



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATANAEL ENDREW SOUTO MAIOR TORRES BONFIM

**ALTERAÇÕES CELULARES INDUZIDAS POR
TRATAMENTO COM SELENITO DE SÓDIO EM LINHAGEM
HACAT (NÃO-TUMORAL)**

NATANAEL ENDREW SOUTO MAIOR TORRES BONFIM

**ALTERAÇÕES CELULARES INDUZIDAS POR
TRATAMENTO COM SELENITO DE SÓDIO EM LINHAGEM
HACAT (NÃO-TUMORAL)**

Dissertação de mestrado 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. Mario Sérgio Mantovani*

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Torres Bonfim, Natanael Andrew Souto Maior .

Alterações celulares induzidas por tratamento com selenito de sódio em linhagem HaCaT (não-tumoral) / Natanael Andrew Souto Maior Torres Bonfim. - Londrina, 2016. 98 f. : il.

Orientador: Mario 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, 2016. Inclui bibliografia.

1. Citotoxicidade - Tese. 2. antiproliferação - Tese. 3. mecanismo de ação - Tese. 4. selenito de sódio - Tese. I. Mantovani, Mario Sérgio . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

NATANAEL ENDREW SOUTO MAIOR TORRES BONFIM

**ALTERAÇÕES CELULARES INDUZIDAS POR TRATAMENTO COM
SELENITO DE SÓDIO EM LINHAGEM HACAT (NÃO-TUMORAL)**

Dissertação de mestrado 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

Prof. Dr. Mario Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Giuliana Castello Coatti
Universidade de São Paulo – USP

Dra. Silvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina 21 de fevereiro 2017

Bonfim, Natanael Andrew Souto Maior Torres. **Alterações celulares induzidas por tratamento com selenito de sódio em linhagem HaCaT (não-tumoral)**. 2017. 98f Trabalho de Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2017

RESUMO

Diversos estudos indicam o selenito de sódio (uma forma inorgânica do micronutriente selênio) como um composto com potencial para o tratamento do câncer. Análises em linhagens de células tumorais têm demonstrado a ação apoptótica, anti-carcinogênica e quimiopreventiva deste composto. No entanto, o seu mecanismo de ação em linhagens de células não-tumorais ainda é pouco compreendido, sendo este, um importante requisito para o desenvolvimento de novas drogas. As células de linhagem não-tumoral de queratinócitos – HaCat, têm se mostrado um excelente modelo para estudos toxicológicos. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico (ensaio do MTT), a genotoxicidade (ensaio do cometa) e o mecanismo de ação (expressão gênica por qRT-PCR) do selenito de sódio em células HaCat, e analisar os seus efeitos na membrana celular, interferência no ciclo celular e indução de apoptose por citometria de fluxo. Os resultados demonstram que o tratamento com selenito de sódio por 24h de exposição apresentou citotoxicidade a partir da concentração de 10 μ M, apresentando alterações no padrão morfológico das células com o aparecimento de grânulos citoplasmáticos, porém não apresentou efeito genotóxico. Os dados obtidos por meio da citometria de fluxo revelaram que o selenito de sódio foi indutor de danos na membrana celular, de apoptose, e interfere no ciclo celular. Em 12h de tratamento com 10 μ M do selenito de sódio, notou-se redução significativa na expressão dos genes *mTOR* e *ATR* e um aumento na expressão do gene *PUMA* em relação ao controle. Entretanto, não foi encontrado alteração significativa na expressão das caspases (*CASP 3*, *CASP 7*, *CASP 8* e *CASP 9*) bem como dos genes *PARP 1*, *BIRC 5*, *BECN 1* e *c-MYC*, o que indica que o selenito de sódio induz a apoptose por mecanismo independente de caspases em células HaCat. Além disso, os genes analisados relacionados ao estresse oxidativo (*CATB*, *GPX 1* e *SOD 1*), e os demais envolvidos no dano e reparo do DNA (*ATM*, *GADD 45A*, *H2AX* e *MDM 2*) e no ciclo celular (*CCNA 1*, *CCNB 1*, *CCNB 2*, *CCND 1*, *CHK 1*, *CHK 2*, *p53* e *p21*) não apresentaram alteração significativa quando comparados com o controle. Através da análise de cinética celular em tempo real notou-se que o selenito de sódio interfere na proliferação de queratinócitos por, pelo menos, 72h após o tratamento. Com base nos efeitos relatados, pode-se inferir que o selenito de sódio apresenta um efeito tóxico para as células não-tumorais em concentrações que são semelhantes a testes em linhagens células tumorais, alterando o padrão morfológico e a curva de proliferação celular, modulando o padrão de expressão gênica induzindo a célula à apoptose mediado pelo PUMA.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Antiproliferação. Mecanismo de ação. Selenito de sódio

Bonfim, Natanael Andrew Souto Maior Torres. **Cellular alterations induced by sodium selenite treatment in HaCaT cell line (non-tumoral)**. 2017. 98p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) - Department of General Biology, Center of Biological Sciences - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2017

ABSTRACT

Several studies indicate sodium selenite (an inorganic form of the selenium micronutrient) as a compound with potential for the treatment of cancer. Analyzes in tumor cell lines there are demonstrated the apoptotic, anti-carcinogenic and chemopreventive action of this compound. However, its mechanism of action in non-tumor cell lines is still poorly understood, and this is an important requirement for the development of new drugs. Non-tumor cell lines of keratinocytes-HaCat, have been shown to be an excellent model for toxicological studies. This study evaluated the cytotoxic potential (MTT assay), genotoxicity (comet assay) and mechanism of action (qRT-PCR gene expression) of sodium selenite in HaCat cells, and to analyze its effects in the cell membrane, interference in the cell cycle and induction of apoptosis by flow cytometry. The results show that treatment with sodium selenite for 24h was cytotoxic from the concentration of 10 μ M, presenting changes in cell morphology with the appearance of cytoplasmic granules, but did not resulted in genotoxic effect. The flow cytometry data showed the sodium selenite was inducer of cell membrane damage, apoptosis, and interferes with the cell cycle. In 12h treatment sodium selenite 10 μ M, significant reduction in *mTOR* and *ATR* gene expression and an increase in *PUMA* gene expression was observed in relation to the control. However, there was no significant change in the expression of caspases (*CASP 3*, *CASP 7*, *CASP 8* and *CASP 9*) as well as *PARP 1*, *BIRC 5*, *BECN 1* and *c-MYC* genes, indicating that sodium selenite induces Apoptosis by caspase-independent mechanism in HaCat cells. In addition, the analyzed genes related to oxidative stress (*CAT B*, *GPX 1* and *SOD 1*), and the others involved in DNA damage and repair (*ATM*, *GADD 45A*, *H2AX* and *MDM 2*) and in the cell cycle (*CCNA 1*, *CCNB 1*, *CCNB 2*, *CCND 1*, *CHK 1*, *CHK 2*, *p53* and *p21*) showed no significant change when compared to the control. Through the real-time cell kinetics analysis we noticed that sodium selenite interferes in the proliferation of HaCat for at least 72h after treatment. Our results suggest that sodium selenite has a toxic effect to non-tumor cells at such like concentration in tumor cell lines tests, altering the morphological arrangement and the cell proliferation curve, modulating the pattern of gene expression , and inducing the cell to PUMA-mediated apoptosis.

Keywords: Cytotoxicity. Antiproliferation. Action mechanism. sodium selenite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação das formas mais comuns do Selênio. Fonte: Adaptado de (SUZUKI, 2005).....	18
Figura 2 -	Representação da estrutura do selenito de sódio. (CAS:10102-18-8).....	21
Figura 3 -	Células HaCat (200 X). Imagem obtida através do microscópio óptico EVOS™ FL <i>Auto Cell Imaging System</i> (ThermoFisher Scientific).....	38
Figura 4 -	Esquema da condição de cultura das linhagens celulares.....	84
Figura 5 -	Esquema da metodologia realizada no ensaio de citotoxicidade-MTT.....	84
Figura 6 -	Esquema da metodologia realizada no ensaio de cinética de proliferação celular.....	85
Figura 7 -	Esquema da metodologia realizada no teste do cometa.....	86
Figura 8 -	Esquema da metodologia realizada na análise por citometria de fluxo.....	87
Figura 9 -	Esquema da metodologia realizada na análise da expressão gênica.....	88
Figura 10 -	Valores da viabilidade celular da linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80µM de selenito de sódio no período de 24h. As barras representam as médias ± desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*) em relação ao controle negativo.....	60
Figura 11 -	Células HaCat após 24h de tratamento com Selenito de sódio a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80µM. Microscópio EVOS® FL <i>Auto Cell Imaging System</i> (Thermo Fisher) com aumento de 200X.....	61
Figura 12 -	Curva de Proliferação Celular da linhagem HaCat, tratada com selenito de sódio nas concentrações de 5, 10, 20 e 40µM e controle positivo tratado com camptotecina a 0,5µM. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*) em relação ao controle negativo.....	63
Figura 13 -	Células HaCat após 24h de tratamento com selenito de sódio nas concentrações de 10µM, 20µM e 40µM. Microscópio EVOS® FL <i>Auto Cell Imaging System</i> (Thermo Fisher) com aumento de 200X.....	89
Figura 14 -	Células HaCat após 72h de tratamento com selenito de sódio a 10, 20 e 40µM na placa de RTCA. Microscópio EVOS® FL <i>Auto Cell Imaging System</i> (Thermo Fisher) com aumento de 200X.....	90

Figura 15 -	Média dos valores de %DNA <i>in tail</i> linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20 e 40µM de selenito de sódio no período de 3h. As barras representam o desvio. Não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.....	64
Figura 16 -	Imagem representativa analisadas pelo programa <i>CometScore</i> . versão 1.5 (TriTek-Corp, USA) 2004, capturadas através do Microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) com aumento de 200X.....	91
Figura 17 -	Valores da viabilidade celular da linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20 e 40µM de Selenito de sódio no período de 24h através da citometria de fluxo. As barras representam as médias ± desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística $p \leq 0,05(*)$	65
Figura 18 -	Valores da integridade da membrana celular da linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20 e 40µM de selenito de sódio no período de 24h. As barras representam as médias ± desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística $p \leq 0,05(*)$	66
Figura 19 -	Valores médios da concentração celular da linhagem HaCat referente aos tratamentos de 10, 20 e 40µM de selenito de sódio no período de 24h. As barras representam as médias ± desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística $p \leq 0,05 (*)$	67
Figura 20 -	Valores médios da distribuição do celular por citometria de fluxo (PI) da linhagem HaCat referente aos tratamentos de 10, 20 e 40µM de selenito de sódio no período de 24h. A) As barras representam as médias ± desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística $p \leq 0,05 (*)$ comparado ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett. B) Representação dos histogramas apresentado pelo programa GuavaSoft 2.7. Na imagem destacam-se as populações G1 (rosa), S (verde) e G2/M (azul). Gráficos representativos de uma repetição cujo resultado foi similar aos demais.....	68

Figura 21 -	Expressão relativa dos genes envolvidos em: A) ciclo celular (<i>CCNA 1, CCNB 1, CCNB 2, CCND 1, CHK 1, CHK 2, mTOR, p53 e p21, c-MYC</i>); B) danos ao DNA (<i>ATM, ATR, GADD 45A, H2AX, MDM 2 e PARP 1</i>); C) estresse oxidativo (<i>CAT B, GPX 1 e SOD 1</i>); e D) morte celular (<i>CASP 3, CASP 7, CASP 8, CASP 9, BIRC 5, BECN 1 e PUMA</i>) na linhagem HaCat tratadas 10µM de selenito de sódio em um período de 12h. O gene RPL-13A como gene constitutivo. Diferença estatística $p \leq 0,05(*)$ em relação ao constitutivo. Razão de corte ≥ 2 (#)	70
Figura 22 -	Média dos valores de %DNA <i>in tail</i> e linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20 e 40µM de Selenito de sódio no período de 3h. Não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle	91
Figura 23 -	Valores da integridade da membrana celular da linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20 e 40µM de selenito de sódio no período de 24h. As barras representam as médias \pm desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística $p \leq 0,05(*)$	92
Figura 24 -	Valores da viabilidade celular da linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20 e 40µM de selenito de sódio no período de 24h através da citometria de fluxo. A). As barras representam as médias \pm desvio padrão. Diferença estatística $p \leq 0,05(*)$. B) gráficos em <i>dotplot</i> representativo dos tratamentos	93
Figura 25 -	Valores médios da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo da linhagem HaCat referente aos tratamentos de 10, 20 e 40µM de selenito de sódio no período de 24h. A) Barras das médias \pm desvio padrão. Diferença estatística $p \leq 0,05 (*)$. B) Representação dos histogramas	94
Figura 26 -	Esquema representativo da ação do selenito de sódio em células HaCat. A literatura indica que entrada do composto é dada por transporte facilitado (GANYC; SELF, 2008), e ao entrar na célula ele pode: interferir na polimerização dos filamentos de tubulina (LEYNADIER et al., 1991), e de actina (BANDURA et al., 2005),	

em altas concentrações pode ter ação pró-oxidante induzindo a formação de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) (SHEN; SONG; PENCE, 2001). Nossos dados mostraram que, o selenito de sódio, atua induzindo danos na membrana plasmática, estimula a formação de grânulos citoplasmáticos, incita a instabilidade genômica suprimindo a expressão dos genes envolvidos no ciclo celular (*mTOR*) e dano no DNA (*ATR*), e potencializa a expressão do gene *PUMA*, sendo um indicativo de provocar morte celular p53-independente..... 73

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Lista dos primers utilizados para a análise da expressão gênica e suas respectivas sequências	95
Tabela 2 -	Dados obtidos pelo ensaio de citotoxicidade	96
Tabela 3 -	Valores médios dos dados obtidos pela quantificação de RNA total por espectrofotometria	69
Tabela 4 -	Resultados detalhados do RT-PCR em tempo real dos genes analisados. Calculado de acordo com o método $\Delta\Delta C_t$ descrito por Livak e Schmittgen, 2001 e significância calculada pelo <i>Rest Software</i>	96
Tabela 5 -	Resultados detalhados da quantificação de RNA total por espectrofotometria.....	98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	A Genética Toxicológica	15
2.1.1	Ensaio in vitro	16
2.2	O Selênio	18
2.2.1	Efeitos biológicos do selênio	20
2.2.2	Selenito de sódio	22
2.3	Determinando o Mecanismos de Ação de Compostos	24
2.3.1	Expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo	25
2.3.1.1	CAT	26
2.3.1.2	GPX1	26
2.3.1.3	SOD1	27
2.3.2	Expressão de genes relacionados ao ciclo celular	27
2.3.2.1	Ciclinas	28
2.3.2.2	Checkpoint	29
2.3.2.3	mTOR	30
2.3.2.4	TP53	30
2.3.2.5	P21	31
2.3.2.6	C-MYC	31
2.3.3	Expressão de genes relacionados a danos ao DNA	32
2.3.3.1	ATM – ATR	32
2.3.3.2	GADD45A	33
2.3.3.3	H2AX	34
2.3.3.4	MDM2	34
2.3.3.5	PARP1	34
2.3.4	Expressão de genes relacionados a morte celular	35
2.3.4.1	Caspases	36
2.3.4.2	BIRC5	37
2.3.4.3	BECN1	37
2.3.4.4	PUMA	38
2.4	Linhagem HaCat	40

3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivos Específicos	42
4	REFERÊNCIAS	43
5	ARTIGO	53
	INTRODUÇÃO	54
	MATERIAIS E METODOS	56
	Linhagem Celular e Condições de Cultura	56
	Agentes Químicos	56
	Ensaio de Citotoxicidade - MTT	56
	Análise Celular em Tempo Real (RTCA)	57
	Avaliação de genotoxicidade	57
	Análise por Citometria de Fluxo	58
	Morte celular	59
	Integridade de membrana	59
	Concentração celular	59
	Análise do ciclo celular	61
	Análise de Expressão Gênica	61
	Análises Estatísticas	62
	RESULTADOS	63
	Ensaio de citotoxicidade – MTT	63
	Índice celular em tempo real (RTCA)	65
	Ensaio do Cometa	67
	Análise de apoptose por citometria de fluxo	68
	Análise da integridade de membrana por citometria de fluxo	69
	Concentração celular por citometria de fluxo	70
	Análise de ciclo celular por citometria de fluxo	72
	Expressão Gênica	73
	DISCUSSÃO	75
	CONCLUSÃO GERAL	78
	REFERÊNCIAS	79
6	APÊNDICE	89

1 INTRODUÇÃO GERAL

Diversos estudos na literatura relatam a importância do selênio como um elemento essencial para o funcionamento das células, vinculado, sobretudo, à sua ação antioxidante. Tais estudos mostram que a deficiência desse micronutriente está diretamente relacionada no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cânceres, cirrose, diabetes entre outros (AL-BADER et al., 1998; LOSCALZO, 2014; REDDI; BOLLINENI, 2001).

