAUFMAN, 1999). A resposta imediata ocorre no aparelho de tradução, enquanto que mudanças na expressão gênica promovem a adaptação à longo prazo ou a morte celular por apoptose (KAUFMAN, 1999). A via de sinalização intracelular que participa desta regulação foi denominada “UPR” (*unfolded protein response*) (RON & WALTER, 2007).

A indução de danos oxidativos por agentes endógenos ou exógenos ou uma desregulação da via UPR podem levar à uma condição adversa, em que são produzidas e exportadas proteínas alteradas (*unfolded-proteins*), o que afeta os processos fisiológicos, principalmente no caso de proteínas regulatórias (COUX et al., 1996; HOCHSTRASSER, 1996).

Falhas no funcionamento da UPR relacionam-se a diversas doenças, tais como as neurodegenerativas (doença de Parkinson), síndromes genéticas (fibrose cística) e o surgimento de diversos tumores (PAUL, 2008). Por isso, torna-se necessário a busca de agentes quimioprotetores, os quais possuem um importante papel na medicina preventiva.

Dentre os agentes em análise quanto ao potencial quimioprotetor para o câncer, os componentes da dieta têm sido os mais bem avaliados, visto que o consumo

adequado de determinados alimentos tem a propriedade de proteger o DNA e, conseqüentemente, evitar o desenvolvimento de diversos cânceres (POOL-ZOBEL et al., 2002). Tais estudos apresentam evidências de que os alimentos fornecem nutrientes e substâncias bioativas que podem alterar a expressão gênica (KAPUT et al., 2007) de forma a garantir a homeostase e/ou prevenir o desenvolvimento de doenças.

A atividade antioxidante do selênio parece ser responsável pela sua eficácia no tratamento de doenças que têm o estresse oxidativo envolvido na gênese e evolução da doença (BURGUER et al., 2005; ZASSO et al., 2005; BORGES et al., 2006; PORCIÚNCULA et al., 2006). Devido a tais aspectos, têm crescido o interesse pela investigação da função de diferentes compostos de selênio como agente terapêutico em diversas doenças crônicas degenerativas, tais como os cânceres.

A L-(+)-Selenometionina (SeMet) é uma das principais formas naturais de selênio encontradas nos alimentos, a qual pode ser metabolizado diretamente para formas reativas de selênio ou armazenados no lugar da metionina em proteínas do corpo (SCHRAUZER, 2000).

Em razão da semelhança, o organismo converte o Se principalmente em SeMet e o incorpora em proteínas no lugar da metionina (Met), porque o tRNA-Met não distingue entre Met e SeMet. A substituição da Met por SeMet via de regra não altera significativamente a estrutura da proteína, mas pode influenciá-la atividade das enzimas se SeMet substituir Met nas proximidades do sítio ativo (SCHRAUZER, 2000). Esse fato, geralmente, aumenta a atividade enzimática, como no caso da ação antioxidante da enzima glutatona-peroxidase (GPx).

Frente ao exposto, considera-se que o Se, um micronutriente envolvido na manutenção da homeostase celular, pode atuar nas células diretamente ou associando-se a inúmeras selenoproteínas. As selenoproteínas relacionam-se à proteção celular contra inúmeros agentes exógenos e/ou endógenos causadores de estresse, atuando, principalmente, como agente antioxidante e de reparo de lesões no DNA (COMBS & GRAY, 1998). Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito anticancerígeno da L-(+)-Selenometionina e sua ação quando associada à H₂O₂ por meio do ensaio MTT, avaliar o efeito genotóxico pelo teste do cometa e avaliar a expressão por PCR em tempo-real de genes envolvidos no estresse oxidativo (*GPX1*, *CATALASE*, *SOD1*), no estresse de retículo endoplasmático (*GADD153*, *ERN1*, *TRAF2*) e na apoptose (*CASP9*) induzidos por H₂O₂ em células HepG2 tratadas com L-(+)-Selenometionina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AGENTES QUÍMICOS E INDUTORES DE DANO

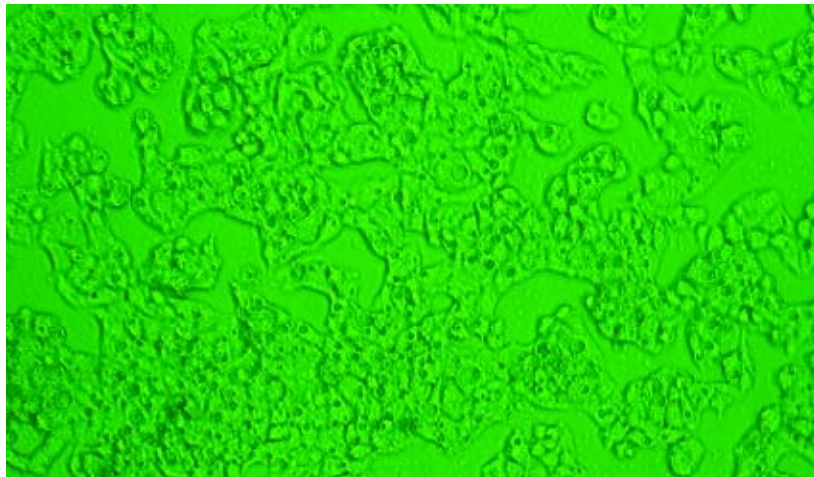
Como composto-teste, foi utilizado a L-(+)-selenometionina ($C_5H_{11}NO_2$; CAS: 3211765; Acros®). O composto foi diluído em solução salina tamponada (PBS).

Utilizou-se como agente indutor de estresse celular (controle positivo) para o ensaio MTT, para o teste do cometa e para a expressão gênica por PCR em tempo-real o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CAS 7722-84-1, Fmaia) na concentração final de 80 μM .

2.2 LINHAGEM CELULAR HepG2

As células HepG2 (Figura 1), provenientes de um carcinoma hepatocelular humano, foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ). Estas foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm^2 contendo meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e mantidas em estufa de CO_2 à 5%. Nestas condições, o ciclo celular desta linhagem é de aproximadamente 24 horas.

Figura 1 - Células HepG2 em Microscopia Óptica (100X)



2.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE MTT

Para o ensaio de citotoxicidade MTT (Dimethyl-Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)(CAS 298931; Sigma Aldrich®), realizado segundo Mossmann (1983), com modificações, foi diluído em meio de cultura DMEM sem soro. As células foram semeadas em

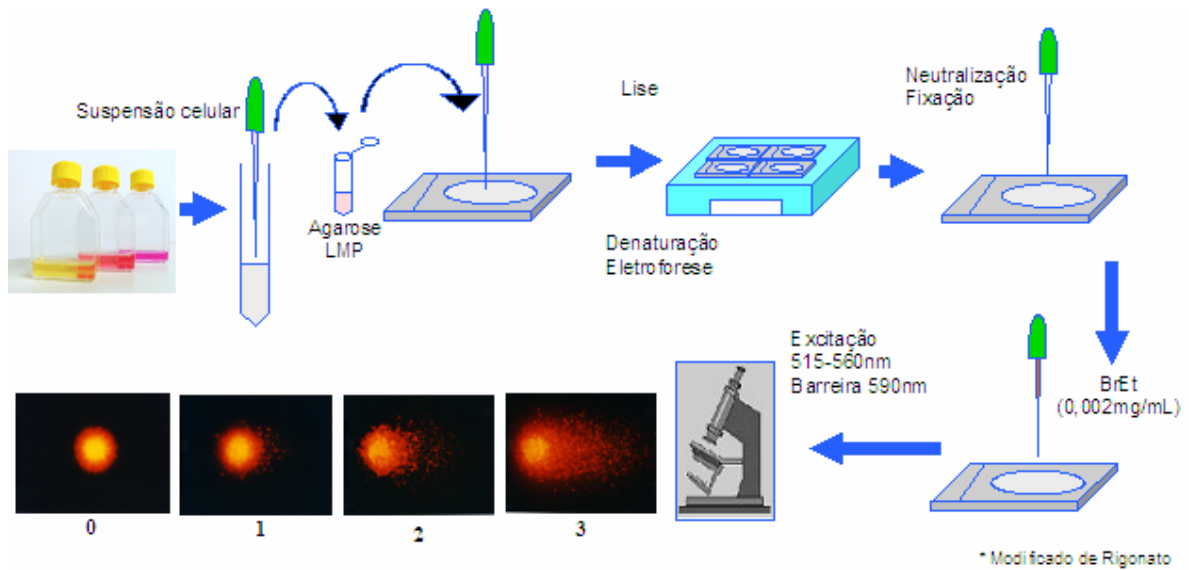
placas de 96 poços, numa concentração de $2,5 \times 10^4$ células para cada poço. Estas foram expostas aos tratamentos por 24 horas. Ao final desse período, as células foram incubadas com MTT por 4 horas. A leitura foi então realizada em espectrofotômetro (Uniscience) a 540 nm. Como agente indutor de citotoxicidade (controle positivo) foi utilizado o H_2O_2 a 80 μM (1h), e um controle negativo (células + meio DMEM). Sete concentrações de L-(+)-Selenometionina (SeMet) foram testadas (5, 50, 100, 250, 500, 1000 e 2000 ng/mL) isoladamente ou associados com H_2O_2 (80 μM , 1h) sendo cada tratamento testado em triplicata biológica e replicata técnica. Para a determinação das concentrações de SeMet que foram utilizados posteriormente no teste do cometa e na expressão gênica considerou-se o resultado obtido neste ensaio de citotoxicidade.

2.4 ENSAIO DO COMETA

Células HepG2 foram cultivadas em frascos de cultura de $25cm^2$ numa concentração de 10^6 células. Como agente indutor de danos ao DNA (controle positivo) foi utilizado o H_2O_2 a 80 μM (1h), além de um controle negativo (células + meio DMEM). Três concentrações de L-(+)-Selenometionina (SeMet) foram testadas (5, 50 e 500 ng/mL, 24h) isoladamente ou associados com H_2O_2 (80 μM , 1h) sendo cada tratamento testado em triplicata biológica e uma replicata técnica. Após os tratamentos, as células foram suspensas em agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e distribuídas em lâminas pré-gelatinizadas, para realização do ensaio do cometa (*Single cell gel electrophoresis*) (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000). As células foram lisadas por 60 min à $4^\circ C$ e submetidas à condições alcalinas por 20 min. A eletroforese foi realizada em pH 13, 25V, 300mA por 20min. As etapas do ensaio estão ilustradas na Figura 02.

Posteriormente as lâminas foram neutralizadas e coradas com brometo de etídio (2 $\mu g/mL$), sendo analisadas 100 células por lâmina. As imagens do tipo cometa foram classificadas visualmente utilizando um microscópio de fluorescência com aumento de 400x. Em cada tratamento analisou-se 100 cometas classificando-os de 0 a 3, conforme o comprimento e intensidade da cauda. Os critérios de classificação foram: (a) tipo 0, ausência de cauda; (b) tipo 1, cauda com até o diâmetro donucleóide; (b) tipo 2, cauda de tamanho médio, com 2 vezes o diâmetro do nucleóide; (c) tipo 3, cauda longa, com comprimento superior a 2 vezes o diâmetro do nucleóide. Além da classificação morfológica, as imagens dos cometas foram analisadas no programa CometScore[®], com o intuito de avaliar o “comet length” e o “tail moment”.

Figura 2 - Etapas do Ensaio do Cometa e análise em microscopia de fluorescência, mostrando as 3 classes de danos no DNA: 0, 1, 2 e 3



2.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA (RT-QPCR)

A expressão relativa dos genes em estudo foi quantificada pela técnica de PCR em tempo-real. No primeiro dia semeou-se 2×10^6 células em dezoito frascos de cultura de 25 cm² contendo 5mL de meio. Seis frascos foram tratados com L-(+)-Selenometionina (três frascos a 50 ng/mL e três a 500 ng/mL, 24h), três frascos com H₂O₂ (80 µM, 1h), e seis frascos tratados com L-(+)-Selenometionina (50 e 500 ng/mL, 24h) e H₂O₂ (80 µM, 1h) associados. Os outros 3 frascos foram destinados a controle (células + meio DMEM). Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e seu RNA total foi extraído com Trizol LS (Invitrogen®), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi ressuscitado em água DEPC (Invitrogen®) e tratado com DNase I Amplification Grade (Invitrogen®).

A quantificação de RNA foi realizada pela leitura espectrofotométrica a 260 nm e 280 nm, sendo as amostras consideradas aptas se a razão da leitura em 260 nm e 280 nm estivessem entre 1,8 e 2,1. A fim de verificar a integridade do RNA, foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8%. A síntese de cDNA(RT-PCR) foi feita a partir de 500 ng/mL de RNA, com oligo(dT) e com a enzima transcriptase reversa (M-MLV – Invitrogen, Life Technologies®).

As reações de qPCR foram realizadas no termociclador PCR LightCycler® Nano (Roche). Os oligonucleotídeos utilizados nos experimentos estão listados na tabela 2. O

Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen®) (composto fluorescente que se liga à DNA dupla-fita), foi usado na mistura da reação, além de 0,4 mM de cada primer e 2 µL do cDNA, perfazendo um volume final de 20µL.

As condições da PCR no termociclador foram seguidas: um passo inicial a 95°C por 3 min, e 30 ciclos a 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 20 seg, seguidos de 95°C por 10 seg e 40°C 1 min. A análise da curva de melting foi realizada no final da reação com temperatura de 50°C a 90°C a cada 0,5 graus por 20 seg.

Os dados foram normalizados com cDNAs de gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*) amplificados em cada conjunto de experimentos de qPCRs. Todos os experimentos foram realizados com três culturas biológicas independentes, e cada amostra de cDNA foi analisada em replicatas técnicas para cada par de primer.

Tabela 1 - Lista de primers, sequência (F e R) e ID Blast/Referências utilizados no estudo.

Nome	Sequência 5' - 3'	ID Blast/Referências
<i>GAPDH</i>	F- ACA AGA TTG TGA AGG TCG GTG TCA R- AGC TTC CCA TTC TCA GCC TTG ACT	SUGAYA et al., 2005 (com modificações)
<i>GPX1</i>	F- CTC CCC TTA CAG TGC TTG TTC G R- CTT TAT AGT GGG AAC TCG CC	HANDY et al., 2005
<i>CATALASE</i>	F- CTG TGT GAG AAC ATT GCC AAC CAC C R- CCA GGC TGT GAG GTA ACA TAA GACT	SIGFRID et al., 2004 (com modificações)
<i>TRAF2</i>	F- GCC CCA AGT TCC CCT TAA CT R- GAA TCT GCA AGG GAC TCG AC	NM_021138.3
<i>GADD153</i>	F- AGC AGA TGT GCT TTT CCA GAC R- GTC CTC ATA CCA GGC TTC CA	MCCULLOUGH et al., 2001 (com modificações)
<i>CASP9</i>	F- GCT CTT CCT TTG TTC ATC TCC R- GTT TTC TAG GGT TGG CTT CG	MAURO et al., 2011
<i>SOD1</i>	F- CTA GCG ACT TAT GGC GAC R- GAA TGT TTA TTG GGC GAT C	KATO et al., 2008 (com modificações)
<i>ERN1</i>	F- AGT GGG CAG ACA CAG TTT CA R- CCA CCG TGT AGG TAG GGT TC	NM_001433.3

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o ensaio de citotoxicidade MTT, os valores dos parâmetros mensurados foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnet ($p < 0,05$), pelo programa GraphPad

Prism[®]5.

O ensaio de cometa foi analisado pelo programa CometScore[®], com seus parâmetros mensurados comparadas por ANOVA seguida de Dunnet ($p < 0,05$).

Os níveis de expressão relativa dos genes em estudo foram determinados pelo método de Pfaffl et al., (2002), com análise estatística realizada por meio do “Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test[®]” no Software REST[®] 2009, sendo sua significância estatística estabelecida em $p < 0,05$.

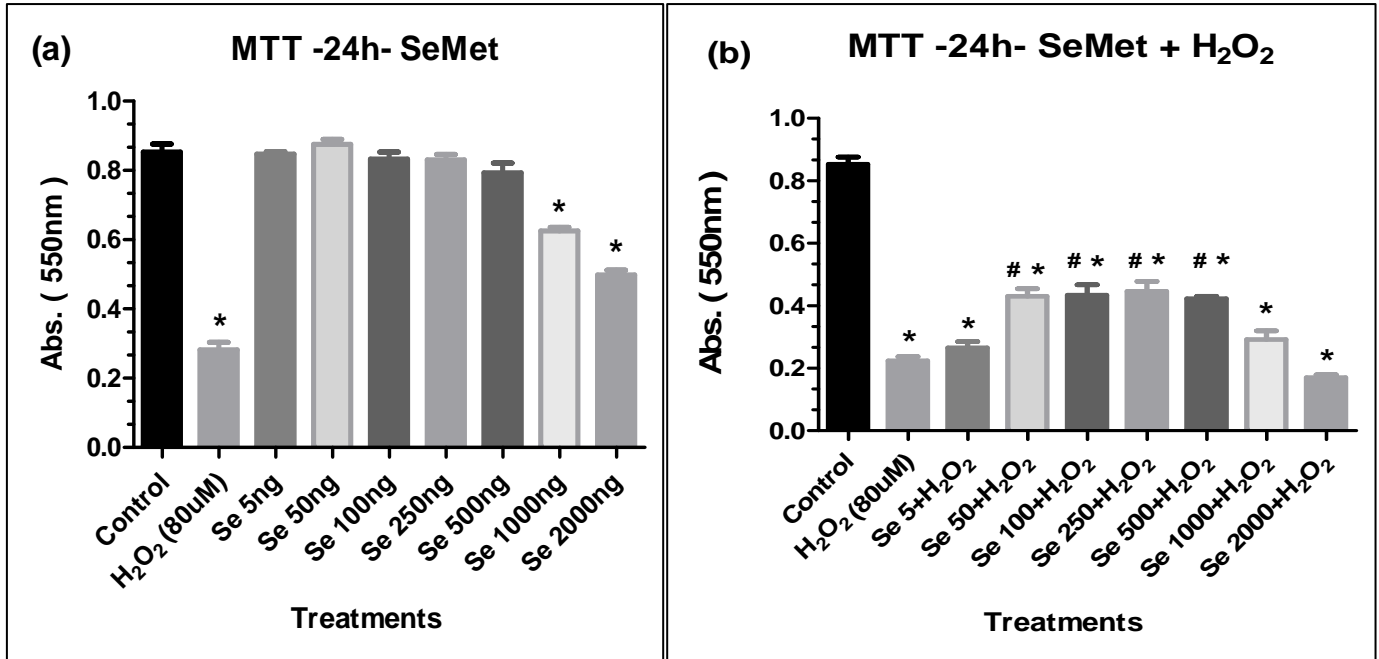
3 RESULTADOS

3.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (MTT)

A Figura 3(a) mostra os resultados obtidos pelo ensaio do MTT no tratamento com SeMet. A leitura das absorbâncias medida espectrofotometricamente mostra que as células HepG2 tratadas com L-(+)-Selenometionina nas concentrações de 5, 50, 100, 250 e 500 ng/mL em tratamentos por 24 horas tiveram uma absorbância próxima a do grupo controle, sugerindo que essas concentrações não foram citotóxicas. Por outro lado, verifica-se que as concentrações de 1000 e 2000 ng/mL apresentaram citotoxicidade, evidenciado pela diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Nos tratamentos associados (mostrado na Figura 3b) verifica-se que as concentrações de 50, 100, 250 e 500 ng/mL conseguiram diminuir a citotoxicidade causada pelo H₂O₂ no tratamento por 1 hora, aumentando a sobrevivência das células HepG2, evidenciado pela diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo (H₂O₂). O mesmo não foi verificado nas concentrações de 5, 1000 e 2000 ng/mL, sendo ineficaz em proteger as células frente ao tratamento com peróxido.

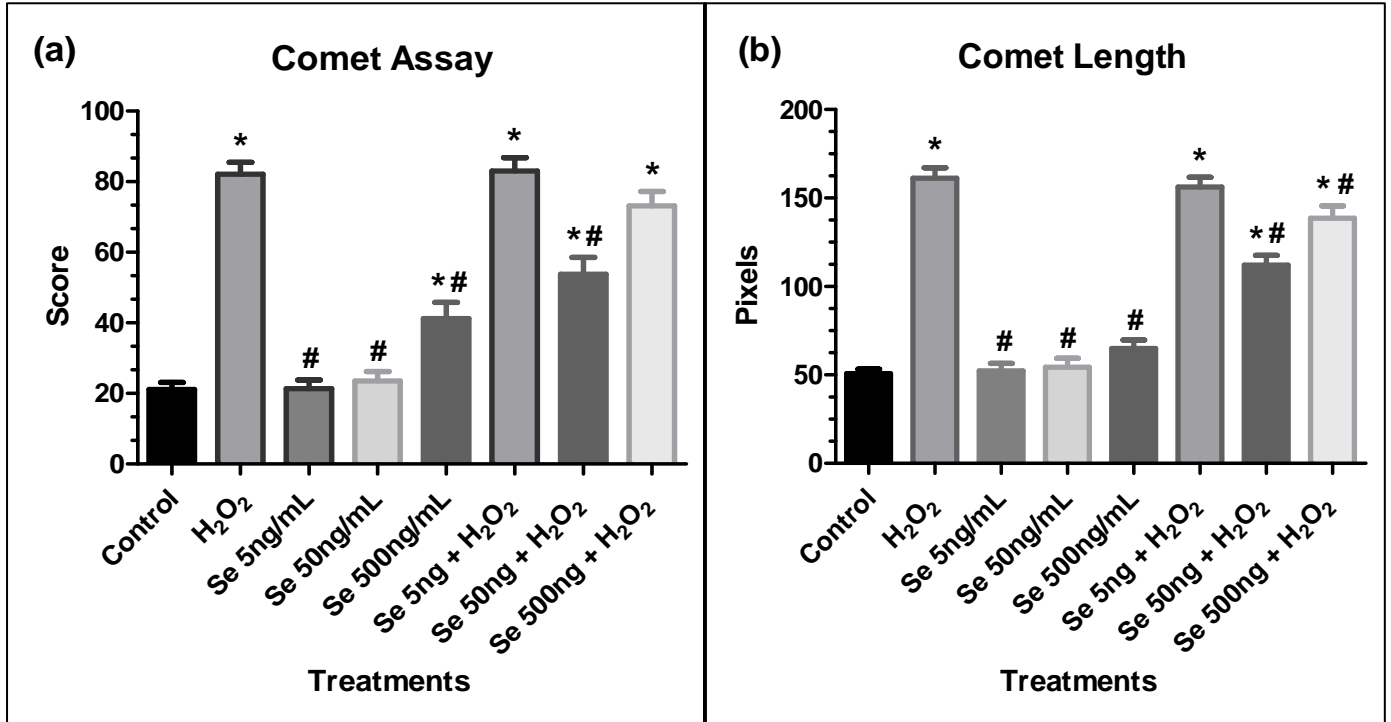
Figura 3 - Ensaio de citotoxicidade MTT. (a) Absorbância média observada após o tratamento com SeMet por 24 horas; (b) Absorbância média observada após o tratamento com SeMet associado com H₂O₂; (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, p<0,05; (#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao H₂O₂, p< 0,05.