Uma das formas inorgânicas do selênio, o selenito de sódio, vem sendo amplamente utilizada em suplementos alimentares como fonte de selênio para o corpo humano, e tem sido alvo de diversos experimentos com linhagens de células tumorais, nos quais demonstram seu potencial como agente quimioterápico contra o câncer por induzir, principalmente, a apoptose em células tumorais. No entanto, dados relacionados à sua capacidade citotóxica e genotóxica em células não-tumorais ainda são escassos.

Através da caracterização do mecanismo de ação do selenito de sódio pode-se compreender seu efeito na expressão gênica e na morfologia celular dos genes envolvidos na apoptose e progressão do ciclo celular em células não tumorais, o que fornece importantes informações sobre os processos prejudiciais ou benéficos para a homeostase celular. Tal caracterização têm contribuído no processo de desenvolvimento de novos medicamentos, particularmente no que se refere ao desenvolvimento de quimioterápicos tratamentos para doenças humanas com etiologias complexas e variadas, determinando o seu alvo na célula com o objetivo de estabelecer o mecanismo de ação do agente em estudo (BHOGAL; BALLS, 2008).

A utilização de linhagens de células não tumorais modelo para estudos toxicológicos, como a linhagem de queratinócitos HaCat por exemplo, pode contribuir para o estudo do efeito do selenito de sódio na homeostase celular e na regulação dos genes envolvidos na morte, ciclo celular, estresse oxidativo e danos ao material genético. Desta forma, ser um indicativo ou não de possíveis efeitos colaterais proporcionado pela utilização deste composto na quimioterapia contra o câncer.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A Genética Toxicológica

A ciência que estuda os agentes (físicos, químicos ou biológicos) e os danos causados por eles ao DNA ou RNA é conhecida como Genética Toxicológica. Os estudos nessa área possibilitam desenvolver mecanismos que permitem identificar e proteger os indivíduos que estão susceptíveis a alterações devido à exposições prejudiciais como, radiação ionizante, radiação ultravioleta, substâncias químicas, agentes endógenos entre outras (KLAASSEN; WATKINS III, 2012; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Iniciado em meados dos anos 70, a Genética Toxicológica se tornou uma importante área da Toxicologia, e tem despendido um grande esforço em delimitar parâmetros capazes de distinguir as substâncias que são ou não carcinogênicas. A Genética Toxicológica, entre os outros ramos da Toxicologia, utiliza a aplicação do cultivo de células para mensurar os efeitos de um determinado composto em induzir danos no material genético. Enquanto a toxicidade tecidual é, geralmente, medida através da determinação de enzimas presentes no fígado, no soro, proteínas na urina, dentre outros materiais biológicos oriundos de animais, a toxicidade genética positiva indica a possibilidade do composto ser ou não mutagênico podendo ser aplicada tanto em testes *in vivo* quanto *in vitro*, demonstrando a sua plasticidade na escolha do modelo experimental (ZEIGER, 2004).

Estudos têm demonstrado que as pessoas vêm sendo expostas cada vez mais a diversos agentes químicos e físicos que podem ter ação direta no seu genoma, e dependendo do seu estilo de vida, tal como trabalhar diretamente com materiais de risco, pode resultar em exposições mais agudas. Sendo assim, a Genética Toxicológica busca compreender os efeitos da exposição a doses baixas, crônicas ou agudas no risco do desenvolvimento do câncer (DESAULNIERS et al., 2015).

A carcinogênese e a neoplasia estão dentro das principais consequências resultantes de danos no DNA. Uma vez danificado/ alterado um ou mais genes responsáveis por mecanismos de controle de ciclo celular (proto-oncogenes e supressores de tumor) e de reparo de DNA, a célula fica sujeita a replicações descontroladas e, já que, os genes de reparo não desempenham sua devida função, tem-se um maior acúmulo de mutações potencializando a taxa de replicação e passando adiante alterações com capacidade de induzir a formação de neoplasias (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003)

Vale ressaltar que, a Genética Toxicológica não está limitada apenas em estabelecer potenciais carcinogênicos. Esta Ciência pode ser utilizada como ferramenta de determinação de agentes potencialmente benéficos, proporcionando ação protetora no indivíduo agindo de forma antimutagênica. Com o desenvolvimento tecnológico, algumas moléculas que antes apresentavam-se como altamente genotóxicas e contra indicadas no uso em humanos, hoje já podem ser manipuladas de forma que desempenhem papel importante no tratamento contra o câncer. Como exemplo, pode-se citar o caso da camptotecina, que um remodelamento estrutural em seu anel aromático reduziu os seus efeitos colaterais, tais como problemas renais, e pôde então, ser liberada para o uso na terapêutica (BRANDÃO et al., 2010).

As estimativas indicam uma maior incidência de casos de câncer na população mundial para os próximos anos. Estima-se que aproximadamente 12,9 milhões de mortes serão causadas por esta enfermidade em 2030 (BOYLE; LEWIN, 2008), o que torna essencial o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e de ação seletiva para que proporcionem uma melhor qualidade de vida ao indivíduo.

2.1.1 Ensaio in vitro

O cultivo de células é de grande importância na pesquisa biomédica sendo um componente importante para os testes iniciais, bem como em análises mais sensíveis em estudos de ação de drogas diretamente nas células. A cultura de células é a manutenção de células vivas em laboratório simulando o ambiente –temperatura, nutrientes, disponibilidade de oxigênio- das quais foram obtidas. A organização morfológica, das células em cultura, é caracterizada pela não formação de tecidos complexos, sendo mantidas em recipientes estéreis, geralmente, frascos descartáveis (MIGITA, 2012).

Esta abordagem tem contribuído para diferenciar e caracterizar compostos quanto às suas propriedades toxicológicas e auxiliar na seleção de moléculas, tornando-se uma ferramenta fundamental para compreensão dos mecanismos intracelulares do diversos sistemas de ativação metabólica, mecanismos estes de difícil tipificação em ensaios *in vivo* (CARERE; STAMMATI; ZUCCO, 2002).

Através dos métodos aplicados *in vitro* tem-se a vantagem de limitar a quantidade de variáveis experimentais bem como a redução do tempo experimental, quando comparados com os testes *in vivo*. Além disso, são reprodutíveis, sensíveis, geralmente financeiramente

acessíveis (ROGERO et al., 2003) e também, em casos específicos, utilizado como alternativa para o uso de animais (ABREU, 2008; CARERE; STAMMATI; ZUCCO, 2002).

As culturas de células podem ser divididas, resumidamente, em dois grandes grupos dependendo da obtenção das células, sendo essas: culturas primárias – células obtidas diretamente dos tecidos, geralmente heterogêneas (mais de um tipo celular numa mesma cultura), são mais propícias a contaminações e com limitado tempo de cultura por entrarem em senescência; e as culturas secundárias – células provenientes da dissociação (mecânica ou enzimática) de linhagens primárias, podendo estas passarem pelo processo de imortalização celular, geralmente por transfecção viral, passando a denominação de linhagem de células contínuas, devido ao fato de apresentarem um maior taxa de crescimento e proliferação celular, sendo a mais utilizada em estudo laboratoriais de toxicidade e vacinas (MELOROSE; PERROY; CAREAS, 2015).

Na busca da melhor compreensão da morfogênese e fisiologia dos organismos, os testes *in vitro* vêm acompanhando a tecnologia possibilitando esta compreensão. Com o advento da cultura de células em três dimensões (3D) tornou-se possível a melhor compreensão do funcionamento e desenvolvimento tumoral, possibilitando estudar a heterogeneidade celular e a formação do microambiente tumoral muito semelhante com o observado *in vivo* (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

Por meio do controle das condições do meio, estudos de cultura celular possibilitam compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na progressão metastática. A aplicação de modelos de co-cultura possibilita a análise em tempo real como dinâmica e interação celular (ARRIGONI et al., 2016).

O modelo co-cultura proporcionou o desenvolvimento dos chamados biochips. Sua arquitetura possibilita a simulação de um sistema *in vivo* em um ambiente controlado, o que viabiliza a observação e o acompanhamento tanto da migração de células tumorais quanto o contato de resultantes metabólicos transportado pelo microfluido entre as células, o que propicia uma análise mais acurada da reação do produto metabólico de um composto em diferentes linhagens contidas nesse biochip (FITZGERALD et al., 2015). Dentre a diversidade de testes existentes *in vitro*, a ANVISA (2013) recomenda ensaios de genotoxicidade como principal suporte para os estudos clínicos utilizando linhagens celulares tumorais e não-tumorais como ferramentas de estudo de drogas com potencial antitumoral e seletivo para células neoplásicas. Assim, os dados gerados nestes tipos de trabalhos são utilizados como parâmetros para determinação das formas de utilização destas drogas em

ensaios utilizando animais e humanos, conforme é determinado pelas agências reguladoras, como por exemplo, a ANVISA no Brasil.

2.2 O Selênio

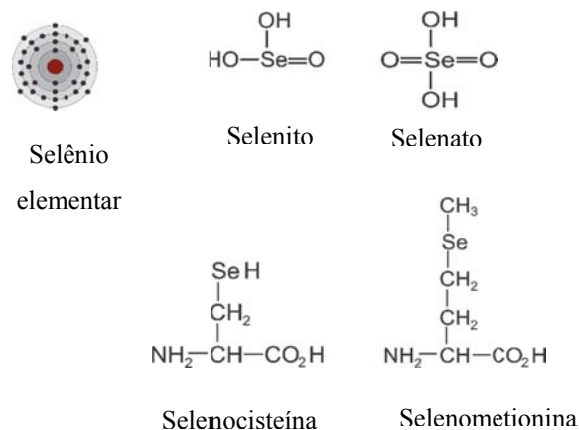
Em 1817, realizando um experimento com ácido sulfúrico, o “pai da química sueca” Jöns Jacob Berzelius identifica, como resíduo de seu experimento, um inesperado elemento da família do telúrio e enxofre nunca antes catalogado, ao qual deu o nome de selênio proveniente do grego Selènè que significa lua (BOYD, 2011).

O selênio é um elemento pertencente à família dos calcogênios (grupo 16) da Tabela Periódica. É dificilmente encontrado na natureza na sua forma elementar, sendo capaz de ligar-se a alguns minerais tais como sulfetos de minérios substituindo parcialmente o enxofre. Pode apresentar-se de seis formas diferentes, dependendo da variação de sua massa (74, 76, 77, 78, 80 e 82). Sendo as formas mais predominantes na natureza ^{80}Se e ^{78}Se (BOYD, 2011).

As diferentes formas do selênio podem ser agrupadas, genericamente, em duas grandes categorias: a forma orgânica e a inorgânica. As formas orgânicas mais conhecidas são aquelas ligadas aos aminoácidos metionina, selenometionina (SeMet) e cisteína, selenocisteína (SeCys). Já as formas inorgânicas se apresentam como seleneto (-2), selênio elementar, selenito (+4) e selenato (+6) (Figura 1) (HARTIKAINEN, 2005; SUZUKI, 2005).

A partir do século XX houve uma grande aplicação das diversas formas do selênio na indústria como matéria-prima de muitos eletrodomésticos devido as suas características foto e eletrocondutoras, bem como nos estudos sobre os efeitos biológicos desse composto (BOYD, 2011).

Figura 1. Representação das formas mais comuns do Selênio.



Fonte: Adaptado de (SUZUKI, 2005)

2.2.1 Efeitos biológicos do selênio

O selênio pode ser encontrado em diversas fontes alimentares como por exemplo carnes, marisco, arroz, macarrão, pão, entre outros, sendo os cereais e castanhas onde está presente em maiores concentrações (MEHDI et al., 2013). A recomendação de ingestão diária do selênio para humanos é de 55 μg (0,7 $\mu\text{mol}/\text{dia}$), sendo o máximo tolerável de até 400 μg (5,1 $\mu\text{mol}/\text{dia}$) (BENDICH, 2000).

Os efeitos biológicos do selênio têm sido alvo de muitos estudos indicando a sua importância na manutenção da homeostase celular onde atua, principalmente, na neutralização de espécies reativas de oxigênio, bem como a sua possível toxicidade. Os primeiros estudos foram motivados pela busca da causa de morte por intoxicação de ruminantes nos Estados Unidos, onde notou-se que o solo local era rico em selênio (MOXON, 1937) e algumas plantas possuíam acúmulo de selênio em suas estruturas (FINLEY, 2005). Moxon em 1937 associou a doença alcalina a toxicidade causada pelo excesso de selênio (MOXON, 1937). Logo em seguida, em 1943, Nelson e colaboradores descreveram o potencial tumoral do selênio em roedores (NELSON; FITZHUGH; CALVERY, 1943). Em 1957, Schwarz e Foltz demonstraram a importância do selênio como um micronutriente necessário para a homeostase celular. Neste mesmo ano, Patterson e colaboradores relataram a deficiência do selênio como causa a diátese exsudativa em aves domésticas (PATTERSON; MILSTREY; STOKSTAD, 1957). Em 1958, Muth e colaboradores relataram a ação protetora do selênio contra a doença do músculo branco em bezerros e carneiros (MUTH et al., 1958). O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América –NIH em 1994 listou diversos efeitos relacionados a deficiência do selênio em mamíferos tais como necrose hepática, deficiência no crescimento, distrofia pancreática e atrofia testicular (ABDO, 1994).