3.2 Ensaio do Cometa

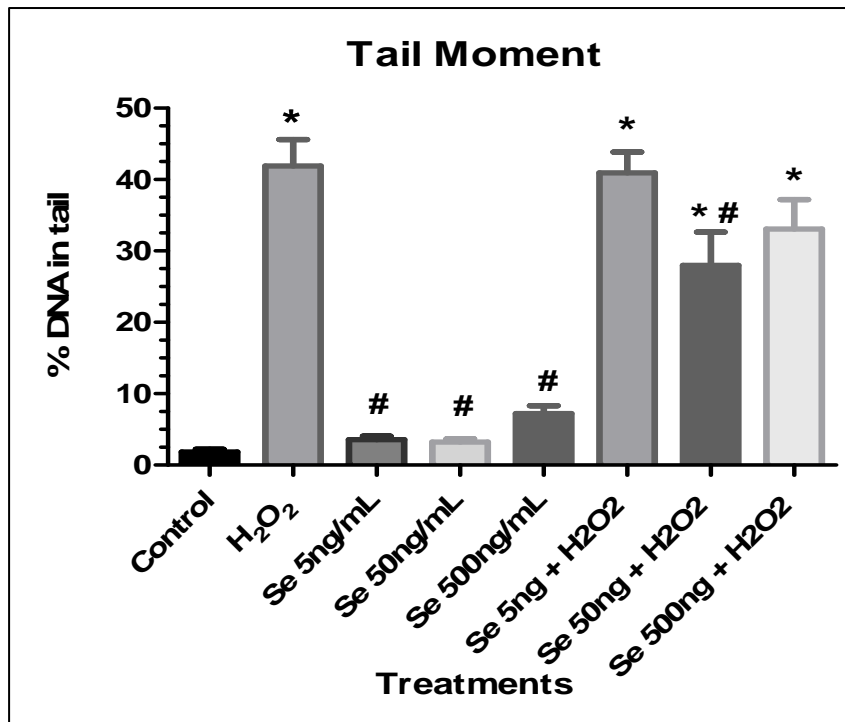
A Figura 04 (a e b) apresentam os resultados da avaliação do cometa após os tratamentos com SeMet e/ou H₂O₂. Em (a) está representado o resultado da análise morfológica e em (b) o *comet length* analisado no programa CometScore[®]. Observa-se que o tratamento de 500ng/mL de SeMet aumentou significativamente a quantidade de cometas em relação ao controle significativamente em (a), assim como houve a mesma tendência em (b), demonstrando um dano ao DNA. Os outros tratamentos não provocaram dano genotóxico. No tratamento de 50ng/mL associado com H₂O₂ houve uma diminuição do número de cometas em relação ao tratamento somente com peróxido em ambas figuras (a e b), demonstrando um efeito protetor da SeMet pela diminuição dos danos ao DNA causado pelo peróxido. Este efeito também foi evidenciado no tratamento associado de 500ng/mL em (b) (embora em menor grau), assim como uma tendência observada em (a).

Figura 4 - Ensaio do cometa. (a) Contagem morfológica do cometa; (b) *Comet length* analisado pelo programa CometScore[®]; (*)Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, $p < 0,05$; (#)Diferença estatisticamente significativa em relação ao H₂O₂, $p < 0,05$.



Corroborando com os dados mostrados na Figura 04, a Figura 05 mostra os resultados do *tail moment* avaliados pelo CometScore[®]. *Tail moment* é definido como o produto do comprimento da cauda e a fração de DNA total presente na mesma. Desta forma, verifica-se que o tratamento com H₂O₂ provocou uma grande extensão de danos ao DNA (evidenciado pela % de DNA na cauda). Nos tratamentos associados, a SeMet a 50ng/mL foi capaz de proteger o DNA contra o dano causado pelo H₂O₂, efeito que pode ser observado pelo declínio da % de DNA na cauda mostrado na Figura 05.

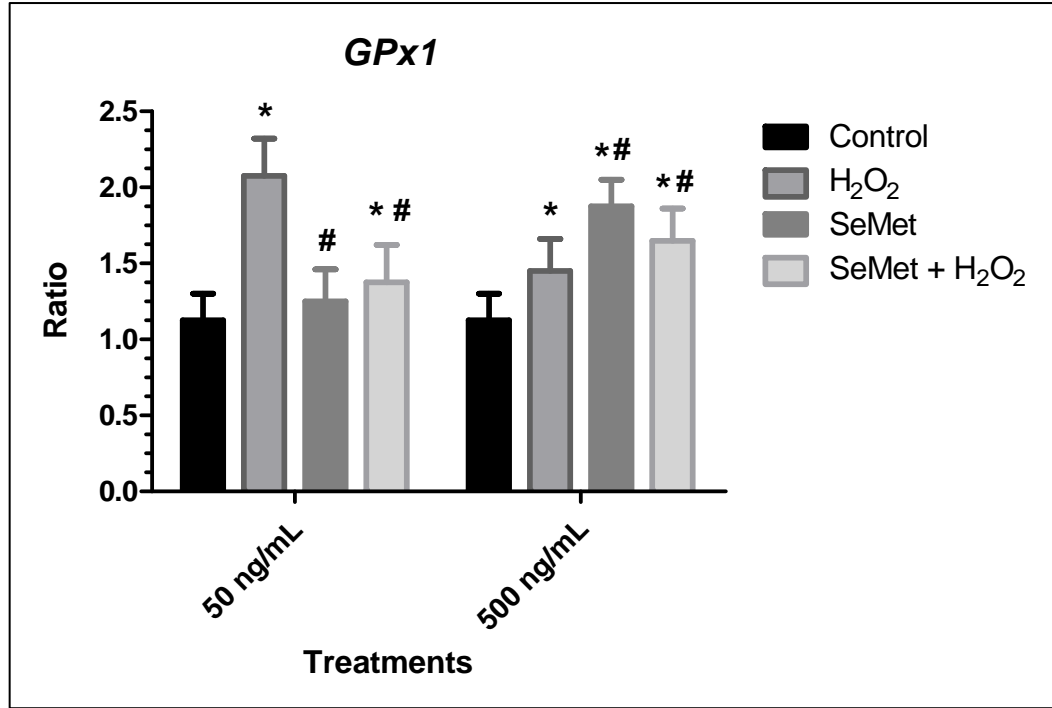
Figura 5 - Tail moment analisado pelo programa CometScore[®] no ensaio do cometa; (*)Diferença estatisticamente significativaem relação ao controle, $p < 0,05$; (#)Diferença estatisticamente significativaem relação ao H_2O_2 , $p < 0,05$.



3.3 Análise de Expressão Gênica

As Figuras 06, 07 e 08 apresentam os resultados da expressão relativa por RT-qPCR dos genes de estresse oxidativo (*GPX1*, *CATALASE*, *SOD1*). Analisando-se os valores relativos de expressão e fazendo-se a normalização pelo gene constitutivo *GAPDH*, observou-se que para o gene *GPX1* na concentração de 50ng/mL, ocorreu diminuição da expressão dos transcritos no tratamento associado em relação ao tratamento com H_2O_2 (Fig 06), o que sugere um efeito protetor frente ao dano causado pelo peróxido. Por outro lado, no tratamento de 500 ng/mL houve o efeito contrário, com uma expressão relativa de transcritos no tratamento associado maior do que no H_2O_2 , mostrando que possivelmente o tratamento de 500 ng/mL de SeMet pode estar sendo danoso à célula ao invés de protegê-la (efeito evidenciado pelo aumento de expressão em relação ao controle).

Figura 6 - Expressão relativa do gene Glutationa peroxidase (*GPX1*) em células HepG2 tratadas em 24h com SeMet. (Análise estatística feita pelo Software REST[©] 2009); (*)Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, $p < 0,05$; (#)Diferença estatisticamente significativa em relação ao H_2O_2 , $p < 0,05$.



Efeito semelhante foi encontrado na expressão do gene *SOD1* (Figura 07), onde verificou-se que na concentração de 50 ng/mL houve uma diminuição da expressão do tratamento associado em relação ao H_2O_2 , enquanto que na concentração de 500 ng/mL houve um grande aumento da expressão de transcritos no tratamento associado em relação ao peróxido.

Por outro lado, no gene *CATALASE*, não houve nenhuma diferença de expressão estatisticamente significativa em nenhum dos tratamentos nas duas concentrações de SeMet testadas, embora em ambas houve uma pequena diminuição do tratamento associado em relação ao H_2O_2 (Figura 08).

Figura 7 - Expressão relativa do gene Superóxido dismutase (*SOD1*) em células HepG2 tratadas em 24h com SeMet. (Análise estatística feita pelo Software REST[©] 2009); (*)Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, $p < 0,05$; (#)Diferença estatisticamente significativa em relação ao H_2O_2 , $p < 0,05$.