Diversos estudos têm demonstrado a ação antifúngica do selênio como cosméticos capilares (CASTANEDA et al., 2007), na ação antirretroviral (BAUM et al., 2013), na prevenção contra o Alzheimer (LAKSHMI; SUDHAKAR; PRAKASH, 2015), a importância na fertilidade masculina (HAWKES; TUREK, 2001) e, principalmente, ação protetora contra o câncer (HUAWEI, 2009; YANG et al., 2009; YOON; KIM; CHUNG, 2001). Entretanto, o excesso desse composto caracteriza a intoxicação chamada de selenose. Casos de selenose são identificados a partir da concentração de 813 $\mu\text{g}/\text{L}$ (10,3 μM) de selênio no plasma sanguíneo, sendo o caso mais grave encontrado o nível de selênio de 5mg/L (63,34 μM). Os sintomas são: hálito de alho, perda de cabelo, alterações nas unhas, manchas nos dentes, lesões na pele e alterações nos nervos periféricos. Análises *in vivo* demonstraram que o efeito genotóxico do

excesso de selênio está relacionado ao surgimento de aberrações cromossômicas em roedores. Já *in vitro*, o efeito mutagênico dos sais de selênio está associado a espécies reativas de oxigênio provenientes a metabolização que causam quebras na fita de DNA (COMMISSION, 2000). Em 2003, o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos caracteriza o perfil toxicológico do selênio enfatizando a importância desde elemento como micronutriente para a saúde, principalmente na proteção contra o câncer, ressaltando, porém, o efeito tóxico não-carcinogênico do selênio em altas doses (RISHER et al., 2003).

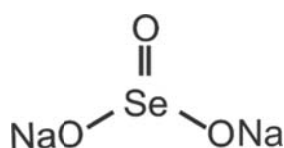
Uma vez obtido pela alimentação, os mecanismos de entrada do selênio no organismo diferem conforme a sua natureza, orgânica ou inorgânica. As formas orgânicas (selenometionina e selenocisteína) adentram nas células intestinais através do sistema de transporte de aminoácidos, e, no fígado pode ser incorporado diretamente em algumas selenoproteínas ou metabolizado passando pelo processo de trans-selenação, ou seja, transição da forma selenometionina para selenocisteína. Posteriormente, ocorre a quebra mediada pela B-Liase resultando em seleneto de hidrogênio, que por sua vez pode ser, quando em excesso, eliminado na respiração ou urina (FRANCESCONI; PANNIER, 2004; WASTNEY et al., 2011). Quando em concentrações ideais o seleneto de hidrogênio pode formar o selenofosfato, mediado pela enzima selenofosfato sintetase, que somado a um resíduo de serina, originam a SeCys; esta é incorporada a um RNA transportador denominado tRNA[Ser]Sec, correspondente ao códon UGA localizado na região SECIS (*Seleno Cystein Insertion Sequence*) que tem uma estrutura semelhante a uma alça no sentido 3' do mRNA, sendo então finalmente utilizado na síntese de selenoproteínas (COMINETTI; COZZOLINO, 2009; PAPP; HOLMGREN; KHANNA, 2010; SUZUKI, 2005).

As formas inorgânicas podem entrar por difusão ou carreadas transpassando a membrana celular dos enterócitos, se ligando a apolipoproteínas e são endereçadas ao fígado através da corrente sanguínea. No fígado, as formas inorgânicas do selênio são reduzidas e convertidas em selenito. Uma vez convertidas em selenito, tais moléculas são metabolizadas e transformadas em seleneto de hidrogênio entrando na rota de síntese de selenoaminoácidos mencionada anteriormente. O principal produto da metabolização das formas do selênio no fígado é a selenoproteína P, a qual é liberada na corrente sanguínea e assim distribuída aos demais órgãos, servindo como matéria prima para a síntese para as outras selenoproteínas como, por exemplo, as glutatonas peroxidases (GPx) e as tioredoxininas redutases (TxnR) nos órgãos como os músculos e pulmão. Essas selenoproteínas estão diretamente relacionadas à neutralização de espécies reativas de oxigênio (MEHDI et al., 2013; REEVES; HOFFMANN, 2009; SUZUKI, 2005).

Já foram registrados cerca de 25 genes de selenoproteínas, porém o mecanismo de ação de todas ainda não foi bem caracterizado (LABUNSKYY; HATFIELD; GLADYSHEV, 2014; REEVES; HOFFMANN, 2009). As selenoproteínas constituem um grupo de diversas proteínas que estão relacionadas à regulação de complexos de membrana, biossíntese de fosfolípidios, ação antioxidante tanto no espaço intra quanto extracelular, viabilizar a homeostase de cálcio, entre outros (LIU; ROZOVSKY, 2015). A família das glutathionas peroxidases foi uma das primeiras selenoproteínas identificadas em mamíferos, e a sua principal função é decompor peróxidos em água, protegendo as células contra moléculas oxidantes (COMINETTI; COZZOLINO, 2009; REEVES; HOFFMANN, 2009). Outra família das selenoproteínas bem caracterizada é a das tioredoxinas. O sistema tioredoxina é formado basicamente pela junção da tioredoxina redutase (TrxR) com a tioredoxina (Trx) agregadas ao NADPH, dentre suas funções conhecidas, está a ação antioxidante. Podendo aparecer de formas alternativas, oriundas de processamento (*splices*) da tioredoxina redutase desempenhando outras funções, como o caso da TrxR1 que está relacionada na polimerização dos filamentos de actina na reestruturação da membrana (REEVES; HOFFMANN, 2009).

2.2.2 Selenito de sódio

Figura 2. Representação da estrutura do selenito de sódio.



Fonte: (CAS:10102-18-8)

O selenito de sódio (Figura 2) é uma das formas inorgânicas do selênio de maior facilidade de absorção no organismo (RISHER et al., 2003). É um composto solúvel em água (85 g/100 g água em 20° C) com o peso molecular de 172,9 g/mol (CAS:10102-18-8). O selenito de sódio pode ser obtido a partir da evaporação da solução de hidróxido de sódio e ácido selenioso na temperatura de 60°-100° C; ou pelo aquecimento da mistura de cloreto de sódio com óxido de selênio(O'NEIL; SMITH; HECKELMAN, 1996), ocorre naturalmente apresentando o selênio no estado de oxidação +4 (IPCS, 1987).

É encontrado, principalmente, através do uso de suplementos alimentares, e, quando ingerido, é absorvido principalmente no duodeno entrando na célula por meio da bomba de sódio na membrana plasmática (MEHDI et al., 2013). Entretanto, testes *in vitro* têm demonstrado que em células da pele, este composto entra por meio do transporte facilitado de ânions, não havendo, assim, gasto de ATP (GANYC; SELF, 2008). Olm et al., (2009) no estudo com células tumorais multirresistentes a drogas, demonstraram que, devido a sua estrutura, o selenito de sódio tem a capacidade de reduzir o meio extracelular e estimular a célula a secretar L-Cisteína, a qual se liga ao selenito presente no meio extracelular possibilitando a sua entrada na célula por receptores de aminoácidos presentes na membrana plasmática (OLM et al., 2009).

Diversos estudos têm demonstrando o potencial do selenito de sódio como promissor quimioterápico contra o câncer devido a sua atividade antioxidante (BENDICH, 2000), quimiopreventiva (STOICA; PENTECOST; MARTIN, 2000; ZHAO et al., 2009), citotóxica (CUI et al., 2015) e a sua ação anti-metastática *in vitro* (ZHU; GONG; FRENKEL, 1998). No trabalho de Yoon et al. (2001) é relatada a ação antimetastática do selenito em células HT1080, no qual o selenito [3 μ M] inibiu a interação matriz-célula, regulou a atividade de proteases associadas a invasão, além de regular os fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B. Em um outro estudo, Yang et al. (2009) relatam a possibilidade de o selenito de sódio ter ação seletiva em seu estudo. Eles avaliaram o potencial terapêutico do selênio, injetando as formas de selênio-metionina e selenito de sódio em tumores induzidos por células tumorais SW480 injetado em ratos e tratados por 21 dias; foi observado que tanto o selênio-metionina [2 mg/kg/dia] quanto o selenito de sódio [0,1 mg/kg/dia] inibiram o crescimento tumoral *in vivo*, no qual foi relatado ainda indução de apoptose nas células SW480 e inibição da expressão do gene *BCL-xL* e aumento na expressão dos genes *BAX*, *BAD* e *BIM* além da ativação da Caspase-9 (YANG et al., 2009). Ainda, Zhao et al. (2009), em seu estudo com células de câncer de próstata (LNCap e PC3), relatam a ação do selenito de sódio [3 μ M] como potente indutor de apoptose e através da técnica de Western blot, as células quando tratadas por 1,5 μ M selenito de sódio, houve inibição da *AKT* bem como induziu apoptose e parada de ciclo em G2/M. Tais estudos mostram que o selenito de sódio pode atuar tanto antes quanto depois do dano celular. Entretanto, Macfarquhar *et al.* (2010) realizaram um levantamento no qual avaliaram a casos de envenenamento nos Estados Unidos da América, no qual foram analisados 201 casos em 10 estados, sendo, a suplementação exacerbada de selênio a causa de tal enfermidade, caracterizando como um significativo risco a saúde pública ressaltando a necessidade de uma maior regulação da liberação deste composto para o consumo humano.

Em um estudo experimental com humanos, afim de avaliar o efeito da dieta suplementada com selênio, Vinceti *et al.*, (2013) demonstrou que a dieta suplementada com selênio não reduziu o risco de desenvolver câncer, ao invés disso pode aumentar o risco de desenvolver alguns cânceres sitio-específicos como, por exemplo, neoplasias de pele. Este estudo evidencia o potencial toxicidade do selênio ligado a suplementação alimentar. Guo *et al.*, (2015) analisou o efeito do selenito de sódio em linhagens de células tumorais de mama (MCF7 e MDA-MB-231) em comparação com a linhagem de células não tumorais de epitélio de mama humana (HMEC) e notou que baixas doses de selenito de sódio induziu o estresse oxidativo, inibiu o crescimento celular e induziu apoptose somente nas linhagens tumorais testadas.

2.3 Determinando o Mecanismos de Ação de Compostos

Mesmo com a descoberta de potenciais fármacos, algumas novas drogas permanecem em investigação, cujos alvos moleculares não são claros, ou seja, o mecanismo molecular envolvido nas reações intracelulares ainda não estão bem determinados, restringindo a sua otimização e aplicação para a sociedade (GREGORI-PUIGJANÉ *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação de um composto na célula pode ser caracterizado através do estudo das alterações no fenótipo celular, tais como o seu efeito na expressão gênica e na morfologia celular. Tal caracterização têm contribuído no processo de desenvolvimento de novos medicamentos, particularmente no que se refere ao desenvolvimento de quimioterápicos tratamentos para doenças humanas com etiologias complexas e variadas, determinando o seu alvo na célula com o objetivo de estabelecer o mecanismo de ação do agente em estudo (BHOGAL; BALLS, 2008).

Uma das formas mais utilizadas para analisar a morfologia celular além da microscopia, é a citometria de fluxo. A citometria de fluxo consiste em um analisador de células em suspensão em uma dada amostra. É um sofisticado instrumento que mede múltiplas características físicas de uma única célula, tais como tamanho e granulosidade, simultaneamente à medida que a célula flui em suspensão através de um dispositivo de medição. As células são solubilizadas e marcadas com corantes fluorescentes ou anticorpos monoclonais, que têm afinidade á moléculas da superfície celular ou intracelulares que possibilita a sua aplicação, também, para análises bioquímicas intracelulares. Posteriormente são sugadas pelo capilar do equipamento e um laser é dirigido a este capilar de fluxo, a luz é dissipada de forma diferente quando se choca nas células marcadas sendo capturada por meio

de sensores em linha e perpendiculares ao feixe de luz. O resultado deste processo é a formação de imagens em tempo real, para cada célula, da fluorescência, dispersão e transmissão de luz. Esta abordagem torna a citometria de fluxo uma poderosa ferramenta para análise detalhada de populações complexas em um curto período de tempo, sendo amplamente utilizada em análises biomédicas e em laboratórios de pesquisa básica e aplicada, no qual, usando marcadores específicos, torna possível estabelecer características inerentes à fase do ciclo celular em que a célula se encontra no dado momento da análise, bem como apoptose, integridade da membrana plasmática, entre outros (ADAN et al., 2016; ERRANTE et al., 2015).

A análise dos RNAs mensageiros (mRNAs) em estudos citológicos tem demonstrado ser um importante fator na investigação biomédica e diagnósticos, permitindo o estudo de um ou mais genes expressos de uma só vez (STAHL et al., 2016). Para avaliar a expressão relativa de genes chaves das diversas vias metabólicas, utiliza-se a metodologia de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). A qRT-PCR permite a quantificação sensível, específica e reprodutível de ácido nucleico e consiste na utilização de um agente intercalante que quando excitado, em cada ciclo de replicação, emite uma fluorescência que é captada pelo sensor óptico do termociclador e quantificada. Sendo assim, quanto maior a fluorescência captada, maior a quantidade de produto amplificado (amplicons) (ARYA et al., 2005).

2.3.1 Expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são metabólitos normalmente produzidos como resultado de processos intracelulares, podendo ser estimulados como resposta a exposição de alguns xenobióticos, tal como a fumaça de cigarro. Os EROS são moléculas altamente reativas e podem danificar estruturas celulares como carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas e alterar suas funções (BIRBEN et al., 2012).

Para contrabalançar a lesão mediada por EROS, existe um sistema endógeno de defesa antioxidantes. O estresse oxidativo ocorre quando o balanço entre antioxidantes e EROS é interrompido, ocasionado pela depleção de antioxidantes ou acúmulo de EROS (BIRBEN et al., 2012). A regulação do estado redutor e oxidante (redox) é crítica para a viabilidade celular, ativação, proliferação e função orgânica. O estresse oxidativo contribui para muitas condições patológicas e doenças, incluindo câncer, distúrbios neurológicos, aterosclerose, hipertensão, isquemia / perfusão, diabetes, síndrome do desconforto respiratório agudo,

fibrose pulmonar idiopática, doença pulmonar obstrutiva crônica e asma (FUCHS-TARLOVSKY, 2013).