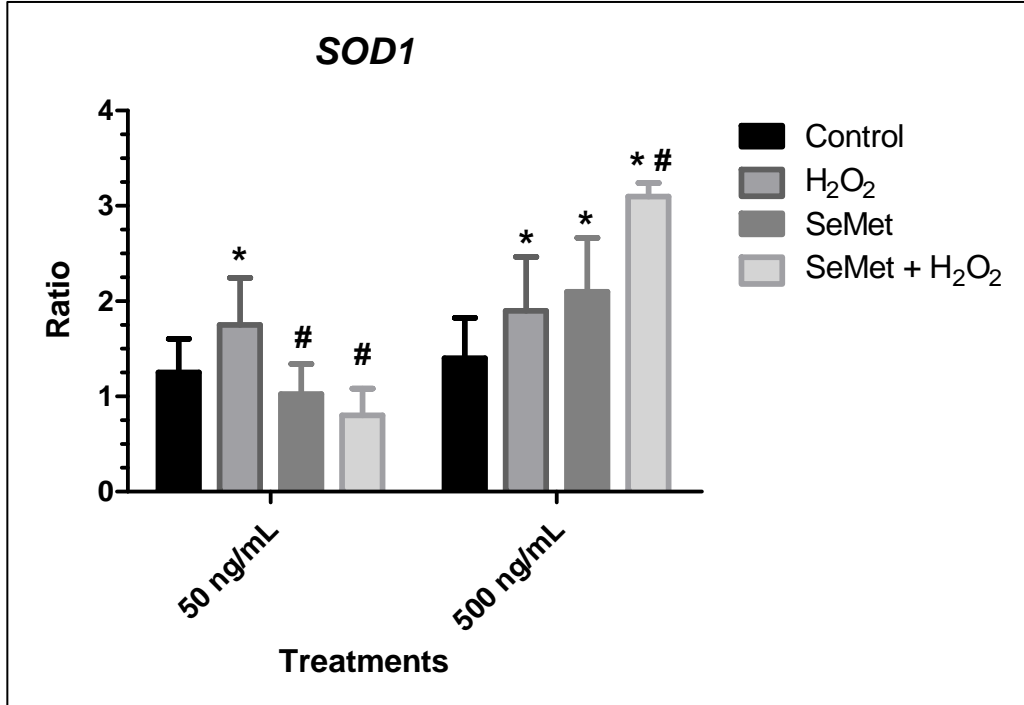
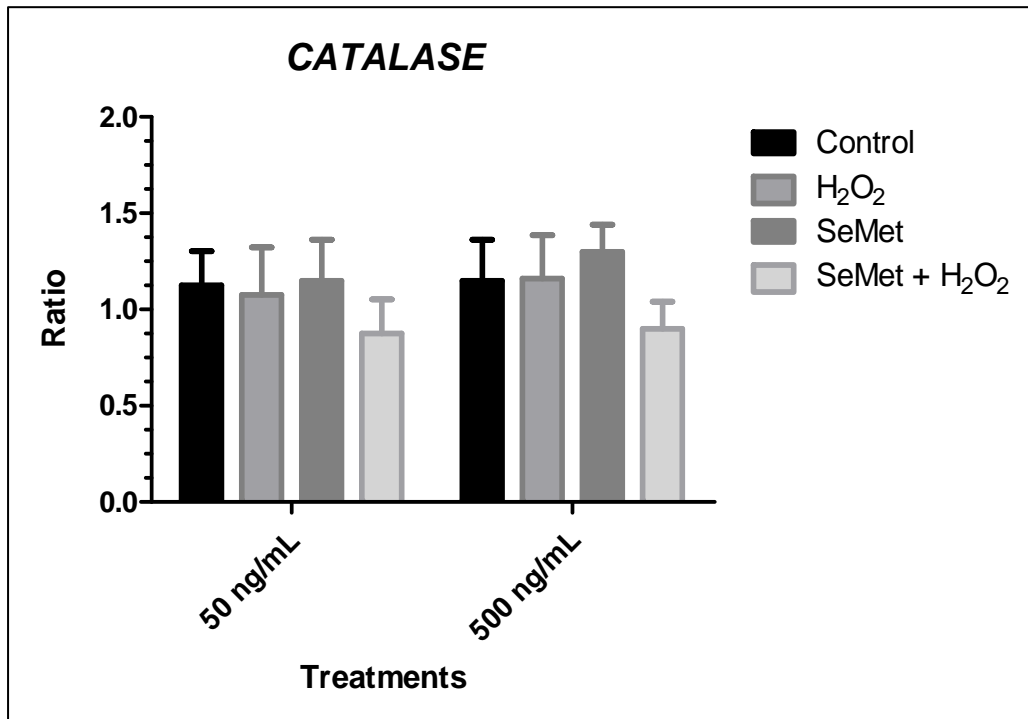
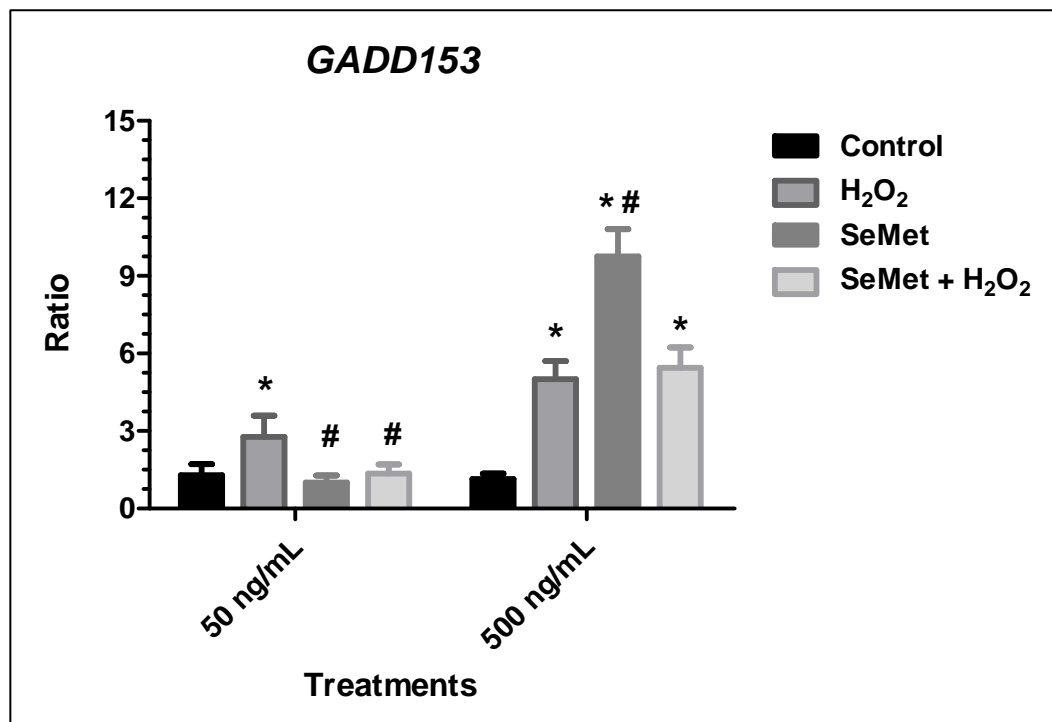


Figura 8 - Expressão relativa do gene *CATALASE* em células HepG2 tratadas em 24h com SeMet. (Análise estatística feita pelo Software REST[©] 2009).



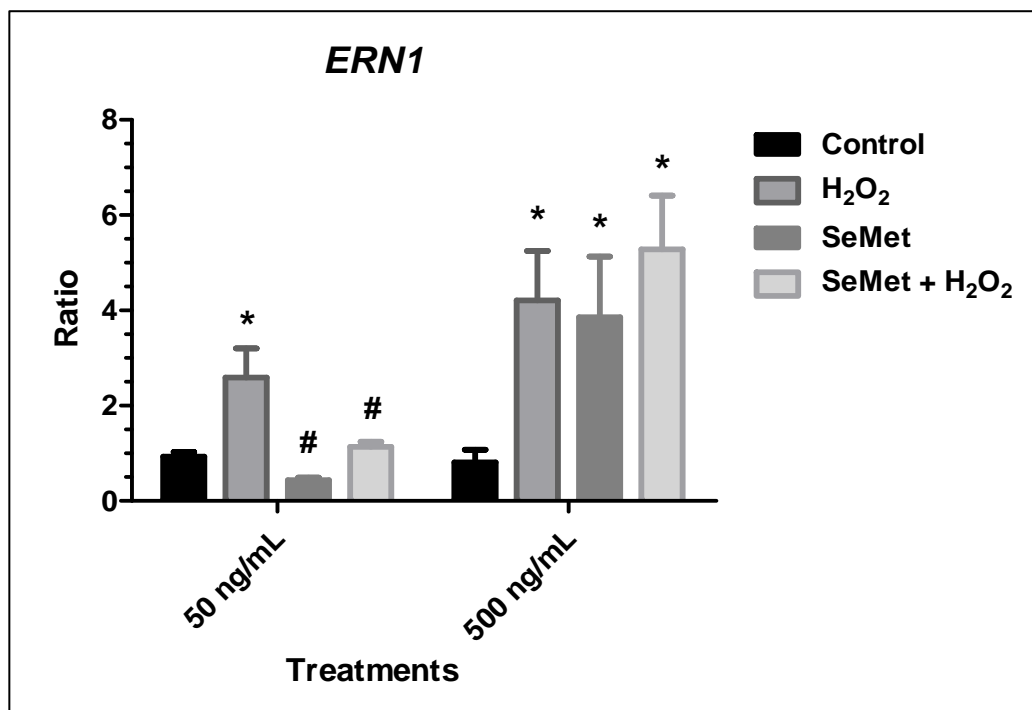
As Figuras 09, 10 e 11e 12 apresentam os resultados da expressão relativa por RT-qPCR dos genes de estresse de retículo endoplasmático (*GADD153*, *ERN1*, *TRAF2*) e de apoptose (*CASP9*) induzidos por H_2O_2 em células HepG2 tratadas com L-(+)-Selenometionina. Foi observado na Figura 09 que no gene *GADD153* a concentração de 50 ng/mL diminuiu a expressão gênica no tratamento associado em relação ao tratamento com H_2O_2 . Sendo o *GADD153* um gene pró-apoptótico e induzido quando há um dano direto no DNA, a expressão reduzida no tratamento associado demonstra um efeito protetor da SeMet, impedindo ou diminuindo o dano e a indução de apoptose causada pelo peróxido. Por outro lado, no tratamento de 500 ng/mL houve aumento da expressão relativa de transcritos no tratamento de SeMet em relação ao controle e ao H_2O_2 , mostrando que possivelmente o tratamento de 500 ng/mL de SeMet pode causar dano direto à célula e levar à apoptose.

Figura 9 - Expressão relativa do gene *GADD153* (*growth arrest and DNA damage-inducible gene 153*) em células HepG2 tratadas em 24h com SeMet. (Análise estatística feita pelo Software REST[®] 2009); (*)Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, $p < 0,05$; (#)Diferença estatisticamente significativa em relação ao H_2O_2 , $p < 0,05$.



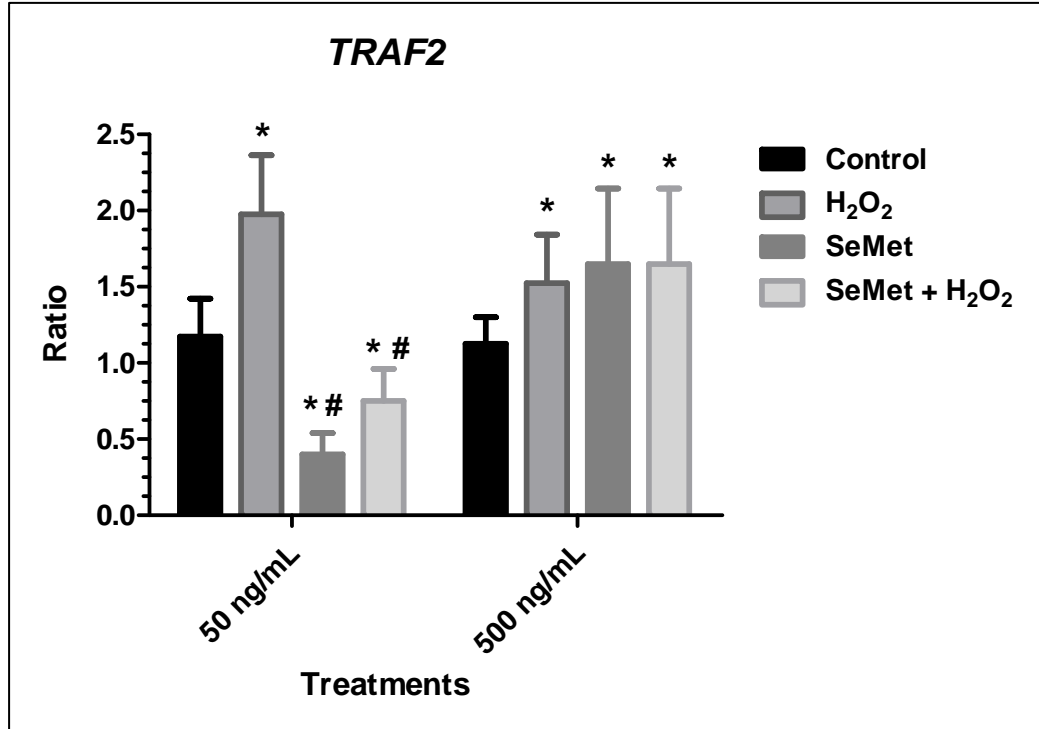
Com relação à expressão do gene *ERN1* (Figura 10) observou-se que na concentração de 50 ng/mL houve um aumento estatisticamente significativo da expressão no tratamento com H_2O_2 em relação ao controle, evidenciando o estresse induzido pelo peróxido e a concomitante ativação de *ERN1*. Verifica-se também que o tratamento associado diminuiu muito significativamente a expressão relativa do gene em relação ao H_2O_2 , demonstrando o efeito protetor da L-(+)-Selenometionina. Diferentemente, na concentração de 500 ng/mL observou-se um aumento da expressão de transcritos nos tratamentos com peróxido, SeMet e no tratamento associado em relação ao controle. Esses fatos sugerem que nessa concentração a SeMet não foi capaz de proteger as células da injúria causada pelo H_2O_2 .

Figura 10 - Expressão relativa do gene *ern1* (*endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1*) em células hepg2 tratadas por 24h com semet. (análise estatística feita pelo software rest[©] 2009); (*) diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, $p < 0,05$; (#) diferença estatisticamente significativa em relação ao H_2O_2 , $p < 0,05$.