Organismos aeróbios têm sistemas antioxidantes integrados, que incluem antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos que são geralmente eficazes no bloqueio de efeitos nocivos de ROS. O corpo humano é equipado com uma variedade de antioxidantes que servem de contrabalanço para os efeitos dos oxidantes. Tais antioxidantes podem ser divididos em duas categorias: enzimática, como GPX (Glutathione Peroxidase), CAT (catalase) e SOD1 (superóxido dismutase) e não enzimática, como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C) e GSH (Glutathione Oxidase) (BIRBEN et al., 2012; FUCHS-TARLOVSKY, 2013).

2.3.1.1 *CAT*

As catalases (CAT) são enzimas que desempenham papéis importantes na proteção das células contra os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio, em especial o peróxido de hidrogênio. Numerosos estudos têm descrito os polimorfismos *CAT* e sua ligação com várias doenças. Como exemplo de algumas doenças relacionadas à alterações genéticas têm-se: a hipertensão, diabetes mellitus, resistência à insulina, dislipidemia, asma, metabolismo ósseo ou vitiligo (GOYAL; BASAK, 2010; KODYDKOVÁ et al., 2014).

No genoma humano, o gene *CAT* está localizado no cromossomo 11, na posição p13 (NCBI, 2017a) e a expressão deste gene é regulada por vários mecanismos envolvendo, por exemplo, o receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ (PPAR γ), o factor de necrose tumoral α (TNF- α), a proteína p53 e a hipermetilação de ilhas CpG no promotor de catalase. Além dos fatores genéticos, as atividades da *CAT* podem ser afetadas pela idade, variações sazonais, atividade física ou uma série de compostos químicos (KODYDKOVÁ et al., 2014).

2.3.1.2 *GPXI*

O gene *GPXI* está localizado no cromossomo 3, na posição p21.3 (NCBI, 2017b) e é responsável por codificar a enzima glutathione peroxidase-1 (GPX1). Essa enzima representa a primeira selenoproteína de mamíferos identificada. É uma enzima antioxidante intracelular que reduz o peróxido de hidrogênio em água para limitar os seus efeitos nocivos. Entretanto,

assim com outros EROS, o peróxido de hidrogênio também é um importante fator para a transdução de sinal mediado pelo fator de crescimento, a função mitocondrial e a manutenção do equilíbrio redox tiol normal. Dessa forma, ao limitar a acumulação de peróxido de hidrogênio, a GPX1 também modula estes processos. Além disso, a GPX1 tem sido implicada no desenvolvimento e prevenção de muitas doenças, vinculando a anormalidade da expressão de GPX1 com etiologia do câncer, doença cardiovascular, neurodegeneração, doença auto-imune, doenças cardiovasculares e diabetes (LEI; CHENG; MCCLUNG, 2007; LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011).

2.3.1.3 SOD1

O gene SOD1 está localizado no cromossomo 21, na posição q22.1 (NCBI, 2017c) e codifica a enzima antioxidativa superóxido-dismutase de cobre-zinco (Sod1) uma importante enzima do sistema de defesa celular contra espécies reativas de oxigênio (ROS). A sua grande parte está localizada no citosol, sendo possível encontrar também no núcleo, peroxissomos e mitocôndria (KLÖPPEL et al., 2010; LIOU et al., 1993; OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001).

Alterações no gene SOD1 estão relacionadas ao desenvolvimento de algumas doenças degenerativas, como a esclerose amiotrófica lateral por exemplo (URUSHITANI et al., 2006). A compreensão molecular dos processos envolvidos na regulação da expressão do gene SOD1 podem auxiliar a desvendar novas vias reguladoras que regem alterações no a fenótipos celulares nas doenças, bem como podem revelar alvos terapêuticos e tratamentos (MILANI et al., 2011).

2.3.2 Expressão de genes relacionados ao ciclo celular

A regulação do ciclo celular é fundamental para o desenvolvimento normal do organismo. A desregulação nas etapas desse processo pode levar a um descontrole na proliferação celular e com isso trazer resultados indesejados, como a formação de tumores (HODGSON, 2008). Sendo assim, este processo tem motivado diversos estudos na compreensão e desenvolvimentos de drogas que atuem em alvos moleculares envolvidos nos

mecanismos reguladores envolvidos nessas etapas (CROCE, 2008; LAPENNA; GIORDANO, 2009).

O ciclo celular pode ser dividido, basicamente, entre mitose e intérfase. Esta última é constituída pelas fases: Gap1 (G1), Síntese (S) e Gap2 (G2). Em suma, na fase G1 ocorre a síntese de RNA e proteínas; na fase S ocorre a duplicação do DNA, e na fase G2 ocorre preparação das duas cromátides-irmãs para início da mitose (LAPENNA; GIORDANO, 2009).

Os pontos de checagem “*checkpoints*” cujo desempenham a função evitar a passagem de possíveis erros para as células filhas, ocorrem na passagem de G1 para S “*restriction point*”, dentro da fase S, e de G2 para M (início da mitose). Lapsos nos *checkpoints*, como mutações nos genes *CHK1* e *CHK2*, podem levar a perpetuação de danos ao material genético e a formação de células com diferentes tipos de anormalidades, caracterizando células neoplásicas e poliplóides (HOUTGRAAF; VERSMISSEN; VAN DER GIESSEN, 2006).

Em organismos saudáveis, o controle da proliferação celular é dado por grupo de genes que codificam proteínas ativas neste processo, e podem ser divididos em dois grupos: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais (LEE; MULLER, 2010)

Os proto-oncogenes reúnem genes responsáveis por codificar reguladores fisiológicos que atuam estimulando o crescimento e a diferenciação celular. Casualmente, mutações nesse grupo de genes, geralmente ocasionadas pela exposição a agentes carcinogênicos físicos, químicos e biológicos, os convertem em oncogenes. Neste grupo, estão inclusos os genes *mTOR* (BALDO et al., 2008), *RAS*, *MYC*, *CCND1*, entre outros (CARLO M. CROCE, 2008).

Já os genes supressores tumorais, são responsáveis codificar reguladores que atuam no controle negativo do ciclo, impedindo a progressão do ciclo celular. Alterações nesse grupo de genes podem resultar no aumento de da taxa de proliferação e conseqüentemente, no surgimento de tumores. Dentre os genes supressores tumorais é possível citar *TP53*, *RBI*, *MYC*, *TP21* (SUN; YANG, 2010)

2.3.2.1 Ciclinas

As ciclinas (CCN) são estruturas proteicas que estão diretamente relacionadas em diversas funções biológicas fundamentais para a célula, tais como proliferação celular, angiogênese, tumorigênese e cicatrização celular. Devido a sua interação com uma variedade de proteínas ligantes e reguladoras (HOLBOURN; ACHARYA; PERBAL, 2008).

No que se refere ao ciclo celular, quando estimuladas, as ciclinas se ligam às quinases dependentes de ciclina (CDK) e formam um complexo ciclina-CDK que orquestram, de forma linear, a progressão do ciclo celular. Para a passagem de cada fase do ciclo celular (G1, S, G2), é necessário um aumento da concentração intracelular de pelo menos um complexo específico de cada fase, sendo regulados por seus respectivos inibidores de CDK (CKIs)(LIM; KALDIS, 2013). Existem cerca de 11 ciclinas encontradas em células humanas, sendo que a maioria possui subfamílias como por exemplo a ciclinas do tipo A (CCNA1), B (CCNB1, CCNB2), e D (CCND1) as quais podem se combinar com CDKs específicas para cada fase (CASIMIRO et al., 2012).

A desregulação desses eventos é frequente vinculada ao desenvolvimento de células neoplásicas com características hiperproliferativas, bem como fibrose e sequelas inflamatórias. Sendo assim, promissores alvos moleculares para estudos terapêuticos para fármacos antitumorais (LAPENNA; GIORDANO, 2009; YEGER; PERBAL, 2007).

2.3.2.2 *Checkpoint*

As vias de controle do DNA são regiões altamente conservadas e permitem que as células reparem os danos no DNA causados por fatores mutagênicos exógenos e endógenos. O tempo de exposição e como as células respondem ao dano no DNA são determinantes para o desenvolvimento de neoplasias e envelhecimento prematuro. Tais respostas são também indicadores de toxicidade de um determinado composto. Como o caso de fármacos utilizados na quimioterapia contra o câncer (KASTAN; BARTEK, 2004).

Os pontos de verificação de danos no DNA estão vinculados a reações bioquímicas que determinam o atraso ou a parada do ciclo celular. Para isso, têm-se o complexo proteico Rad9-Rad1-Hus1 e o Rad17-RFC que atuam na detecção de danos no DNA e sinalização para as quinases ATM, ATR, CHK1 e CHK2 (NIIDA; NAKANISHI, 2006). As *checkpoint* quinases (CHK ou CHEK) são proteínas mediadoras da resposta ao dano podendo sinalizar, por meio de fosforilação, a via de parada de ciclo regulando as proteínas Cdc25, Wee1 e p53 que acabam inativando as CDKs, bem como proteínas ativadoras mecanismos de reparo das células, apoptose e de modelamento da cromatina (BARTEK; LUKAS, 2003). O gene CHEK1 localiza-se no cromossomo 11 posição q24.2 (NCBI, 2017d), enquanto o gene CHEK2 está localizado no cromossomo 22 posição q12.1 (NCBI, 2017e).

2.3.2.3 *mTOR*

O gene *mTOR* (*mechanistic target of rapamycin*) está localizado no cromossomo 1 na posição p36.22 e codifica uma proteína pertencente a uma família de fosfatidilinositol (PI3K) relacionadas com quinase, mediando respostas celulares a estresses tais como danos ao DNA e privação de nutrientes (NCBI, 2017f).

O sistema de sinalização mTOR desempenha um papel fundamental em várias vias de transdução de sinal, que são necessárias para a progressão do ciclo celular, proliferação celular, metabolismo e angiogênese. A sinalização de mTOR atua através da sinalização PI3K/AKT e quando desregulada está vinculada em várias doenças humanas. Deste modo, atrai grande interesse no desenvolvimento de fármacos que visam mTOR (ZHOU; LUO; HUANG, 2010).

Compostos com ação inibidora de mTOR foram incluídos em testes em andamento como agentes com potencial de ação contra o câncer. Atualmente mais de dez moléculas estão em desenvolvimento para estudos clínicos e pré-clínicos (BALDO et al., 2008).

2.3.2.4 *TP53*

O TP53 é o gene supressor de tumor amplamente estudado em tumores humanos, seu gene, localiza-se no cromossomo 17 na posição p13.1 e codifica uma proteína denominada *tumor protein 53* (NCBI, 2017g) e tem sua expressão aumentada quando há dano no DNA, atuando, principalmente, como modulador da via de reparo da célula.

Normalmente, a p53 é mantida em baixas concentrações devido à sua curta meia vida (LAKIN; JACKSON, 1999). Entretanto, em alguns tipos celulares, é possível encontrar também a p53 na forma inativa. Para se tornar ativa, a proteína p53 deve receber um sinal ou alteração se tornando um fator de transcrição. Diversos fatores podem ativar a p53 ou aumentar a sua concentração na célula, como situações de estresse e vários tipos de dano ao DNA. Além de funcionar como fator de transcrição, p53 pode atuar como sinalizador direto, ativando determinadas proteínas e enzimas, resultando em parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo de DNA ou mudanças no metabolismo celular (VOUSDEN; RYAN, 2009).

Embora desenvolva o papel de gene supressor de tumor, quando mutado, a maioria das alterações levam à perda de função, passando a exercer um efeito negativo dominante, ou seja, o produto do único alelo mutado é o suficiente para interagir e silenciar o alelo normal, induzindo a instabilidade genômica e, desta forma, atuando como um oncogene (STRANO et al., 2007).

2.3.2.5 *P21*

O gene *CDKN1A* codifica um potente inibidor de quinase dependente de ciclina. A proteína codificada, conhecida como p21, liga-se e inibe a atividade de ciclina-CDK2 bem como ciclina-CDK4, desta forma, desempenha o papel de regula da progressão do ciclo celular em G1 (NCBI, 2017h). A atividade da p21 pode ser mediada pela via p53, através da qual medeia a parada do ciclo em G1 em resposta a uma variedade de estímulos de estresse (GOLIAS; CHARALABOPOULOS; CHARALABOPOULOS, 2004). Esta proteína pode interagir com a proliferação do antígeno nuclear celular (PCNA), um fator auxiliar da DNA polimerase, e desempenha um papel regulador na fase S atuando na replicação do DNA, podendo atuar também no reparo de danos no DNA.

Novos estudos, demonstraram que a p21 pode ser estimulada por vias independentes de p53. P21 pode modular a expressão de genes e outros eventos celulares através de interações proteína-proteína que são independentes de CDKs e PCNA. Diversos fatores de transcrição, ubiquitina ligases e proteínas quinases regulam a transcrição, estabilidade e localização celular de p21, atuando diretamente na sua atividade. A p21 é um supressor tumoral, porém pode que se comportar como um oncogene em certos contextos celulares, senso assim, fatores que regulam a sua atividade tem se tornado alvos para intervenção terapêutica (ABBAS; DUTTA, 2009).

2.3.2.6 *C-MYC*

O gene *MYC* está localizado no cromossomo 8 na posição q24.21 (NCBI, 2017i). Codifica uma fosfoproteína nuclear multifuncional. Funciona como um fator de transcrição que regula a transcrição de genes alvo específicos. Recentes evidências reforçam as participações direta e indireta da proteína C-MYC na regulação do ciclo celular,

diferenciação, metabolismo, crescimento celular, apoptose, instabilidade genômica, imortalidade e angiogênese. Mutações, superexpressão, rearranjo e translocação deste gene têm sido associados a uma variedade de tumores hematopoiéticos, leucemias e linfomas. Novos esforços estão sendo direcionados no sentido da identificação dos genes-alvo regulados pelo c-MYC e da elucidação dos mecanismos moleculares implicados na transformação neoplásica (FARIA; RABENHORST, 2006).

A expressão desregulada de c-MYC pode superar a parada do ciclo celular para promover a proliferação celular. A expressão de c-MYC pode inibir a transcrição de *p21CIP1* por TGF. Assim, progressão do ciclo celular via c-MYC- dependente pode atuar reprimindo do gene *p21CIP1* podendo interferir no mecanismo de checagem de integridade do genoma (CLAASSEN; HANN, 2000).

2.3.3 Expressão de genes relacionados a danos ao DNA

Naturalmente, as células estão expostas a danos no DNA no seu dia a dia e tais danos podem levar a mutação, câncer e morte celular. O dano ao DNA induz várias respostas celulares que permitem à célula ou eliminar ou lidar com o dano ou para ativar um processo de morte celular programada, visando eliminar células com mutações potencialmente prejudiciais ao organismo (HOUTGRAAF; VERSMISSEN; VAN DER GIESSEN, 2006).