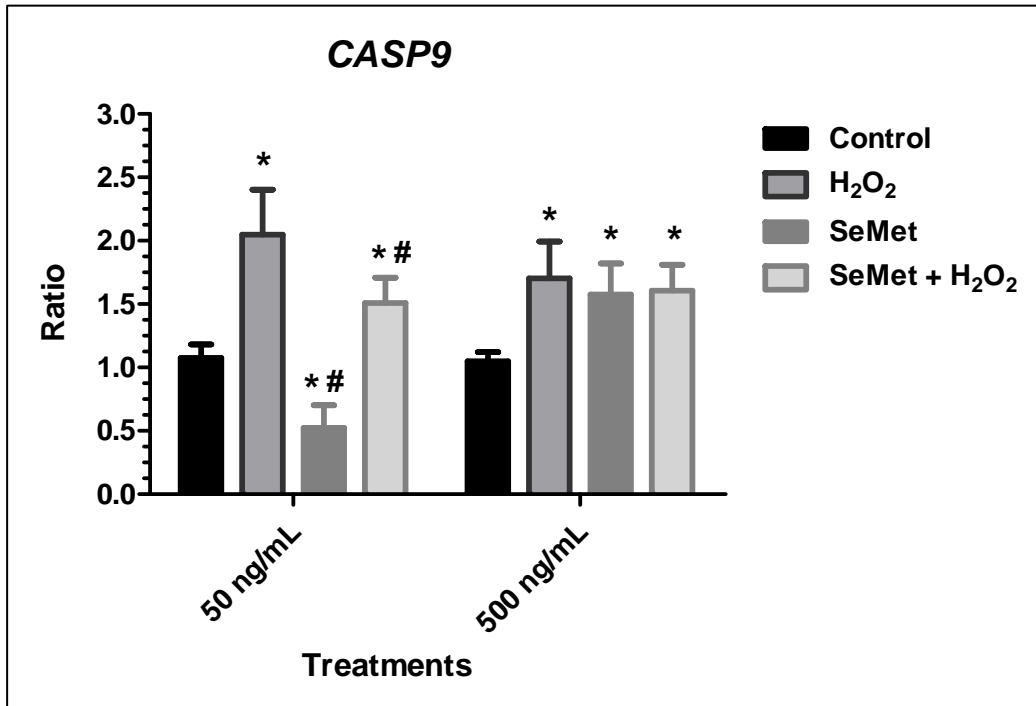
Efeito semelhante foi encontrado na expressão do gene *TRAF2* (Figura 11), onde verificou-se que na concentração de 50 ng/mL houve diminuição da expressão gênica se comparado o tratamento associado em relação ao H_2O_2 , enquanto que na concentração de 500 ng/mL houve um aumento da expressão de transcritos nos tratamentos com peróxido, SeMet e associado em relação ao controle.

Figura 11 - Expressão relativa do gene *TRAF2* (*TNF receptor-associated factor 2*) em células HepG2 tratadas em 24h com SeMet. (Análise estatística feita pelo Software REST[®] 2009); (*)Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, $p < 0,05$; (#)Diferença estatisticamente significativa em relação ao H_2O_2 , $p < 0,05$.



Da mesma maneira, foi encontrado na expressão do gene *CASP9* (Figura 12) que na concentração de 50 ng/mL houve uma diminuição da expressão no tratamento associado em relação ao H_2O_2 e da SeMet em relação ao controle, sugerindo um efeito protetor/anti-apoptótico da SeMet frente ao peróxido. Por outro lado, na concentração de 500 ng/mL houve um aumento da expressão de transcritos nos tratamentos com H_2O_2 , SeMet e no tratamento associado em relação ao controle, demonstrando uma maior indução de apoptose nesses tratamentos em decorrência do dano gerado às células.

Figura 12 - Expressão relativa do gene *CASP9*(caspase 9)em células HepG2 tratadas por 24h com SeMet. (Análise estatística feita pelo Software REST[®] 2009); (*) Diferença estatisticamente significativaem relação ao controle, $p < 0,05$; (#) Diferença estatisticamente significativaem relação ao H_2O_2 , $p < 0,05$.



4 DISCUSSÃO

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004). A cronicidade do processo em questão têm relevantes implicações sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas, entre elas a aterosclerose, transtornos neurodegenerativos e o câncer (GREEN et al., 2004). Ferrari (2004) ratifica que a geração de radicais livres desencadeia eventos patológicos que, por sua vez, estão envolvidos nos processos cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos.

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais. Esse sistema, usualmente, é dividido em enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não-enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de

substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética (BARBOSA et al., 2010).

O desenvolvimento de estratégias preventivas contra doenças crônicas decorrentes do processo oxidativo tem contribuído para o aumento da expectativa e qualidade de vida da população, sendo a prevenção amplamente utilizada (DE FLORA & FERGUSON, 2005). Atualmente, mais de 500 agentes químicos estão sendo analisados em relação a sua atuação na quimioprevenção do câncer (FERGUSON, 1994; DE FLORA & FERGUSON, 2005).

A atividade antioxidante do selênio, por exemplo, parece ser responsável pela sua eficácia no tratamento de doenças que têm envolvido na sua gênese e evolução o estresse oxidativo. Além da atividade antioxidante, determinados compostos de selênio apresentam atividades antiinflamatórias, hepatoprotetoras, apoptóticas e, em especial, anticarcinogênicas (BURGUER et al., 2005; ZASSO et al., 2005; BORGES et al., 2006).

O ensaio de citotoxicidade – MTT é um dos métodos mais empregados e mais sensíveis para detecção de citotoxicidade *in vitro* (FOTAKIS & TIMBREL, 2006). No presente estudo, foi avaliado a citotoxicidade da L-(+)-Selenometionina (SeMet) em células HepG2 com o intuito de avaliar seu uso seguro. Das sete concentrações testadas, apenas as duas maiores concentrações (1000 e 2000 ng/mL) apresentaram efeito citotóxico. A citotoxicidade da SeMet também foi analisada associada ao tratamento com H₂O₂, visando verificar uma possível atividade protetora frente ao estresse oxidativo causado pelo mesmo. Foi observado que quatro concentrações (50, 100, 250 e 500 ng/mL) de SeMet foram capazes de aumentar a sobrevivência celular, sugerindo um efeito protetor. Novamente, as duas maiores concentrações não foram capazes de realizar o mesmo efeito das outras concentrações testadas, possivelmente devido ao efeito citotóxico evidenciado no ensaio anterior.

Altos níveis de selênio no organismo podem levar à formação de selenito (SeO₃²⁻), e uma exposição excessiva da mesma pode conduzir à produção do metabólito selenodiglutationa (GS-Se-SG) reduzida, a qual por sua vez inibe a síntese proteica, afetando a proliferação celular (VERNIE et al., 1981; VERNIE, 1987; LANFEAR et al., 1994; WU et al., 1995; PENCE et al., 1996). Além disso, a redução de GSH-dependente de selenito e o metabolismo oxidativo adicional resultante também pode produzir peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido. Deste modo, níveis elevados de selenito, bem como outras formas de selênio que produzam selenito metabolicamente, pode produzir efeito prooxidante,

causando toxicidade e morte celular, o que possivelmente foi evidenciado nos tratamentos com 1000 e 2000 ng/mL de SeMet.

Por outro lado, níveis basais diários de selênio são essenciais à saúde humana e estudos bioquímicos sugerem que esse micronutriente é encontrado nos sistemas biológicos sob a forma de selenol (R-SeH). Selenóis são compostos correspondentes a forma de tióis (R-SH), em que o átomo de Se é substituído pelo átomo de enxofre. A principal diferença química entre eles está relacionada às suas respectivas constantes de dissociação e seus caracteres nucleofílicos (BECK et al., 1998; BECK et al., 2003). Devido ao maior caráter nucleofílico, os selenóis são capazes de reduzir dissulfetos e sulfóxidos, sendo esta uma importante característica biológica, já que estes compostos atuam diretamente na atividade de enzimas de detoxificação. As atividades quimioprotetoras do Se contra diferentes neoplasias parecem ser oriundas de variados mecanismos, como a sua participação na estrutura e função de enzimas antioxidantes, como a glutatona peroxidase (GPX) (BARBOSA, 2006).

A privação de selênio foi associada à condução das células à morte celular por apoptose por estresse oxidativo (KAYANOKI et al., 1996) sugerindo que o Se, provavelmente por meio das GPXs Se-dependentes apóiem a sobrevivência celular. Isso pode ser corroborado pelos resultados observados nos tratamentos associados de 50, 100, 250 e 500 ng/mL frente ao dano causado pelo H₂O₂.

Outro dado que corrobora com os resultados encontrados no ensaio MTT são aqueles encontrados no ensaio do cometa. Nele verifica-se o *comet length* e o *tail moment* bastante aumentados em função do tratamento com H₂O₂, o que demonstra o seu efeito genotóxico. Estudos anteriores comprovam que os radicais livres podem causar modificações químicas extensas e alterações no DNA, incluindo bases modificadas e quebras de fita (JARUGA et al., 1994). Uma série de evidências sugere que os danos no DNA podem provocar a morte das células por indução de apoptose por meio de diversas vias de sinalização, como a das caspases, por exemplo (ROOS & KAIN, 2006).

Os tratamentos com SeMet mostraram que a concentração de 500 ng/mL provocou um aumento na análise morfológica, assim como uma tendência encontrada no *comet length* e no *tail moment*. Zhou et al. (2003) descobriram que a produção de selenito por níveis elevados de Se no organismo induz quebras de fita cromossômicas de DNA e, posteriormente, desencadeia vias celulares de apoptose. Em contrapartida, a concentração de 50 ng/mL no tratamento associado apresentou capacidade protetora significativa contra os danos ao DNA gerados pelo H₂O₂. Griffin (1979) sugeriu que a ação quimioprotetora do selênio pode envolver GPX celular Se-dependente, a única selenoenzima caracterizada que

funciona na proteção metabólica do estresse oxidativo pela remoção de peróxido de hidrogênio, prejudicial ao DNA, e hidroperóxidos lipídicos.

Os principais ramos enzimáticos da rede antioxidante incluem as superóxido dismutases (*SODs*), as glutathione peroxidases (*GPXs*), e catalase (WOOD et al., 2003; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). As *SODs* catalisam a quebra de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (MCCORD & FRIDOVICH, 1969). Este último é então convertido em água pela catalase, ou pela *GPX*. No presente estudo, foi feita a RT-qPCR desses três genes a fim de verificar a modulação da SeMet frente ao estresse induzido pelo H_2O_2 a nível molecular. Observou-se que para *GPXI* e *SODI* houve aumento da expressão gênica no tratamento com peróxido, evidenciando seu efeito genotóxico. Encontrou-se também que a concentração de 50 ng/mL de SeMet no tratamento associado diminuiu a expressão consideravelmente para ambos os genes, demonstrando um efeito protetor. Como anteriormente descrito, o Se é componente essencial do sítio ativo de diversas enzimas de atividade óxido-redutora, em especial as glutathionas (HESKETH, 2009), o que sugere que a SeMet pode ter sido incorporada à glutathione e aumentado sua atividade antioxidante, protegendo as células contra os efeitos do peróxido. Em contrapartida, na concentração de 500 ng/mL houve um aumento de expressão no tratamento com SeMet e no tratamento associado maior do que no H_2O_2 , sugerindo que essa concentração seja tóxica, e portanto potencializa o dano causado às células.

Não houve nenhuma alteração significativa no gene da *CATALASE*, possivelmente pelo fato da expressão de *GPX* estar alterado e suprimir o efeito da mesma, visto que desempenham a mesma função.

Muitos dos genes associados a agentes genotóxicos são da classe de reparo do DNA ou a ela relacionadas, sendo que algumas dessas têm genes implicados nas respostas ao estresse ao nível de retículo endoplasmático (RE), com funções relacionadas à via UPR (unfolded-protein response) (BERARDINELLI, 2011).

O gene *GADD153* é expresso em níveis muito baixos em células em crescimento, mas é acentuadamente induzido em resposta a uma variedade de tensões celulares, sendo fortemente expresso com a ruptura da homeostase no retículo endoplasmático (IGASE, et al., 2001; MCCULLOUGH et al., 2001). A ativação de *GADD153* relaciona-se com as três cascatas de sinalização ativadas por UPR, sendo a via induzida por *PERK* a principal ativadora de *GADD153* (BERARDINELLI, 2011).