Como alternativa aos danos, as células humanas dispõem basicamente de seis principais vias de reparo conhecidas: (a) reparo por excisão de bases (*base excision repair*, BER), (b) reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*, NER), (c) reparo de bases mal emparelhadas (*mismatch repair*, MMR), (d) reparo por síntese translesão (*translesion synthesis*, TLS), (e) reparo por recombinação homóloga (*homologous recombination*, HR) e (f) reparo por recombinação não homóloga ou ilegítima (*non homologous end joining*, NHEJ). Cada via é acionada conforme o tipo de lesão que foi gerada (SANCAR et al., 2004).

2.3.3.1 ATM – ATR

As ATM e ATR são quinases que desempenham o papel de reguladores central da via de resposta a danos no material genético. Ambas são ativadas por danos e estresse de

replicação do DNA agindo de forma distintas nas respostas a tais eventos, sendo comumente acionadas pela via de reparo HR e NHEJ (MARÉCHAL; ZOU, 2013; RONCO et al., 2016).

O gene *ATM* (ataxia telangiectasia mutated) localiza-se no cromossomo 11 na posição q22.3 e codifica uma proteína que pertence à família PI3 / PI4-quinase. Esta é uma importante proteína quinase relacionada ao controle do ciclo celular e funciona como um regulador de uma grande variedade de proteínas, incluindo as proteínas supressoras de tumores p53 e BRCA1, a quinase de controle CHK2, as proteínas de controle RAD17 e RAD9 e a proteína de reparo do DNA NBS1. Esta proteína e a quinase ATR estreitamente relacionada são pensadas para serem controladoras mestre de vias de sinalização de ponto de verificação do ciclo celular que são necessárias para a resposta das células aos danos do DNA e para a estabilidade do genoma. As mutações neste gene estão associadas à ataxia telangiectasia daí a origem do seu nome (MARÉCHAL; ZOU, 2013; NCBI, 2017j; RONCO et al., 2016; SHILOH, 2001).

O gene *ATR* (ataxia telangiectasia and Rad3 related) localiza-se no cromossomo 3 na posição q23. Também codifica uma proteína pertencente à família PI3 / PI4-quinase e está diretamente relacionada com a ATM, uma proteína quinase codificada pelo gene mutado em ataxia telangiectasia. Estudos têm mostrado que esta quinase fosforila a CHK1, proteínas de controle RAD17 e RAD9, bem como a proteína supressora de tumor BRCA1 (MARÉCHAL; ZOU, 2013; NCBI, 2017k; RONCO et al., 2016; SHILOH, 2001).

2.3.3.2 *GADD45A*

O gene *GADD45A* (growth arrest and DNA damage inducible alpha) está localizado no cromossomo 1 na posição p31.3 (NCBI, 2017l). É um membro de um grupo de genes cujos níveis de transcrição são aumentados após a indução de parada de crescimento celular por tratamento com agentes de danos de DNA. A proteína codificada por este gene responde a estresses por meio da ativação da via p38 / JNK através da quinase MTK1 / MEKK4. A transcrição induzida por dano do DNA deste gene é mediada pela p53, porém não exclusiva podendo agir também, de forma independente do mecanismo da p53 através de alterações epigenéticas (BARRETO et al., 2007; TAMURA et al., 2012).

2.3.3.3 *H2AX*

O gene *H2AX* (H2A histone family member X) está localizado no cromossomo 11 na posição q23.3 (NCBI, 2017m). Este gene codifica a histona H2A, cuja, além de sua função de auxiliar no empacotamento do genoma, desenvolve um importante papel de sinalização de quebra de fita do DNA por meio de fosforilações sendo uma etapa importante para a atuação do mecanismo de reparo auxiliando na manutenção da estabilidade genômica (YUAN; ADAMSKI; CHEN, 2010). Alguns estudos têm trazido a *H2AX* como um potencial biomarcador de monitoramento de efeitos genotóxicos, sendo indicado como prognóstico de diversos tipos tumorais (MATTHAIOS et al., 2013; TURINETTO; GIACHINO, 2015).

2.3.3.4 *MDM2*

O gene *MDM2* (murine double minute 2) é encontrado no cromossomo 12 na posição q15 (NCBI, 2017n). Codifica uma proteína que age de forma antagônica ao supressor tumoral p53. *MDM2* funciona como uma ligase de ubiquitina E3 que inativa a p53. O aumento da expressão deste gene é dado por mecanismos desconhecidos e ocorre em muitos tumores. Isto é devido ao fato de que os níveis aumentados de *MDM2* inativam as funções apoptóticas e de paragem do ciclo celular mesmo com a expressão normal de p53, evento comum na gênese de muitos tipos de tumores. Foram identificadas muitas outras proteínas que interagem com *MDM2*, como por exemplo, pode se ligar a outro supressor de tumor, ARF agindo de forma independente da p53 (IWAKUMA; LOZANO, 2003; WADE; LI; WAHL, 2013).

2.3.3.5 *PARP1*

O gene *PARP1* (poly(ADP-ribose) polymerase 1) está localizado no cromossomo 1 na posição q42.12 e codifica uma enzima relacionada que tem a capacidade de catalisar a transferência de ADP-ribose para proteínas alvo. (NCBI, 2017o). Está envolvida na regulação de vários processos celulares importantes tais como diferenciação, proliferação e transformação de tumores e também na regulação dos eventos moleculares envolvidos na recuperação de células de danos no DNA (MORALES et al., 2014).

O papel das proteínas PARP no reparo do DNA têm despertado um grande interesse da comunidade científica, devido a descoberta de que certos tumores defeituosos nos mecanismos de recombinação homóloga, dependente do reparo do DNA mediada por PARP para a sobrevivência, apresentando serem sensíveis à inibição desta proteína.

Recente demonstração de que os inibidores de PARP são agentes antitumorais ativos em tumores com os genes *BRCA1* e *BRCA2* mutantes A via de PARP e a sua inibição, assim, oferece uma série de oportunidades para a intervenção terapêutica contra o câncer (MORALES et al., 2014; ROULEAU et al., 2010).

2.3.4 Expressão de genes relacionados a morte celular

As vias de suicídio intrínsecas às células, denominadas morte celular programada, são cruciais para o desenvolvimento animal, a homeostase dos tecidos e a patogênese. (FUCHS; STELLER, 2015). É tipicamente discutida como apoptose ou necrose. Sendo a apoptose descrita como um processo ativo e programado do desarranjo celular autônomo que evita induzir a inflamação. Já a necrose caracterizada como a morte celular passiva e acidental resultante de perturbações ambientais com liberação descontrolada de conteúdo celular inflamatório (FINK et al., 2005).

Entretanto, diferentes tipos de morte celular têm sido caracterizados, tais como entosis, catástrofe mitótica, necroptose, piroptose, entre outros, e são definidos através de critérios morfológicos e mecanismos bioquímicos específicos. Desta forma, para definir o tipo de morte celular vê-se necessário estudos não só dos padrões estruturais das células, como também as rotas bioquímicas de ativação utilizadas. Como por exemplo, deve-se levar em consideração que os mecanismos independentes de caspases podem interagir com caspases, assim como substituí-las, na execução de vias de sinalização letal e que a autofagia é um tipo de morte celular que ocorre juntamente com vacuolização autofágica, porém não é uma característica obrigatória (KROEMER et al., 2009).

Pode-se definir, brevemente, a morte celular programada como um mecanismo dependente de sinais geneticamente codificados que atuam dentro da célula numa sequência de eventos potencialmente modificável que levaram à morte da célula. Desta forma, têm-se como conceitos: Apoptose definida pela ação de um subconjunto de caspases que altera a morfologia celular através da condensação nuclear e citoplasmática e formando de fragmentos celulares ligados à membrana ou de corpos apoptóticos de característica não inflamatória. A autofagia definida pela degradação de componentes celulares dentro da célula geralmente com a formação de vacúolos autofágicos e característica não inflamatória. A piroptose sendo a via

pró-inflamatória resultante da atividade da caspase-1, que conduz à ruptura da membrana e processamento de citocinas pró-inflamatórias, e necrose como a observação pós-morte das células caracterizado pela liberação do conteúdo citoplasmático no ambiente (FINK et al., 2005).

2.3.4.1 *Caspases*

As caspases (*cysteine-aspartic-acid-proteases*) são uma família de endoproteases envolvidas diretamente em vias que controlam a inflamação e a morte celular. A ativação de caspases apoptóticas resulta na inativação ou ativação de substratos e na geração de uma cascata de eventos de sinalização permitindo a degradação controlada de componentes celulares. O controle da cascata das caspases são essências para os diversos processos celulares envolvidos na homeostase e diferenciação celular. A ativação de caspases inflamatórias resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias e na promoção de respostas imunes inatas a vários insultos internos e externos. A desregulação de caspases tem sido vinculada a diversas doenças humanas, incluindo câncer e distúrbios inflamatórios, e grandes esforços para conceber melhores terapias para estas doenças procuram entender como essas enzimas funcionam e como eles podem ser controlados (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2015).

As caspases podem ser divididas em três grupos, de acordo com o seu modo de ação: as primeiras a receberem o sinal de morte celular e ativam outras caspases chamadas de iniciadoras, são as caspases 2, 8, 9 e 10. Um segundo grupo comporta aquelas chamadas de efetoras, são ativadas pelas iniciadoras, estas são responsáveis por clivar as proteínas-chave envolvidas no processo de degradação dos produtos intracelulares, compreendem as caspases 3, 6 e 7. E um último grupo que possui função inflamatória, estando envolvidas na maturação de citoquinas, sendo estas as caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14 (LI; YUAN, 2008; RIEDL; SHI, 2004).

A morte celular programada, em mamíferos apresenta duas vias, a via extrínseca ou via do receptor da morte (caspase-8) e a intrínseca ou via mitocondrial (caspase-9). De forma sucinta, a via extrínseca é desencadeada pela ativação de caspases associadas à via de sinalização dos receptores de morte. Os receptores da morte, como os fatores de necrose

tumoral (rTNF), estão localizados na superfície celular e quando estimulados transmitem ativa a caspase-8 que dá início a cascata de ativação de morte (LI; YUAN, 2008).

Já a via intrínseca pode ser estimulada por diferentes agentes, físicos, químicos ou biológicos, que geralmente, ativam estímulos mitocondriais e dispara a fase de iniciação mediada pela Caspase-9. Durante a apoptose a permeabilidade das membranas mitocondriais sofre diversas alterações, induzindo a formação de poros na membrana desestabilizando a sua função, que por sua vez desencadeia uma rede de processos envolvidos na morte celular (LI; YUAN, 2008). Sendo assim, agentes que geram estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes, entre outros, podem contribuir para a formação de poros na membrana mitocondrial (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; VYSSOKIKH; BRDICZKA, 2003). Desta forma, o controle da atividade das caspases apresenta ser bons alvos moleculares para fins terapêuticos (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2015).

2.3.4.2 *BIRC5*

O gene *BIRC5* (*baculoviral IAP repeat containing 5*) está localizado no cromossomo 12 na posição q25.3 (NCBI, 2017p). Este gene é pertencente à família de survivinas, ou seja, de genes inibidores de apoptose (IAP), que codificam proteínas reguladoras negativas que impedem a morte celular apoptótica. A expressão do gene *BIRC5* é controlada por mecanismos de transcrição, *splicing* alternativo e extensas modificações pós-transcricionais e a proteína BIRC5 tem como alvo, inibir as caspases 3 e 7. Em nível transcricional, a survivina pode ser regulada pela β -catenina, pelos fatores de transcrição Sp1, Stat3, HIF-1 α e pelo p53 que pode reprimir de maneira transcricional sua expressão (CHEN et al., 2016).

Polimorfismos do gene da survivina têm sido correlacionados a agressividade do tumor bem como a expectativa de vida dos doentes com câncer. A expressão diferencial de survivina em células cancerosas em comparação com tecidos normais e seu papel no estímulo de várias de vias celulares o torna um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de drogas (JAISWAL; GOEL; MITTAL, 2015).

2.3.4.3 *BECN1*

O gene *BECN1* (*Beclin 1*) está localizado no cromossomo 17 posição q21.31 e codifica uma proteína que regula a autofagia (NCBI, 2017q). A proteína codificada é um componente do complexo fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) que medeia processos de tráfico de vesículas. Interage com vários cofatores para regular a proteína Vps-34 da quinase lipídica e promove a formação de Beclin 1-Vps34- Vps15, e o subsequente recrutamento de proteínas Atg adicionais que orquestram a formação de autofagosomas, induzindo assim a autofagia. Em contraste, o domínio BH3 de Beclin 1 está ligado a, e inibido por BCL-2 ou Bcl-XL. Esta interação pode ser interrompida pela fosforilação de BCL-2 e Beclin 1, ou ubiquitinação da Beclin 1. Excepcionalmente, a caspase mediada por clivagem de Beclin 1 promove o link entre apoptose e autofagia (KANG et al., 2011; SINHA; LEVINE, 2008).

Além disso, *Beclin 1* está implicado em numerosos processos biológicos, incluindo adaptação ao estresse, desenvolvimento, endocitose, citocinese, imunidade, tumorigênese, envelhecimento e morte celular, o que torna um alvo potencialmente valioso para várias terapias, incluindo o tratamento antitumoral (WIRAWAN et al., 2012).

2.3.4.4 *PUMA*

O gene *BBC3* (*BCL2 binding component 3*) ou *PUMA* está localizado no cromossomo 19 na posição q13.32. Este gene codifica um membro da família BCL-2 de proteínas, sendo pertencente à subclasse pró-apoptótica BH3-only. Este gene codifica duas proteínas contendo o domínio BH3 (*PUMA- α* e *PUMA- β*) que são induzidas nas células após a ativação de p53. *PUMA- α* e *PUMA- β* atuam de forma semelhantes. Eles se ligam a BCL-2, localizam as mitocôndrias para induzir a liberação do citocromo c, e ativam a rápida indução da morte celular programada (NAKANO et al., 2001).

É um importante mediador de apoptose dependente e independente de p53 induzida por uma grande variedade de estímulos, incluindo estresse genotóxico, expressão de oncogenes, toxinas, estresse oxidativo, retirada de fator de crescimento/citocinas e infecção. Ele serve como uma molécula de sinalização proximal cuja expressão é regulada por fatores de transcrição em resposta a esses estímulos. Embora a expressão elevada de *PUMA* provoque uma maior sensibilização das células tumorais a quimio e radioterapia, a inibição da expressão de *PUMA* pode ser útil para reduzir a morte celular excessiva associada a lesões teciduais e doenças degenerativas. Desta forma, o *PUMA* age como um sensor de estímulos

de morte celular e um alvo de drogas promissor para a terapia do câncer e danos nos tecidos (YU; ZHANG, 2008).