O estímulo prolongado da UPR em condições de estresse pode resultar em apoptose (BERNALES et al., 2006) e sabe-se que o gene *GADD153* está diretamente

associado à esse tipo de morte celular (IGASE, et al., 2001). Da mesma maneira, *ERN1* e *TRAF2* são mediadores chave que transduzem os sinais a partir do citossol para o RE durante o estresse de retículo (YONEDA et al., 2001). O gene *ERN1* codifica uma proteína cuja atividade quinase e endoribonuclease é importante para a resposta a sinais de estresse no retículo, atuando como um sensor de proteínas mal dobradas no lúmen do RE. O domínio da endoribonuclease cliva o RNAm*XBPI* convertendo-o em um potente ativador transcricional, cuja ação culmina com a sinalização posterior para bloqueio do crescimento e apoptose (BI et al., 2005). De maneira semelhante, os sinais mediados por *TRAF2* aparentemente desempenham papéis importantes na regulação de respostas de sobrevivência celular, proliferação, e apoptose (INOUE et al., 2000). No presente estudo, verificou-se um acentuado aumento de expressão dos genes *GADD153*, *ERN1* e *TRAF2* no tratamento com peróxido, mostrando claramente a produção de danos ao DNA e a indução de apoptose (fato evidenciado pelo aumento da expressão da caspase iniciadora *CASP9* no mesmo tratamento).

A ação apoptótica de *GADD153* envolve uma diminuição protéica de Bcl-2, fator que contribui para a liberação de citocromo c da mitocôndria (ZUPPINI et al., 2002; MA & HENDERSHORT, 2004). Concomitantemente, foi relatado que a ativação do gene *ERN1* recruta *TRAF2* para a membrana do retículo endoplasmático. *TRAF2* ativa *ASK1* que então ativa a cascata *JNK* e as caspases da via apoptótica na mitocôndria (FORMAN et al., 2003). Desta forma, nossos resultados sugerem que o acúmulo prolongado de injúrias provocado pelo tratamento com H_2O_2 modularia a via UPR, ativando *GADD153*, *ERN1* e *TRAF2*, que desencadearia a ativação de *CASP9* e consequente indução de apoptose.

Nos tratamentos associados, observa-se que a concentração de 50 ng/mL de L-(+)-Selenometionina foi capaz de modular significativamente estes genes, diminuindo a expressão dos mesmos em relação ao peróxido, e sugerindo um efeito protetor e antiapoptótico. Porém, na concentração de 500 ng/mL, foi verificado o efeito contrário, onde a SeMet não foi capaz de proteger contra o dano causado pelo peróxido ou mesmo provocou um dano (aumento de expressão) ainda maior.

Esses resultados sugerem que a SeMet, embora possua uma janela terapêutica curta (evidenciado pelo aparente efeito tóxico da concentração de 500 ng/mL), é capaz de modular positivamente os genes de estresse oxidativo e de retículo endoplasmático, provocando um efeito quimioprotetor e antioxidante frente ao estresse causado pelo H_2O_2 (observado nos tratamentos associados com a concentração de 50 ng/mL de SeMet). Desta forma, sendo o selênio um micronutriente envolvido na manutenção da homeostase celular, ele atua nas células associando-se a inúmeras selenoproteínas. As selenoproteínas

estão relacionadas à proteção celular contra inúmeros agentes exógenos ou endógenos causadores de estresse, atuando, principalmente, como agente antioxidante e de reparo de lesões no DNA, podendo ser usado como uma linha primária na medicina preventiva.

AGRADECIMENTOS

A presente pesquisa contou com o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná.

5 REFERÊNCIAS

- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicação e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.** v. 23(4), p. 629-643, 2010.
- BARBOSA, N.B.V. Efeito de compostos orgânicos de selênio em modelos experimentais de câncer e diabetes mellitus. Santa Maria, 2006.149 p. Tese(Doutorado)– Universidade Federal de Santa Maria.
- BECK, M.A; ESWORTHY, R.S; HO, Y.S; CHU, F.F. Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis. **FASEB J.** 12:1143–49, 1998.
- BECK, M.A; LEVANDER, O.A; HANDY, J. Selenium deficiency and viral infection.**J. Nutr.** 133:1463–67S, 2003.
- BERARDINELLI, G.N.Análise de marcadores gênicos de estresse genotóxico em fibroblastos humanos normais e células de glioblastomas. 2011. Dissertação(Mestrado)– Universidade de São Paulo.
- BI, M; NACZKI, C; KORITZINSKY, M; FELS, D; BLAIS, J; HU, N; HARDING, H; NOVOA, I; VARIA, M; RALEIGH, J; SCHEUNER, D; KAUFMAN, R. J; BELL, J; RON, D; WOUTERS, B. G; KOUMENIS, C. ER stress regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. **Embo, J.** v. 24, p. 3470-81, 2005.
- BORGES, LP; NOGUEIRA, CW; ROCHA, JBT; ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chemico-Biological Interactions**, 2006.
- BURGER, ME; FACHINETTO, R; ZENI, G; ROCHA, JBT. Ebselen attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat brain. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, p. 608-615, 2005.
- COMBS, G. F; GRAY, P. G. Chemopreventive agents: Selenium. **Pharmacology and Therapeutics.** v. 79, p. 179-192, 1998.

COUX, O.; TANAKA, K. & GOLDBERG, A.L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Annu Rev Biochem**, v. 65, p. 801-47, 1996.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L.R.; Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Res**, v. 591, p. 8-15, 2005.

FERGUSON, L.R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Res**, v. 307, p. 395-410, 1994.

FERRARI, C.K.B. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. **Biogerontology**. v. 5, p. 275-9, 2004.

FORMAN, M.S; LEE, V.M; TROJANOWSKI, J.Q. "Unfolding" pathways in neurodegenerative diseases. **Trends neurosci**, 26, 407-10, 2003.

FOTAKIS, G. & TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171-177, 2006.

GREEN, K; BRAND, M.D; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**.v. 53, p. 110-8, 2004.

GRIFFIN, A. C. Role of selenium in the chemoprevention of cancer. **Adv. Cancer Res**. 29: 419-442, 1979.

HALLIWELL, B; & GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. **New York: Oxford Univ. Press**, 1999.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**. v. 142, p. 231-55, 2004.

HANDY, D. E. et al. Homocysteine Down-regulates Cellular Glutathione Peroxidase (GPx1) by Decreasing Translation, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 15518-15525, 2005.

HESKETH, J. Nutrigenomics and Selenium: Gene Expression Patterns, Physiological Targets, and Genetics. **Annu.Rev. Nutr.**, v. 28, p.157-177, 2009.

HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. **Annu Rev Genet**, v. 30, p. 405-39, 1996.

IGASE, M; OKURA, T; NAKAMURA, M; TAKATA, Y; KITAMI, Y; HIWADA, K. Role of GADD153 (growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153) in vascular smooth muscle cell apoptosis. **Clinical Science** 100, 275-281, 2001.

INOUE, J; ISHIDA, T; TSUKAMOTO, N; KOBAYASHI, N; NAITO, A; AZUMA, S; YAMAMOTO, T. Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor (TRAF) Family: Adapter Proteins That Mediate Cytokine Signaling. **Experim Cell Res**, 254, 14-24, 2000.

JARUGA, P; ZASTAWNY, T.H; SKOKOWSKI, J; DIZDAROGLU, M; OLINSKI.R. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. **FEBS Lett** 341:59e64, 1994.

KAPUT J, NOBLE J, HATIPOGLU B, KOHRS K, DAWSON K.K, BARTHOLOMEW A. Application of nutrigenomic concepts to type 2 diabetes mellitus. **Nutr.Metab.Cardiovasc.**,v. 17, p. 89-103, 2007.

KATO, S.; SADARANGANI, A.; LANGE, S.; DELPIANO, A.M.; VARGAS, M.; BRAÑES, J.; CARVAJAL, J.; LIPKOWITZ, S.; OWEN, G.I.; CUELLO, M.A; 2-methoxyestradiol mediates apoptosis through caspase-dependent and independent mechanisms in ovarian cancer cells but not in normal counterparts.**Reprod. sciences**, v.15, n. 9, 878-894, 2008.

KAUFMAN, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes Dev**, v. 13, p. 1211-1233, 1999.

KAYANOKI, Y., FUJII, J., ISLAM, K. M., SUZUKI, K., KAWATA, S., MAT-SUZAWA, Y. AND TANIGUCHI, N.The protective role of glu-tathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygenspecies.**J. Biochem.** (Tokyo) 19: 817–822, 1996.

LANFEAR, J., FLEMMING, J. J., WU, L., WEBSTER, G. AND HARRISON, P. R. The selenium metabolite selenodiglutathione induces p53 and apoptosis: relevance to the chemopreventive effects of selenium? **Carcinogenesis** 15: 1387–1392, 1994.

MA, Y. & HENDERSHOT, L.M. The role of unfolded protein response in tumour development: friend or foe? **Nat Rev Cancer**; 4:966-77, 2004.

MAURO, M.O., SARTORI, D., OLIVEIRA, R.J., ISHII, P.L., MANTOVANI, M.S., RIBEIRO, L.R. Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. **Mutation Res**, v. 715, p. 7-12, 2011.

MCCORD, J.M; & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J Biol Chem** 244: 6049 – 6055, 1969.

MCCULLOUGH, K.D; MARTINDALE, J.L; KLOTZ, L; YEE A.W, T; HOLBROOK, A.J Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. **Mol and cel biol**, 1249–1259,2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. **Journal of Immunological Methods**,v. 65, p. 55-63, 1983.

PAHL, H. L. Signal Transduction From the Endoplasmic Reticulum to the Cell Nucleus. **Physiological reviews**, v. 79, n. 3, p. 683-701 1999.

PAUL, S. Dysfunction of the ubiquitin proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches. **Bioessays**, v. 30, p.1172-84, 2008.

PENCE, B. C., STEWART, M., WALSH, L. 7 CAMERON, G. Modulation of oxidative damage to DNA by sodium selenite via the mechanism of apoptosis. In: Proceedings of the 6th

International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, Beijing, pp. 82–88, **International Life Sciences Institute**, Washington, DC, 1996.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p.1-10, 2002.

POOL-ZOBEL; B. VAN LOO, J.; ROWLAND, I.; ROBERFROID, M.B. Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. **British J. Of Nutr.**, v. 87, p. S273-S281, 2002.

PORCIÚNCULA, L.O; ROCHA, J.B.T; BOECK, C.R; CIMAROSTI, VINADE, L; H; GHISLENI, G; SALBEGO, C.G; SOUZA, D.O. Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immune-content of inducible nitric oxide synthase. **Neurosci. Lett.**, v. 346, 101-104, 2006.

RON, D & WALTER, P. Signal integration in the endoplasmicreticulum unfolded protein response. **Nature reviews: molecular cell biology**, v. 08, p. 519-529, 2007.

ROOS, W.P. & KAIN, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol Med** ;12:440e50, 2006.

SCHRAUZER, G. N. Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. **Journal of Nutrition**, p. 1653-1656, 2000.

SIGFRID, L. A. *et al.*, Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in the islets of Langerhans from the BB/S rat model of type 1 diabetes and an insulin-producing cell line, **Journal of Molecular Medicine**, v. 82, p. 325–335, 2004.

SINGH, N. P.; McCoy, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v.175, p.184-191, 1988.

SUGAYA, S; NAKANISHI, H; TANZAWA, H. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. **Mutation Research**, v.578, p.327–332, 2005.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Singlecell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

VERNIE, L. N. Inhibition of protein synthesis and anticarcinogenicity of selenium compounds. In: Proceedings of the Third International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, Vol. B, pp. 1074–1083, COMBS, G. F., JR., SPALLHOLZ, J. E., LEVANDER, O. A. & OLDFIELD, J. E. (eds.) Avi Publishing Co., Westport, 1987.

VERNIE, L. N.; HAMBURG, C. J. & BONT, W. S. Inhibition of the growth of malignant mouse lymphoid cells by selenodi-glutathione and selenocystine. **Cancer Lett.** 14: 303–308, 1981.

WOOD, Z.A; SCHRODER, E; ROBIN HARRIS, J; POOLE, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci** 28: 32–40, 2003.