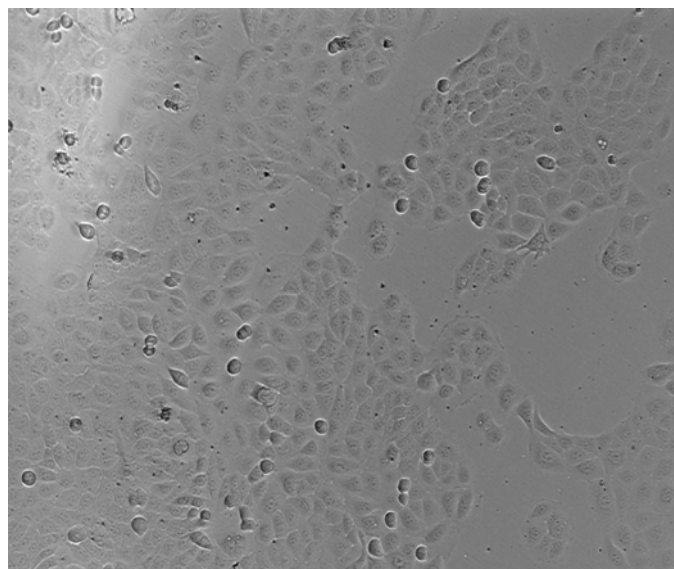
2.4 Linhagem HaCat

A epiderme, como é chamado o epitélio da pele, é um tipo de revestimento escamoso estratificado composto pela compressão de camadas de células mortas complexadas com lipídios, proteínas e filamentos de queratina, que forma uma importante barreira entre o meio interno e o meio externo do organismo, que, além de evitar a perda de água, protege o organismo de danos físicos químicos e agentes de infecciosos.

Os queratinócitos são o principal tipo celular constituinte da epiderme, que consiste em 85% das células da epiderme, é responsável pela produção da barreira de proteção física e química e secretam os filamentos de queratina, seguido das células de Langerhans, de 5-8% do total de células da epiderme, responsáveis pela parte barreira imunológica local e, posteriormente, os melanócitos, com 5% do total da população, responsáveis pela pigmentação e proteção contra danos solares (TSCHARNER; JENSEN, 1997).

HaCat (Figura 3) é a primeira linhagem de célula epidermal humana imortal, resiste a mais de 140 passagens sem entrar em senescência, proveniente de uma transformação espontânea de células histologicamente normais associadas a uma série de alterações cromossômicas. Sendo assim, é caracterizada por apresentar um padrão morfológico similar ao de queratinócito normal, porém com cariótipo aneuplóide. Foi obtida por meio de uma biópsia da pele de um homem caucasiano de 62 anos de idade e posteriormente isolada (BOUKAMP et al., 1988).

Figura 3: Células HaCat (200 X). Imagem obtida através do microscópio óptico EVOS™ FL Auto Cell Imaging System (TermoFisher Scientific



).

Desde sua caracterização, a HaCat vem sendo alvo de muitos estudos, nos quais tem sido utilizada como modelo em testes da área imunológica (GIBBS, 2009), metabólica (CARROLA et al., 2016) e modelo para estudos de análises citotóxicas e farmacêuticos visando evitar o uso de animais para estes fins (NATSCH; EMTER, 2015). Além disso, é um excelente modelo celular para estudos com o selênio, uma vez que esta linhagem demonstra ter alta afinidade na captação deste composto (GANYS; SELF, 2008). Com as estimativas de projeções futuras indicando uma maior incidência de câncer na população mundial, vê-se necessário a descoberta de novos compostos e desenvolvimento de drogas com maior eficácia e seletividade e que consequentemente diminua os efeitos colaterais, proporcionando o tratamento menos agressivo e dando uma maior qualidade de vida ao indivíduo.

Sendo o selênio um composto indicado como um potencial agente terapêutico contra o câncer devido principalmente à sua ação antioxidante, torna-se necessário os estudos com uma análise mais direcionada a células humanas não-tumorais, assim neste estudo utilizou-se a linhagem de queratinócitos espontaneamente imortalizados - HaCat, amplamente utilizado como modelo *in vitro*, para melhor compreender os efeitos intracelulares do tratamento com selenito de sódio em células não tumorais.

3. OBJETIVOS

Investigar a resposta celular de uma linhagem não-tumoral (HaCat) ao tratamento com selenito de sódio evidenciando os efeitos citotóxicos, antiproliferativos e na expressão gênica, contribuindo para o entendimento do mecanismo de ação e o papel desse micronutriente na carcinogênese.

3.1. Objetivos Específicos

- Analisar o potencial citotóxico do selenito de sódio nas concentrações de 10 μM a 80 μM em um período de 24 horas de tratamento na linhagem HaCat;
- Caracterizar o perfil de índice celular da linhagem HaCat tratada com selenito de sódio em tempo real;
- Avaliar a capacidade do selenito de sódio em induzir morte celular e danos na membrana celular e alterações do ciclo celular em células HaCat;
- Averiguar o potencial genotóxico do selenito de sódio em células HaCat;
- Estabelecer o efeito do selenito de sódio na expressão dos principais genes envolvidos no ciclo celular (*CCNA 1*, *CCNB 1*, *CCNB 2*, *CCND 1*, *CHK 1*, *CHK 2*, *mTOR*, *p53* e *p21*, *c-MYC*), danos ao DNA (*ATM*, *ATR*, *GADD 45A*, *H2AX*, *MDM 2* e *PARP 1*), estresse oxidativo (*CAT B*, *GPX 1* e *SOD 1*), e morte celular (*CASP 3*, *CASP 7*, *CASP 8*, *CASP 9*, *BIRC 5*, *BECN 1* e *PUMA*).

4. REFERÊNCIAS

- ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400–414, 2009.
- ABDO, K. M. Sodium Selenate and Sodium Selenite. **National Toxicology Report on Toxicity Studies**, v. Toxicity R, n. 38, p. 127, 1994.
- ABREU, C. L. D. C. Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3t3. **Annals of Physics**, v. 54, p. 104, 2008.
- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 8551, p. 1–14, 2016.
- AL-BADER, A. et al. Selenium and liver cirrhosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 185, p. 1–6, 1998.
- AMARAL, J. B. DO; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, v. 34, p. 1–20, 2011.
- ARRIGONI, C. et al. *In vitro* co-culture models of breast cancer metastatic progression towards Bone. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1405, 2016.
- ARYA, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209–219, 2005.
- BALDO, P. et al. mTOR pathway and mTOR inhibitors as agents for cancer therapy. **Current cancer drug targets**, v. 8, n. 8, p. 647–65, 2008.
- BARRETO, G. et al. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. **Nature**, v. 445, n. February, p. 671–675, 2007.
- BARTEK, J.; LUKAS, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell**, v. 3, n. 5, p. 421–429, 2003.
- BAUM, M. K. et al. Effect of micronutrient supplementation on disease progression in asymptomatic, antiretroviral-naive, HIV-infected adults in botswana a randomized clinical trial. **Original Investigation Research**, v. 310, n. 20, p. 2154–2163, 2013.
- BENDICH, A. Dietary Reference Intakes For Vitamin C, Vitamin E, Selenium And Carotenoids. **National Academy Press**, v. 9007, n. 0, p. 9007, 2000.
- BHOGAL, N.; BALLS, M. Translation of new technologies: from basic research to drug discovery and development. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 5, n. 3, p. 250–62, 2008.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **WAO Journal**, v. 5, p. 9–19, 2012.

BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell-line. **Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 3, p. 761–771, 1988.

BOYD, R. Selenium stories. **Nature Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 570–570, 2011.

BOYLE, P.; LEWIN, B. World Cancer Report 2008. **International Agency for Research on Cancer**, 2008.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BRAZIL(ANVISA). Guia Para a Condução de Toxicologia e Segurança. p. 1–48, 2013.

CARERE, A.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. In vitro toxicology methods: Impact on regulation from technical and scientific advancements. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1–3, p. 153–160, 2002.

CARLO M. CROCE. Oncogenes and cancer. **new england journal of medicine**, v. 11, p. 358;5, 2008.

CARROLA, J. et al. Insights into the impact of silver nanoparticles on human keratinocytes metabolism through NMR metabolomics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 589, p. 53–61, 2016.

CASIMIRO, M. C. et al. Cyclins and cell cycle control in cancer and disease. **Genes & cancer**, v. 3, n. 11–12, p. 649–57, 2012.

CASTANEDA, F. et al. Role of undecan-2-one on ethanol-induced apoptosis in HepG2 cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 23, n. 6, p. 477–485, 2007.

CHEN, X. et al. **Survivin and tumorigenesis: Molecular mechanisms and therapeutic strategies** **Journal of Cancer**, Journal of Cancer, v. 7, n. 3, p. 314–323, 2016.

CLAASSEN, G. F.; HANN, S. R. A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-MYC in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 17, p. 9498–503, 2000.

COMINETTI, C.; COZZOLINO, S. M. F. Selênio. In: COMINETTI, C.; COZZOLINO, S. M. F. (Eds.). **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes-Selênio**. [s.l.] ILSI Brasil, 2009. v. 8.

COMMISSION, E. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Selenium. n. October, 2000.

CUI, Z. et al. Sodium selenite (Na₂SeO₃) induces apoptosis through the mitochondrial pathway in CNE-2 nasopharyngeal carcinoma cells. **International Journal of Oncology**, p.

2506–2514, 2015.

DESAULNIERS, D. et al. Causes of genome instability: The effect of low dose chemical exposures in modern society. **Carcinogenesis**, v. 36, p. S61–S88, 2015.

ERRANTE, P. R. et al. Flow cytometry : a literature review. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 14, p. 211–224, 2015.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Revista Brasileira De Cancerologia**, v. 52, n. 2, p. 165–171, 2006.

FINK, S. L. et al. Eukaryotic cells minireview apoptosis , pyroptosis , and necrosis : mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907–1916, 2005.

FINLEY, J. W. Selenium accumulation in plant foods. **Nutrition Reviews**, v. 63, n. June, p. 196–202, 2005.

FITZGERALD, K. A. et al. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 215, p. 39–54, 2015.

FRANCESCONI, K. A.; PANNIER, F. Selenium metabolites in urine: A critical overview of past work and current status. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 2240–2253, 2004.

FUCHS-TARLOVSKY, V. Role of antioxidants in cancer therapy. **Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 329–344, 2015.

GANYC, D.; SELF, W. T. High affinity selenium uptake in a keratinocyte model. **FEBS Letters**, v. 582, n. 2, p. 299–304, 2008.

GIBBS, S. In vitro irritation models and immune reactions. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, n. 2, p. 103–113, 2009.

GOLIAS, C. H.; CHARALABOPOULOS, A.; CHARALABOPOULOS, K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. **International Journal of Clinical Practice**, v. 58, n. 12, p. 1134–1141, 2004.

GOYAL, M. M.; BASAK, A. Human catalase: Looking for complete identity. **Protein and Cell**, v. 1, n. 10, p. 888–897, 2010.

GREGORI-PUIGJANÉ, E. et al. Identifying mechanism-of-action targets for drugs and probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 28, p. 11178–83, 2012.

GUO, C. H. et al. Effects of selenium yeast on oxidative stress, growth inhibition, and apoptosis in human breast cancer cells. **International Journal of Medical Sciences**, v. 12, n.

9, p. 748–758, 2015.

HARTIKAINEN, H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, n. 4, p. 309–318, 2005.

HAWKES, W. C.; TUREK, P. J. Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 764–72, 2001.

HODGSON, S. Mechanisms of inherited cancer susceptibility. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 9, n. 1, p. 1–4, 2008.

HOLBOURN, K. P.; ACHARYA, K. R.; PERBAL, B. The CCN family of proteins: structure-function relationships. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 33, n. 10, p. 461–473, 2008.

HOUTGRAAF, J. H.; VERSMISSEN, J.; VAN DER GIESSEN, W. J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, v. 7, n. 3, p. 165–172, 2006.

HUAWEI, Z. Selenium as an essential micronutrient: Roles in cell cycle and apoptosis. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1263–1278, 2009.

IPCS. **International Programme on Chemical Safety**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc58.htm#SectionNumber:2.1>>. Acesso em: 4 out. 2016.

IWAKUMA, T.; LOZANO, G. MDM2 , An Introduction. **Molecular Cancer Research**, v. 1, n. December, p. 993–1000, 2003.

JAISWAL, P. K.; GOEL, A.; MITTAL, R. D. Survivin: A molecular biomarker in cancer. **Indian Journal of Medical Research**, v. 141, n. April, p. 389–397, 2015.

KANG, R. et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. **Cell Death And Differentiation**, v. 18, n. 4, p. 571–80, 2011.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–323, 2004.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. [s.l.: s.n.].

KLÖPPEL, C. et al. In yeast redistribution of Sod1 to the mitochondrial intermembrane space provides protection against respiration derived oxidative stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 403, n. 1, p. 114–119, 2010.

KODYDKOVÁ, J. et al. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of Its activity in different diseases. **Folia Biologica (Czech Republic)**, v. 60, n. 4, p. 153–167, 2014.

KROEMER, G. et al. Classification of Cell Death 2009. **Cell Death And Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiology Review**, p. 99–163, 2007.

LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 3, p. 739–77, 2014.

LAKIN, N. D.; JACKSON, S. P. Regulation of p53 in response to DNA damage. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7644–7655, 1999.

LAKSHMI, B. V. S.; SUDHAKAR, M.; PRAKASH, K. S. Protective effect of selenium against aluminum chloride-Induced Alzheimer disease: Behavioral and biochemical alterations in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 165, n. 1, p. 67–74, 2015.

LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 8, n. 7, p. 547–566, 2009.

LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 2, n. 10, p. 1–18, 2010.

LEI, X. G.; CHENG, W.-H.; MCCLUNG, J. P. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. **Annual Review of Nutrition**, v. 27, p. 41–61, 2007.

LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6194–206, 2008.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079–93, 2013.

LIU, W. et al. Distribution of cuzn superoxide dismutase in rat liver. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 201–207, out. 1993.

LIU, J.; ROZOVSKY, S. Membrane-Bound Selenoproteins. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 10, p. 795–813, 2015.

LOSCALZO, J. Keshan Disease, Selenium Deficiency, and the Selenoproteome. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 18, p. 1756–1760, 2014.

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 7, p. 1957–97, 2011.

MACFARQUHAR, M. J. K. et al. Acute Selenium Toxicity Associated With a Dietary Supplement. **Archive of Internal Medicine**, v. 170, n. 3, p. 256–261, 2010.

MARÉCHAL, A.; ZOU, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 9, p. 1–18, 2013.

- MATTHAIOS, D. et al. H2AX a promising biomarker for lung cancer: a review. **Cancer investigation**, v. 31, n. 9, p. 582–99, 2013.
- MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase Functions in Cell Death and Disease: Figure 1. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 4, p. a026716, 2015.
- MEHDI, Y. et al. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3292–3311, 2013.
- MELOROSE, J.; PERROY, R.; CAREAS, S. Study Guide - Biotechnology and Cell Culture. In: **Study Guide - Biotechnology and Cell Culture**. [s.l.] Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015, 2015. v. 1p. 2604.
- MIGITA, N. A. “Cultivo celular in vitro : importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares”. **Monografia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP**, 2012.
- MILANI, P. et al. SOD1 transcriptional and posttranscriptional regulation and its potential implications in ALS. **Neurology Research International**, v. 2011, n. Figure 1, 2011.
- MORALES, J. C. et al. Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.**, v. 24, n. 1, p. 15–28, 2014.
- MOXON, A. L. Alkali disease or selenium poisoning. p. 91, 1937.
- MUTH, O. H. et al. Effects of Selenium and Vitamin E on White Muscle Disease. **Science**, v. 128, p. 576, 1958.
- NAKANO, K. et al. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. **Molecular cell**, v. 7, n. 3, p. 683–94, 2001.
- NATSCH, A.; EMTER, R. Reporter cell lines for skin sensitization testing. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 10, p. 1645–1668, 2015.
- NCBI. **CAT**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/847>>. Acesso em: 2 fev. 2017a.
- NCBI. **GPX1**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2876>>. Acesso em: 2 fev. 2017b.
- NCBI. **SOD1**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6647>>. Acesso em: 2 fev. 2017c.
- NCBI. **CHEK1**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1111>>. Acesso em: 6 fev. 2017d.
- NCBI. **CHEK2**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11200>>. Acesso em: 6 fev. 2017e.

NCBI. **mTOR**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2475>>. Acesso em: 6 fev. 2017f.

NCBI. **Tp53**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>>. Acesso em: 7 fev. 2007g.

NCBI. **CDKN1A**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1026>>. Acesso em: 7 fev. 2007h.

NCBI. **MYC**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=26292>>. Acesso em: 7 fev. 2017i.

NCBI. **ATM**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/472>>. Acesso em: 7 fev. 2017j.

NCBI. **ATR**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/545>>. Acesso em: 7 fev. 2017k.

NCBI. **GADD45A**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1647>>. Acesso em: 7 fev. 2017l.

NCBI. **H2AFX**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3014>>. Acesso em: 7 fev. 2017m.

NCBI. **MDM2**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4193>>. Acesso em: 7 fev. 2017n.

NCBI. **PARP1**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/142>>. Acesso em: 7 fev. 2017o.

NCBI. **BIRC5**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/332>>. Acesso em: 7 fev. 2017p.

NCBI. **BECN1**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8678>>. Acesso em: 7 fev. 2017q.

NELSON, A. A.; FITZHUGH, O. G.; CALVERY, H. O. Liver Tumors Following Cirrhosis Caused by Selenium in Rats. **Cancer Research**, v. 3, n. 4, p. 230–236, 1943.

NIIDA, H.; NAKANISHI, M. DNA damage checkpoints in mammals. **Mutagenesis**, v. 21, n. 1, p. 3–9, 2006.

O'NEIL, M. J. (ED. .); SMITH, A. (ED. .); HECKELMAN, P. E. (ED. . Sodium Selenite. In: **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 11. ed. [s.l: s.n.]. p. 1368.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. Cu,Zn-SOD in mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38388–38393, 2001.

OLM, E. et al. Extracellular thiol-assisted selenium uptake dependent on the x(c)- cystine transporter explains the cancer-specific cytotoxicity of selenite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 27, p. 11400–11405, 2009.

PAPP, L. V.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. K. Selenium and selenoproteins in health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 7, p. 793–795, 2010.

PATTERSON, E. L.; MILSTREY, R.; STOKSTAD, E. L. R. Effect of selenium in preventing exudative diathesis in chicks. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 95, 1957.

REDDI, A. S.; BOLLINENI, J. S. Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF-beta1 in normal and diabetic rats. **Kidney International**, v. 59, n. 4, p. 1342–53, 2001.

REEVES, M. A.; HOFFMANN, P. R. The human selenoproteome: Recent insights into functions and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 15, p. 2457–2478, 2009.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1^o ed. Canoas/RS: editora da ULBRA, 2003.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 11, p. 897–907, 2004.

RISHER, J. et al. Toxicological Profile for Selenium. **ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, n. September, p. 1–457, 2003.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.

RONCO, C. et al. ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells. **Medicinal Chemical Communications**, 2016.

ROULEAU, M. et al. PARP inhibition: PARP1 and beyond. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 4, p. 293–301, 2010.

SANCAR, A. et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 0066–4154 (Print) LA–eng PT–Journal Article PT–Review RN–0 (Cross–Linking Reagents) RN–9007–49–2 (DNA) SB–IM, p. 39–85, 2004.

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 3292–3293, 1957.

SHILOH, Y. ATM and ATR: Networking cellular responses to DNA damage. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 11, n. 1, p. 71–77, 2001.

SIGMA-ALDRICH. Sodium selenite Product. **Product Information**, v. 173, n. C, p. 6628, 2003.

SINHA, S.; LEVINE, B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. **Oncogene**, v. 27 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S137-48, 2008.

STAHL, P. L. et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. **Science**, v. 353, n. 6294, p. 78–82, 1 jul. 2016.

STOICA, A; PENTECOST, E.; MARTIN, M. B. Effects of selenite on estrogen receptor-alpha expression and activity in MCF-7 breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 141, n. 10, p. 3595–3602, 2000.

STRANO, S. et al. Mutant p53: an oncogenic transcription factor. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2212–2219, 2007.

SUN, W.; YANG, J. Functional mechanisms for human tumor suppressors. **Journal of Cancer**, v. 1, n. 1, p. 136–140, 2010.

SUZUKI, K. T. Metabolomics of Selenium: Se Metabolites Based on Speciation Studies. **Journal of Health Science**, v. 51, n. 2, p. 107–114, 2005.

TAMURA, R. E. et al. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. **Current Molecular Medicine**, v. 12, n. 5, p. 634–51, 2012.

TSCHARNER, C. V. O. N.; JENSEN, P. J. Review article Keratinocyte biology and pathology. **Veterinary Dermatology**, v. 8, n. 2, p. 67–100, 1997.

TURINETTO, V.; GIACHINO, C. Survey and summary multiple facets of histone variant H2AX: A DNA double-strand-break marker with several biological functions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 5, p. 2489–2498, 2015.

URUSHITANI, M. et al. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 108–118, 2006.

VINCETI, M. et al. Friend or Foe? The current epidemiologic evidence on selenium and human cancer risk. **Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 305–341, 2013.

VOUSDEN, K. H.; RYAN, K. M. P53 and Metabolism. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 10, p. 691–700, 2009.

VYSSOKIKH, M. Y.; BRDICZKA, D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 2, p. 389–404, 2003.

WADE, M.; LI, Y.-C.; WAHL, G. M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews: Cancer**, v. 13, n. 2, p. 83–96, 2013.

WASTNEY, M. E. et al. A human model of selenium that integrates metabolism from selenite and selenomethionine. **The Journal of nutrition**, v. 141, n. C, p. 708–717, 2011.

WIRAWAN, E. et al. Beclin1: A role in membrane dynamics and beyond. **Autophagy**, v. 8, n. 1, p. 6–17, 2012.

YANG, Y. et al. The anticancer effects of sodium selenite and selenomethionine on human colorectal carcinoma cell lines in nude mice. **Oncology Research**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2009.

YEGER, H.; PERBAL, B. The ccn family of genes: A perspective on ccn biology and therapeutic potential. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 1, n. 3–4, p. 159–164, 2007.

YOON, S. O.; KIM, M. M.; CHUNG, A. S. Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 20085–20092, 2001.

YU, J.; ZHANG, L. PUMA, a potent killer with or without p53. **Oncogene**, v. 27 Suppl 1, p. S71–83, 2008.

YUAN, J.; ADAMSKI, R.; CHEN, J. Focus on histone variant H2AX: To be or not to be. **FEBS Letters**, v. 584, n. 17, p. 3717–3724, 2010.

ZEIGER, E. History and rationale of genetic toxicity testing: An impersonal, and sometimes personal, view. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, n. 5, p. 363–371, 2004.

ZHAO, R. et al. Effects of selenite and genistein on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. **Nutrition and cancer**, v. 61, n. 3, p. 397–407, 2009.

ZHOU, H.; LUO, Y.; HUANG, S. Updates of mTOR inhibitors. **Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 571–81, 2010.

ZHU, M.; GONG, Y.; FRENKEL, G. D. Studies on the mechanism of the selenite-induced decrease in cell attachment: effect of selenite on the levels of fibronectin receptor (alpha5beta1 integrin) mRNAs. **Biological Trace Element Research**, v. 62, n. 3, p. 123–134, 1998.

5. ARTIGO

A ser submetido à revista Food and Chemical Toxicology (2015 Impact Factor: 3,584)

Citotoxicidade do selenito de sódio em células HaCat induzindo morte celular por alteração da expressão de mRNA dos genes PUMA, ATR e mTOR

Natanael Andrew Souto Maior Torres Bonfim*, Adrivânio Baranoski*, Mario Sérgio Mantovani*

*Departamento de Biologia geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

Resumo

O selenito de sódio é um composto que tem sido utilizado como suplemento alimentar devido a sua ação antioxidante, tendo despertado a atenção da comunidade científica por se revelar um potencial coadjuvante no tratamento do câncer em testes com células tumorais. A fim de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na exposição de células não tumorais ao selenito de sódio, o presente estudo investigou os efeitos citotóxicos e antiproliferativos do selenito de sódio e seus efeitos na modulação da expressão gênica nas principais vias de morte celular, ciclo celular, estresse oxidativo e dano e reparo do DNA na linhagem de células não-tumoral de queratinócitos (HaCat). Nossos testes, demonstram que o tratamento com selenito de sódio apresentou citotóxicidade a partir da concentração de 10 μ M, simultaneamente a alterações morfológicas das células (granulações citoplasmáticas), porém não apresentou efeito genotóxico. O selenito foi indutor de dano na membrana, morte e de parada de ciclo nas células. O tratamento induziu alterações nos níveis de mRNA para os genes *mTOR*, *ATR* (redução) e *PUMA* (aumento). Entretanto, não houve modulação na expressão de caspases bem como dos genes *PARP 1*, *BIRC 5*, *BECN 1* e *c-MYC*, indicando que o selenito de sódio causa apoptose PUMA-dependente em células HaCat. Contudo, os genes analisados, relacionados ao estresse oxidativo e dano e reparo do DNA e no ciclo celular, não apresentaram alteração significativa. Nossos resultados, evidenciam o efeito citotóxico do tratamento de selenito de sódio em células HaCat, alterando o padrão de expressão gênica, a morfologia e a proliferação celular em concentrações que são semelhantes a testes em linhagens células tumorais, indicando a possibilidade de efeitos colaterais

indesejáveis se usado como alternativa agente terapêutico nas concentrações a partir de 10 μ M.

Palavras-chave: Citotoxicidade, antiproliferação, mecanismo de ação, HaCaT

INTRODUÇÃO

Diversos estudos na literatura demonstra a essencial importância do selênio para o funcionamento ideal das células, vinculado, sobretudo, à sua ação antioxidante. Tais estudos revelam que a deficiência desse micronutriente está diretamente relacionada no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cânceres, cirrose, diabetes entre outros (AL-BADER et al., 1998; LOSCALZO, 2014; REDDI; BOLLINENI, 2001). Pesquisas têm demonstrado ação antifúngica do selênio como cosméticos capilares (CASTANEDA et al., 2007), na ação antirretroviral (BAUM et al., 2013), na prevenção contra o Alzheimer (LAKSHMI; SUDHAKAR; PRAKASH, 2015), a importância na fertilidade masculina (HAWKES; TUREK, 2001) e, principalmente, ação protetora contra o câncer (HUAWEI, 2009; YANG et al., 2009; YOON; KIM; CHUNG, 2001).

A forma inorgânica do selênio, selenito de sódio, é amplamente utilizada em suplementos alimentar como fonte de selênio para o corpo humano, e é alvo de diversos experimentos com células de linhagem tumoral, que evidenciam o potencial do selenito de sódio como promissor quimioterápico contra o câncer devido a sua atividade antioxidante (BENDICH, 2000), quimiopreventiva (STOICA; PENTECOST; MARTIN, 2000; ZHAO et al., 2009), citotóxica (CUI et al., 2015) e a sua ação anti-metastática *in vitro* (YOON; KIM; CHUNG, 2001; ZHU; GONG; FRENKEL, 1998). No entanto, estudos sobre seu efeito citotóxico e genotóxico em células não-tumorais ainda são escassos.

Yoon e colaboradores (2001) relataram a ação antimetastática do selenito em células HT1080, onde o selenito [3 μ M] inibiu a interação matriz-célula, regulou a atividade de proteases associadas a invasão, além de regular os fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B (YOON; KIM; CHUNG, 2001). Em um outro estudo, Yang et al. (2009) relataram a possibilidade de o selenito de sódio ter ação seletiva, onde avaliaram o potencial terapêutico do selênio, injetando as formas de seleniomietionina e selenito de sódio em tumores induzidos por células tumorais SW480 injetadas em ratos e tratados por 21 dias; foi observado que tanto o seleniomietionina [2 mg/kg/dia] quanto o selenito de sódio [0,1 mg/kg/dia] inibiram o crescimento tumoral *in vivo*, no qual foi relatado ainda indução de apoptose nas células

SW480 e inibição da expressão do gene *BCL-XL* e aumento na expressão dos genes *BAX*, *BAD* e *BIM* além da ativação da Caspase-9. Zhao et al (2009) em um estudo com células de câncer de próstata (LNCap e PC3), relataram a ação do selenito de sódio [$3\mu\text{M}$] como potente indutor de apoptose e através da técnica de Western blot, nas células tratadas com $1,5\ \mu\text{M}$ de selenito de sódio, houve inibição da AKT bem como induziu apoptose e parada de ciclo em G2/M. Tais estudos mostram que o selenito de sódio pode atuar tanto antes quanto depois do dano celular. Entretanto, Macfarquhar et al. (2010) realizaram um levantamento avaliando casos de envenenamento nos Estados Unidos da América, no qual foram analisados 201 casos em 10 estados, sendo, a suplementação exacerbada de selênio, a causa de tal enfermidade caracterizando como um significativo risco a saúde pública ressaltando a necessidade de uma maior regulação da liberação deste composto para o consumo humano.