WU, L., LANFEAR, J. AND HARRISON, P. R. The selenium metabolite selenodiglutathione induces cell death by a mechanism distinct from H₂O₂ toxicity. **Carcinogenesis** 16: 1579–1584, 1995.

YONEDA, T; IMAIZUMI, K; OONO, K; YUI, D; GOMI, F; KATAYAMA, T; TOHYAMA, M. Activation of Caspase-12, an Endoplasmic Reticulum (ER) Resident Caspase, through Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2-dependent Mechanism in Response to the ER Stress. **The j. of biol chem**, v. 276, n.17, p. 13935–13940, 2001.

ZASSO, F.B; GONÇALES, C.E.P; JUNG, E.A.C; ARALDI, D; ZENI, G; ROCHA, J.B.T; NOGUEIRA, C.W. On the mechanisms involved in antinociception induced by dhyphenil diselenide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. V. 19, 283- 189, 2005.

ZHOU, N; XIAO, H; LI, T.K; NUR-E-KAMAL, A; LIU, L.F. DNA damage-mediated apoptosis induced by selenium compounds. **J Biol Chem** 278:29532e7, 2003.

ZUPPINI, A; GROENENDYK, J; CORMACK, L.A., et al. Calnexin deficiency and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. **Biochemistry**, 41:2850-8, 2002.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, C.B.; LACOURCIERE, G.M.; STADTMAN, T.C. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. **Ann Rev Nutr**; v. 19, p.1–16, 1999.
- ARRIGO, A.P. Gene expression and thiol redox state. **Free Radica. Biol. Med.**, n. 27, p. 936-944, 1999.
- BARBOSA, N.B.V. **Efeito de compostos orgânicos de selênio em modelos experimentais de câncer e diabetes mellitus**. Santa Maria, 2006.149 p. Tese(Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicação e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.** v. 23(4), p. 629-643, 2010.
- BECK, M.A.; ESWORTHY, R.S.; HO Y.S.; CHU, F.F. Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis. **FASEB J.** v. 12, p. 1143–49, 1998.
- BECK, M.A.; LEVANDER, O.A.; HANDY, J. Selenium deficiency and viral infection. **J. Nutr.** v. 133, p. 1463–675, 2003.
- BERARDINELLI, G.N. Análise de marcadores gênicos de estresse genotóxico em fibroblastos humanos normais e células de glioblastomas. 2011. Dissertação(Mestrado)– Universidade de São Paulo.
- BERRY, M.J. Insights into the hierarchy of selenium incorporation. **Nature Genetics**.v. 37, p. 1162 – 1163, 2005.
- BI, M; NACZKI, C; KORITZINSKY, M; FELLS, D; BLAIS, J; HU, N; HARDING, H; NOVOA, I; VARIA, M; RALEIGH, J; SCHEUNER, D; KAUFMAN, R. J; BELL, J; RON, D; WOUTERS, B. G; KOUMENIS, C. ER stress regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. **Embo, J.** v. 24, p. 3470-81, 2005.
- BORGES, L.P.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chem-Biol. Inter.**, 2006.
- BROWN, K.M. & ARTHUR, J.R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. **P. Health Nutr.**,v. 4, p. 593-599, 2001
- BURGER, M.E.; FACHINETTO, R; ZENI, G; ROCHA, J.B.T. Ebselen attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat brain. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, p. 608-615, 2005.
- BURKE, K.E., COMBS, G.F., GROSS, E.G., BHUYAN, K.C., GROSS, E.G. & ABU LIDEH, H. The effects of topical and oral L-selenomethionine on pigmentation and skin cancer induced by ultraviolet irradiation. **Nutr. Cancer**, v. 17, p. 123–137, 1992.
- COMBS, G.F.; GRAY, P.G. Chemopreventive agents: Selenium. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 79, p. 179-192, 1998.
- COMBS, G.F. Selenium in global food systems. **Brit. J. of Nutr.**v. 85, p. 517–547, 2001.

- COUX, O.; TANAKA, K. & GOLDBERG, A.L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Annu Rev Biochem**, v. 65, p. 801-47, 1996.
- DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.
- DE FLORA, S.; FERGUSON, L.R.; Overview of mechanisms of câncer chemopreventive agentes. **Mutation Res**, v. 591, p. 8-15, 2005.
- DIPLOCK, A.T. Antioxidants and disease prevention. **Mol Aspects Med**; v. 15, p. 293–376, 1994.
- DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today., **J. Natl Cancer Inst.**, v. 66, p. 1191-1308, 1981.
- DUSSAULT, A. & POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR, **Biol. Proced. Online**, v. 8(1), p. 1-10, 2006.
- EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chem Tox**, v. 40, p. 93-236, 2002.
- FERGUSON, L.R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Res**, v. 307, p. 395-410, 1994.
- FERRARI, C.K.B. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. **Biogerontology**. v. 5, p. 275-9, 2004.
- FERREIRA, S.F.; GOMES, J.C.; BELLATO, C.R.; JORDÃO, C.P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health** 11(3), 2002.
- FLEMING, J; GHOSE, A; HARRISON, P.R. Molecular mechanisms of cancer prevention by selenium compounds. **Nutr. Cancer** , v. 40, p. 42-49, 2001.
- FOGG-JOHNSON, N.; KAPUT, J. Nutrigenomics: An Emerging Scientific Discipline. **Food Technol.**, v. 57 (4), p. 60-67, 2003.
- FORMAN, M.S; LEE, V.M; TROJANOWSKI, J.Q. “Unfolding” pathways in neurodegenerative diseases. **Trends neurosci**, 26, 407-10, 2003.
- FOTAKIS, G. & TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Tox Letters**, v. 160, p. 171-177, 2006.
- GANTHER, H.E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1657–1666, 1999.
- GIERUS, M. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.37, n.4, p.1212-1220, 2007.

- GONTIJO, A M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, p.247-279, 2003.
- GREEN, K; BRAND, M.D; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**.v. 53, p. 110-8, 2004.
- GRIFFIN, A. C. Role of selenium in the chemoprevention of cancer. **Adv. Cancer Res.** 29: 419–442, 1979.
- GRUNBLATT, E. et al., Gene expression analysis in N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice model of Parkinson's disease using cDNA microarray: effect of R- apomorphine, **J. of Neurochem.**, v. 78, p. 1-12, 2001.
- HALLIWELL, B; & GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. **New York: Oxford Univ. Press**, 1999.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.** v. 142, p. 231-55, 2004.
- HANDY, D.E. et al., Homocysteine Down-regulates Cellular Glutathione Peroxidase (GPx1) by Decreasing Translation, **The J. of Biol. Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 15518–15525, 2005.
- HATFIELD, D.L. & GLADYSHEV, V.N. How selenium has altered our understanding of the genetic code. **Mol. Cell. Biol.** v.22, p. 3565–3576, 2002.
- HESKETH, J. Nutrigenomics and Selenium: Gene Expression Patterns, Physiological Targets, and Genetics. **Annu.Rev. Nutr.**, v. 28, p.157-177, 2009.
- HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. **Annu Rev Genet**, v. 30, p. 405-39, 1996.
- HONDAL, R.J.; MOTLEY, A.K.; HILL, K.E.; BURK, R.F. Failure of selenomethionine residues in albumin and immunoglobulin G to protect against peroxynitrite. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 371, p. 29–34, 1999.
- IGASE, M; OKURA, T; NAKAMURA, M; TAKATA, Y; KITAMI, Y; HIWADA, K. Role of GADD153 (growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153) in vascular smooth muscle cell apoptosis. **Clinical Science** 100, 275–281, 2001.
- INOUE, J; ISHIDA, T; TSUKAMOTO, N; KOBAYASHI, N; NAITO, A; AZUMA, S; YAMAMOTO, T. Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor (TRAF) Family: Adapter Proteins That Mediate Cytokine Signaling. **Experim Cell Res**, 254,14 –24, 2000.
- IP, C. & GANTHER, H.E. Comparison of selenium and sulfur analogs in cancer prevention. **Carcinogenesis**, v.13, p. 1167–1170, 1992.
- IP, C.; THOMPSON, H.J.; ZHU, Z.; GANTHER, H.E. In vitro and in vivo studies of methylseleninic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention. **Cancer Res**, v. 60, p. 2882–2886, 2000.

- JARUGA, P.; ZASTAWNY, T.H; SKOKOWSKI, J; DIZDAROGLU, M; OLINSKI, R. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. **FEBS Lett** 341:59e64, 1994.
- KAPUT, J.; RODRIGUEZ, R.L. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. **Physiol Genomics**, v. 16, p. 166–177, 2004.
- KAPUT, J.; NOBLE, J.; HATIPOGLU, B.; KOHRS, K.; DAWSON, K.K.; BARTHOLOMEW, A. Application of nutrigenomic concepts to type 2 diabetes mellitus. **Nutr.Metab.Cardiovasc.**,v. 17, p. 89-103, 2007a.
- KAPUT, J.; PERLINA, A.; HATIPOGLU, B.; BARTHOLOMEW, A.; NIKOLSKY, Y. Nutrigenomics: concepts and applications to pharmacogenomics and clinical medicine. **Pharmacogenomics**, v. 8(4), p. 369-90, 2007b.
- KATO, S.; SADARANGANI, A.; LANGE, S.; DELPIANO, A.M.; VARGAS, M.; BRAÑES, J.; CARVAJAL, J.; LIPKOWITZ, S.; OWEN, G.I.; CUELLO, M.A; 2-methoxyestradiol mediates apoptosis through caspase-dependent and independent mechanisms in ovarian cancer cells but not in normal counterparts. **Reprod. sciences**,v. 15, n. 9, 878-894, 2008.
- KAUFMAN, R.J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes Dev**, v. 13, p. 1211-1233, 1999.
- KAYANOKI, Y., FUJII, J., ISLAM, K. M., SUZUKI, K., KAWATA, S., MAT-SUZAWA, Y. AND TANIGUCHI, N. The protective role of glu-tathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species. **J. Biochem.** (Tokyo) 19: 817–822, 1996.
- KOLONEL, L.N.; HENDERSON, B.E.; HANKIN, J.H.; NOMURA, A.M.; WILKENS, L. R.; PIKE, M.C.; STRAM, D.O.; MONROE, K.R.; EARLE, M.E.; NAGAMINE, F.S.A. multiethnic cohort in Hawaii and Los Angeles: baseline characteristics. **Am. J. Epidemiol**, v.151, p. 346–357, 2004.
- KRYUKOV, G.V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S.V.; LOBANOV, A.V.; ZEHTAB, O.; GUIGÓ, R.; GLADYSHEV, V.N. Characterization of Mammalian Selenoproteomes. **Science**, v. 300 (5624), p. 1439 – 1443, 2003.
- LANFEAR, J., FLEMMING, J. J., WU, L., WEBSTER, G. AND HARRISON, P. R. The selenium metabolite selenodiglutathione induces p53 and apoptosis: relevance to the chemopreventive effects of selenium? **Carcinogenesis** 15: 1387–1392, 1994.
- LARSSON, A. et al. (Ed.). Functions of glutathione. Biochemical, physiological toxicological and clinical aspects. **New York: Raven**, 1983.
- MA, Y. & HENDERSHOT, L.M. The role of unfolded protein response in tumour development: friend or foe? **Nat Rev Cancer**; 4:966-77, 2004.
- MAURO, M.O., SARTORI, D., OLIVEIRA, R.J., ISHII, P.L., MANTOVANI, M.S., RIBEIRO, L.R. Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. **Mutation Res**, v. 715, p. 7-12, 2011.

- MCCORD, J.M; & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **J Biol Chem** 244: 6049 – 6055, 1969.
- MCCULLOUGH, K.D. et al. Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State, **Mol and Cellular Biology**, v. 21, n. 4, p. 1249–1259, 2001.
- MOCELLIN, S. et al. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. **T. in Molecular Med.**, v. 9, p. 189-195, 2003.
- MORAES, S.S. et al. Microelement deficiencies and imbalances in cattle and sheep in some regions of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, n.1, p.19-33, 1999.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. **J. of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MUSHAK, P. Potential impact of acid precipitation on arsenic and selenium. **Environ Health Perspect** v. 63, p. 105–113, 1985.
- NÉVE, J. Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. **J Cardiovasc Risk**; v. 3, p. 42–47, 1996.
- PAHL, H.L. Signal Transduction From the Endoplasmic Reticulum to the Cell Nucleus. **Physiological reviews**, v. 79, n. 3, p. 683-701 1999.
- PAPP, L.V.; LU, J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K.K. From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. **Antioxidants & redox signaling**, v. 9, n. 7, p. 775-806, 2007.
- PAUL, S. Dysfunction of the ubiquitin proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches. **Bioessays**, v. 30, p.1172-84, 2008.
- PENCE, B. C., STEWART, M., WALSH, L. 7 CAMERON, G. Modulation of oxidative damage to DNA by sodium selenite via the mechanism of apoptosis. In: Proceedings of the 6th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, Beijing, pp. 82–88, **International Life Sciences Institute**, Washington, DC, 1996.
- PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p.1-10, 2002.
- POOL-ZOBEL, B.; VAN LOO, J.; ROWLAND, I.; ROBERFROID, M.B. Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. **Brit J. Of Nutr**, v. 87, p. S273-S281, 2002.
- PORCIÚNCULA, L.O.; ROCHA, J.B.T.; BOECK, C.R.; VINADE, L.H.; GHISLENI, G.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O. Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immune-content of inducible nitric oxide synthase. **Neuroscience Letter**, v:346, 101-104, 2006.
- RAMAKRISHNAN, N.; KALINICH, J.F.; MACCLAIN, D.D. Ebselen inhibition of apoptosis by reduction of peroxides. **Biochem Pharmacology**, v: 51, p. 1443-1451, 1996

RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health. **The Lancet**, v. 356, p. 233–41, 2000.

RAYMAN, M.P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 64, p. 527–542, 2005.

RIKIISHI, H. Apoptotic cellular events for selenium compounds involved in cancer prevention. **J. Bioenergy Biomembrane**, v. 39, p. 91–98, 2007.

RON, D & WALTER, P. Signal integration in the endoplasmicreticulum unfolded protein response. **Nature reviews: molecular cell biology**, v. 08, p. 519-529, 2007.

ROOS, W.P. & KAIN, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol Med** ;12:440e50, 2006.

SCHRAUZER, G.N. Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. **J. of Nutr**, p. 1653-1656, 2000.

SHIMAZU, F. & TAPPEL, A.L. Selenoamino acids decrease radiation damage to amino acids and proteins. **Science**, v. 143, p. 69–371, 1964.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, n. 27, p. 916-921, 1999.

SIGFRID, L. A. *et al.*, Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in the islets of Langerhans from the BB/S rat model of type 1 diabetes and an insulin-producing cell line, **J. of Molecular Med**, v. 82, p. 325–335, 2004.

SINGH, N.P.; McCoy, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SONG, L.H. *et al.* Gene expression profiles in the liver of mice irradiated with ⁶⁰Co gamma rays and treated with soybean isoflavone, **Europe J. of Nutr** v. 45, p. 406–417, 2006.

SPALHOZ, J.E.; SHRIVER, B.J.; REID, T.W. Dimethyldiselenide and methylseleninic acid generate superoxide in vitro chemiluminescence assay in the presence of glutathione: implications for the anticarcinogenic activity of L-selenomethionine and L-Se-methylselenocysteine. **Nutr Cancer**, v.40, p. 34-41, 2001.

STADTMAN, T.C. Mammalian selenoenzymes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 399-402, 2000.

SUGAYA, S; NAKANISHI, H; TANZAWA, H. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. **Mutation Research**, v.578, p.327–332, 2005.

SUNDE, R.A. Selenium. Em: O'DELL, B. L, SUNDE, R. A, eds. **Handbook of nutritionally essential mineral elements**. New York: Marcel Dekker Inc, p. 493–556, 1997.

SURAI, P. Selenium in Nutrition and Health. Nottingham: **Nottingham University Press**, 2006.

TEW, K.D.; GATÉ, L. Glutathione S-transferases as emerging therapeutic targets. **Cancer Lett.** v. 5(4), p. 477-489, 2001.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Singlecell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. **Adv Physiol Educ**, v. 29, p. 151-159, 2005.

VELLONEN, K.S.; HONKAKOSKI, P.; URTTI, A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. **European J. of Pharmaceutical Sciences**, v.23, p.181-188, 2004.

VERNIE, L. N. Inhibition of protein synthesis and anticarcinogenicity of selenium compounds. In: Proceedings of the Third International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, Vol. B, pp. 1074–1083, COMBS, G. F., JR., SPALLHOLZ, J. E., LEVANDER, O. A. & OLDFIELD, J. E. (eds.) Avi Publishing Co., Westport, 1987.

VERNIE, L. N.; HAMBURG, C. J. & BONT, W. S. Inhibition of the growth of malignant mouse lymphoid cells by selenodi-glutathione and selenocystine. **Cancer Lett.** 14: 303–308, 1981.

VIARO, R.S.; VIARO, M.S.; FLECK, J. Importância bioquímica do selênio para o organismo humano. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciên. Biol. e da Saúde, Santa Maria, v.2, n.1, p.17-21, 2001.

VOEHRINGER, D.W. BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. **Free Radical Biology & Medicine**, n. 27, p. 945-950, 1999.

WHANGER, P.D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 21, p. 223–232, 2002.

WHANGER, P.D. Selenium and its relationship to cancer: an update dagger. **Brit. J. Nutr.**, v. 91, p. 11–28, 2004.

WOOD, Z.A; SCHRODER, E; ROBIN HARRIS, J; POOLE, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci** 28: 32–40, 2003.

WU, L., LANFEAR, J. AND HARRISON, P. R. The selenium metabolite selenodiglutathione induces cell death by a mechanism distinct from H₂O₂ toxicity. **Carcinogenesis** 16: 1579–1584, 1995.

YONEDA, T; IMAIZUMI, K; OONO, K; YUI, D; GOMI, F; KATAYAMA, T; TOHYAMA, M. Activation of Caspase-12, an Endoplasmic Reticulum (ER) Resident Caspase, through Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2-dependent Mechanism in Response to the ER Stress. **The j. of biol chem**, v. 276, n.17, p. 13935–13940, 2001.

ZAMORANO, P.L.; MAHESH, V.B.; BRANN, D.W. Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies: a minireview. **Neuroendocrinology**, v. 63, p. 397–407, 1996.

ZASSO, F.B.; GONÇALES, C.E.P.; JUNG, E.A.C.; ARALDI, D.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. On the mechanisms involved in antinociception induced by dhyphenil diselenide. **Envir Tox and Pharmacology**. V. 19, 283- 189, 2005.

ZHOU, N; XIAO, H; LI, T.K; NUR-E-KAMAL, A; LIU, L.F. DNA damage-mediated apoptosis inducedby selenium compounds. **J Biol Chem** 278:29532e7, 2003.

ZUPPINI, A; GROENENDYK, J; CORMACK, L.A., et al. Calnexin deficiency and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. **Biochemistry**, 41:2850-8, 2002.

ANEXOS

Tabela 1 - Valores de absorbância (média ± desvio padrão) para os tratamentos com SeMet no ensaio MTT

	ABS. MÉDIA ± DESVIO PADRÃO
Controle	0,853 ± 0,069
H ₂ O ₂ (80 uM)	0,256 ± 0,031
SeMet 5 ng/mL	0,847 ± 0,018
SeMet 50 ng/mL	0,875 ± 0,044
SeMet 100 ng/mL	0,833 ± 0,058
SeMet 250 ng/mL	0,819 ± 0,069
SeMet 500 ng/mL	0,792 ± 0,084
SeMet 1000 ng/mL	0,625 ± 0,030
SeMet 2000 ng/mL	0,498 ± 0,042

Tabela 2 - Valores de absorbância (média ± desvio padrão) para os tratamentos associados no ensaio MTT

	ABS. MÉDIA ± DESVIO PADRÃO
Controle	0,844 ± 0,061
H ₂ O ₂ (80 uM)	0,223 ± 0,040
SeMet 5 ng/mL + H ₂ O ₂	0,265 ± 0,034
SeMet 50 ng/mL + H ₂ O ₂	0,43 ± 0,042
SeMet 100 ng/mL + H ₂ O ₂	0,433 ± 0,058
SeMet 250 ng/mL + H ₂ O ₂	0,446 ± 0,053
SeMet 500 ng/mL + H ₂ O ₂	0,456 ± 0,037
SeMet 1000 ng/mL + H ₂ O ₂	0,292 ± 0,047
SeMet 2000 ng/mL + H ₂ O ₂	0,170 ± 0,015

Tabela 3 - Valores (média ± desvio padrão) do ensaio morfológico do cometa

	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO
Controle	21,16 ± 4,70
H ₂ O ₂ (80 uM)	82,16 ± 8,01
SeMet 5 ng/mL	21,33 ± 6,12
SeMet 50 ng/mL	23,50 ± 6,71
SeMet 500 ng/mL	41,16 ± 11,3
SeMet 5 ng/mL + H ₂ O ₂	83,00 ± 9,25
SeMet 50 ng/mL + H ₂ O ₂	53,83 ± 11,61
SeMet 500 ng/mL + H ₂ O ₂	73,16 ± 9,80

Tabela 4 - Valores (média ± desvio padrão) do comet length

	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO
Controle	52,94 ± 13,63
H ₂ O ₂ (80 uM)	147,66 ± 19,64
SeMet 5 ng/mL	53,36 ± 7,40
SeMet 50 ng/mL	53,88 ± 7,68
SeMet 500 ng/mL	67,64 ± 11,32
SeMet 5 ng/mL + H ₂ O ₂	148,72 ± 20,69
SeMet 50 ng/mL + H ₂ O ₂	129,11 ± 24,17
SeMet 500 ng/mL + H ₂ O ₂	119,63 ± 21,90

Tabela 5 - Valores (média \pm desvio padrão) do tail moment

	MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO
Controle	1,86 \pm 1,63
H ₂ O ₂ (80 μ M)	41,89 \pm 17,44
SeMet 5 ng/mL	3,55 \pm 2,52
SeMet 50 ng/mL	3,23 \pm 2,33
SeMet 500 ng/mL	7,21 \pm 3,78
SeMet 5 ng/mL + H ₂ O ₂	40,95 \pm 13,67
SeMet 50 ng/mL + H ₂ O ₂	27,97 \pm 16,16
SeMet 500 ng/mL + H ₂ O ₂	33,07 \pm 14,31

Tabela 6 - Valores de expressão gênica transcricional no tratamento com SeMet 50 ng/mL

	Controle	H₂O₂	SeMet	SeMet + H₂O₂
<i>GPX1</i>	1,00	2,422	0,946	1,262
<i>SOD</i>	1,00	1,647	0,71	0,533
<i>CAT</i>	1,00	0,897	1,00	0,575
<i>ERN1</i>	1,00	2,554	0,398	1,059
<i>GADD153</i>	1,00	2,367	0,783	1,093
<i>TRAF2</i>	1,00	1,588	0,305	0,577
<i>CASP9</i>	1,00	1,798	0,446	1,396

Tabela 7 - Valores de expressão gênica transcricional no tratamento com SeMet 500 ng/mL

	Controle	H₂O₂	SeMet	SeMet + H₂O₂
<i>GPX1</i>	1,00	1,881	1,97	1,82
<i>SOD</i>	1,00	2,061	2,554	3,344
<i>CAT</i>	1,00	0,717	1,233	0,679
<i>ERN1</i>	1,00	4,943	4,758	6,078
<i>GADD153</i>	1,00	5,00	9,283	5,593
<i>TRAF2</i>	1,00	1,588	1,988	1,992
<i>CASP9</i>	1,00	1,808	1,746	1,796