Em um estudo experimental com humanos, afim de avaliar o efeito da dieta suplementada com selênio, Vinceti et al. (2013) demonstraram que a suplementação não reduziu o risco de desenvolver câncer, podendo até mesmo aumentar o risco de desenvolver alguns cânceres sítio-específicos como, por exemplo, neoplasias de pele. Este estudo evidencia o potencial tóxico do selênio ligado a suplementação alimentar. Guo et al. (2015) analisou o efeito do selenito de sódio em linhagens de células tumorais de mama (MCF7 e MDA-MB-231) em comparação com a linhagem de células não tumorais de epitélio de mama humana (HMEC) e notou que baixas doses de selenito de sódio induziu o estresse oxidativo, inibiu o crescimento celular e induziu apoptose somente nas linhagens tumorais testadas.

A compreensão dos efeitos do selenito de sódio em genes envolvidos na apoptose e progressão do ciclo celular em células não tumorais, pode fornecer importantes informações sobre os processos prejudiciais ou benéficos para a homeostase celular. Desta forma, utilizou-se a linhagem celular não-tumoral de queratonócitos - HaCat, linhagem modelo em estudos toxicológicos, para o estudo dos possíveis efeitos citotóxicos e antiproliferativos do selenito de sódio correlacionando com alterações da expressão gênica envolvidas na morte, ciclo celular, estresse oxidativo e danos ao material genético.

MATERIAIS E METODOS

Linhagem Celular e Condições de Cultura

Foi utilizada a linhagem não-tumoral HaCat (linhagem celular proveniente de queratinócitos saudáveis transformados) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, livres de micoplasma. As células foram cultivadas em monocamada em frascos para cultura de 25 cm² com 5 mL de meio DMEM (Gibco, nº12800-017) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, nº12657-029) e 0,1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) e mantidas em estufa a 37°C a 5 % de CO₂ (Apêndice-Figura 4), com o tempo de ciclo celular aproximado de 24 horas.

Agentes Químicos

Para uso na cultura de células, o selenito de sódio (Na₂SeO₃, Sigma, CAS: 10102-18-8) foi diluído em DMEM. Para o ensaio de cometa, foi utilizado a Doxorrubicina (CAS 25316-40-9, Adriblastina® - Pharmacia) na concentração de 1µM como controle de indutor de dano no DNA. Utilizou-se camptotecina (Nº de cat. C9911; CAS: 7689-03-4, Sigma Aldrich®) na concentração de 0,5 µM no como controle positivo para a análise do índice celular em tempo real e 1 µM como controle positivo para os demais testes.

Ensaio de Citotoxicidade - MTT

Para a avaliação da viabilidade celular através do estado de metabolização celular, foi utilizado o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio - (CAS 298931; Sigma Aldrich®)) descrito por Mosmann (1983) com adaptações. Foram utilizadas placas de 96 poços e semeadas 5x10³ células em cada poço. Após 24 horas de estabilização, os poços foram tratados com meio contendo selenito de sódio nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µM por 24 horas. Passado o período de tratamento, removeu-se o meio de cultura e as células foram incubadas com 100 µL meio de cultura celular sem soro bovino fetal com a solução de MTT a 0,5 mg/mL. Após 4 horas de

incubação à 37°C. O sobrenadante foi removido e os cristais de formazan formados em cada poço foram diluídos em 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido) para leitura em espectrofotômetro (TP Reader - Thermo Plate) ao comprimento de onda de 540 nm (Apêndice-Figura 5). Os dados foram apresentados com percentuais de viabilidade celular que foram obtidos através do seguinte cálculo: $[(\text{Absorbância Média de Tratamento} * 100) / (\text{Absorbância Média de Controle})]$. O padrão morfológico das células foi acompanhado através de imagens obtidas com o microscópio EVOS™ FL *Auto Cell Imaging System* (Termo Fisher Scientific). Os experimentos foram realizados em três repetições e os tratamentos em seis replicata (poços).

Análise Celular em Tempo Real (RTCA)

Para a avaliação da cinética de proliferação celular, foi utilizado o leitor xCELLigence RTCA – Real Time Cell Analyzer – ROCHE equipado com uma *E-Plate* de 96 poços. Esta placa possui microeletrodos posicionados ao fundo dos poços que possibilita a detecção do índice celular através da impedância elétrica causada pelo acúmulo de células em cada poço, os quais foram convertidos em curva de proliferação celular (ABASSI et al., 2009a) sucedendo-se o seguinte protocolo recomendado pelo fabricante: Foi realizado o *background* com 50µL de meio de cultura, posteriormente foi acrescentado 100µL de meio de cultura suplementado com 10% de SBF contendo 5×10^3 células e encubadas por 24 horas para estabilização. Passado o período de estabilização, retirou-se 50µL de meio dos poços e foi adicionado 100µL de meio com os tratamentos de SS [5,10, 20 e 40µM], finalizando o volume final de 200 µL por poço. A proliferação celular foi monitorada em tempo real em intervalos de 30 min durante por 72 horas após o início dos tratamentos. Foi realizado um experimento contendo dezesseis replicatas para cada tratamento. Esquema representativo no Apêndice-Figura 6.

Avaliação de genotoxicidade

Foi realizado o ensaio do cometa (GLEI; SCHNEIDER; SCHLÖRMANN, 2016) com a finalidade de analisar o efeito genotóxico de três concentrações citotóxicas avaliadas,

ou seja, detectar se as concentrações de 10, 20 e 40 μM de selenito de sódio causam danos ao DNA.

Para o experimento 3×10^5 células foram semeadas em tubos de 10 cm^2 e após 24h de estabilização foram tratadas, sendo um controle negativo, contendo apenas meio de cultura; três concentrações supracitadas de selenito de sódio e um controle positivo com o agente indutor de danos no DNA (doxorubicina $1 \mu\text{M}$). As células foram tratadas e encubadas pelo período de três horas, tempo estipulado para poder identificar os possíveis danos iniciais afim de evitar falsos negativos por possível ação do mecanismo de reparo como descrito por Hartmann e Speit (1997). Após o tempo de tratamento, foi descartado o meio de cultura, adicionado 300 μL de tripsina a 0,1% e encubadas a 37°C por 10min, logo em seguida, foi adicionado meio de cultura para neutralização da tripsina e solubilização das células, posteriormente foram centrifugadas (5 min/1000 rpm) e ressuspensas em meio de cultura, diluídas em agarose de baixo ponto de fusão (LMP 0,5%) e distribuídas em lâminas pré-gelatinizadas (agarose ponto de fusão normal 1,5%) de 10 a 20 min a 4°C em seguida, retira-se a lâmina. As células foram lizadas (1 mL de Triton X-100, 10mL de DMSO e 89mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: 146,1g de NaCl 2,5 M, 37,2g de EDTA 100mM, 1,2g de Tris 10mM, ~8,0g de NaOH sólido, 890mL de H_2O destilada) por 60 min à 4°C e, posteriormente, submetidas a eletroforese (25V, 300mA) por 20 minutos em cuba horizontal de condições alcalinas - tampão 1X pH > 13,0 (30 mL de NaOH 10N, 5 mL de EDTA 200 mM e H_2O destilada q.s.p. 1000 mL a 4°C). Ao término da eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em tampão pH 7,5 (48,5g de Tris 0,4 M e H_2O destilada q.s.p. 1000 mL) em 3 ciclos de 5 min, secas, fixadas em álcool absoluto por 10 min e armazenadas até avaliação. As lâminas foram coradas com brometo de etídeo (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) no momento da análise. As imagens foram obtidas através do Microscópio EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher) com aumento de 200X e analisadas utilizando o programa CometScore. versão 1.5 (TriTek-Corp, USA) 2004.

Os dados obtidos foram analisados a partir da % de DNA presente na cauda do cometa como recomendado por (GLEI; SCHNEIDER; SCHLÖRMANN, 2016) sendo realizadas em 3 repetições experimentais e 2 réplicas/experimento (Apêndice-Figura 7).

Análise por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para analisar a morte e o ciclo celular, a integridade

de membrana e estimar a concentração celular. Para esta análise, foi utilizado o citômetro de fluxo Guava *easyCyte* (Merck Millipore). Nos experimentos 3×10^5 células foram semeadas em tubos de 10 cm² e após 24h de estabilização receberam os tratamentos. Os tratamentos consistiram em: selenito de sódio na concentração de 10 µM, controle negativo e um positivo com a camptotecina a 1µM diluída em meio pelo período de 24h. Ao final dos tratamentos, as células foram colhidas utilizando tripsina 0,1% (500 µL), centrifugadas a 1000 rpm para remoção do meio de cultura e restos de tratamento, ressuspensas em 500 µL de PBS do qual foi distribuído 100 µL nos tubos correspondentes para análise de morte celular, integridade de membrana e contagem. Foram analisados 5 mil eventos por tratamento, em 3 repetições experimentais (Apêndice- Figura 8).

Morte celular

Para a avaliação de morte celular, após os respectivos tratamentos, utilizou-se o PE annexin V apoptosis detection kit I (BD Pharmingen; cat 559763) segundo as indicações do fabricante. O kit utiliza marcação com anexina V que tem alta afinidade pela fosfatidilserina e 7-AAD substância intercalante de DNA, capaz de classificar os eventos em viáveis (sem nenhuma marcação), apoptose inicial (marcados somente com anexina V), apoptose tardia (marcados com anexina V e 7-AAD) e necrose (marcados somente com 7-AAD).

Integridade de membrana

Para a avaliação da integridade de membrana, após os respectivos tratamentos, utilizou-se a marcação de Iodeto de Propídeo – PI (BD Pharmigen; cat: 51-66211E) que, por sua vez, adentra nas células com membrana danificada sendo então identificado pelo citômetro.

Concentração celular

Para a análise da concentração celular, após os respectivos tratamentos, a suspensão celular foi acrescida de 100 µL de Tampão PBS e analisada a concentração de células/µL em

3 repetições experimentais. A diminuição da concentração celular dos tratamentos em relação ao controle negativo, pode ser um indicativo da toxicidade dos tratamentos.

Análise do ciclo celular

Para a análise do ciclo celular, as células tratadas foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm por 5 min, ressuspensas em 200 µL de PBS e incubadas com 5 µL de RNase (229 µg/mL, CAT: 12091-021) por 30 min a 37 ° C. Posteriormente, 50 µL dessa suspensão foi incubada por 30 min com 200 µL Guava Cell Cycle Reagent (CAT. 4500-0220) no escuro. Neste ensaio os eventos foram separados de acordo com a intensidade de fluorescência emitida pelo iodeto de propídeo. Sendo assim o conteúdo de DNA das células coradas com iodeto de propídeo pode ser distribuído em porcentagem nas diferentes fases do ciclo (G1, S e G2/M)

Análise de Expressão Gênica

A análise de expressão gênica foi realizada a partir da técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) onde foi possível estimar alterações na expressão relativa de genes relacionados aos mecanismos ação do selenito de sódio.

As células foram semeadas em tubos de 10 cm² e, após 24h de estabilização, as células foram tratadas com 10, 20 e 40 µM de selenito de sódio (diluído em DMEM 10% SBF) por 12h. Apesar disso, apenas no tratamento de 10 µM foi possível obter a quantidade de RNA necessária para as análises. Desta maneira, esta concentração foi escolhida para os posteriores testes. Para a extração do RNA, utilizou-se o RNeasy® Mini Kit Qiagen (Cat. N° 74106) seguido com as instruções do fabricante. A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro (BioDrop uLite). A razão (A260/280nm) obtida no espectrofotômetro, foi utilizada para avaliação da pureza do RNA com valores de referência entre 1,8 – 2,1 e sua integridade foi averiguada por gel de agarose 0,8 % com hipoclorito. Foram realizadas três repetições experimentais.

A síntese de cDNA foi realizada em termociclador T100TM (Thermal Cycler BIO-RAD). Para tal, 500 ng de RNA foi diluído em 8 µL de H₂O DEPC, 4 µL de oligo dT (20 pmd/mL) e 4 µL de dNTPs (2,5 mM) e mantidas por 15 minutos a 60° C, finalizado com choque térmico em gelo. Em seguida, adicionou-se 4 µL de um Mix contendo 1,3 µL de água DEPC, 2 µL de Tampão 10X, 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,05 µL de RNAout (2 U) (Invitrogen, Life Technologies) 0,05 µL de enzima transcriptase reversa (M-MLV - Invitrogen, Life Technologies) (10 U) por amostra e mantidas durante 50 minutos à 37°C, 15 minutos à 70°C e deixadas à 10°C.

Para a reação de RT-qPCR, foi utilizado o composto fluorescente (5 μ L) Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (BioRad), além de 0,5 μ L (10pmol) de cada par de oligonucleotídeos e 5 μ L de cDNA (50ng/ μ L) de cada amostra. As reações de qPCR foram realizadas nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 5 minutos e 40 ciclos de [95°C/15 segundos, 60°C/ 15 segundos, 72°C/20 segundos] no aparelho LichtCycle NanoTM - Roche. A análise da curva de Melting foi realizada no final de cada reação com temperatura de 55°C a 95°C a cada 0,5 graus por 20 segundos. As reações RT foram realizadas em triplicata. Os dados foram normalizados com os valores de expressão do gene *RPL-13A* (gene que codifica proteína ribossomal L13, caracterizado como Housekeeping), os quais foram amplificados em conjunto. As análises dos valores relativos de expressão gênica através do método $\Delta\Delta C_t$ descrito por Livak e Schmittgen, (2001). Só foram considerados significativos fatores acima de 2 (+/-).

Diferentes genes estão envolvidos na resposta da célula a um agente químico, no presente trabalho, foram selecionados para a análise os genes: morte celular: *CASP 3* e *CASP 7*-ambos envolvidos na fase iniciadora da apoptose agindo na via intrínseca e extrínseca, nessa ordem -, *PUMA*, *CASP 8* e *CASP 9*- genes de fase efetora e *BECN 1* gene envolvido na autofagia; de defesa contra o estresse oxidativo *CAT B*, *GPX 1* e *SOD 1*; envolvidos no ciclo celular: *CCNA 1*, *CCNB 1*, *CCNB 2*, *CCND 1*, *c-MYC*,- diretamente relacionado a progressão do ciclo; *CHK 1*, *CHK 2*, *p53* e *p21*- relacionados aos pontos de checagem do ciclo, *BIRC 5*- gene anti-apoptótico; e de resposta a danos ao DNA que provocam a parada de ciclo *ATM*, *ATR*, *GADD 45A*, *H2AX*, *MDM2*, *mTOR*,e *PARP 1*. Esquema representativo no apêndice-Figura 9

Análises Estatísticas

Os dados obtidos pelo ensaio de citotoxicidade (MTT), ensaio de cinética de proliferação celular em tempo real e os resultados obtidos em citometria de fluxo estes foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnett ($p < 0,05$) e, para a análise da relação dependência no ensaio de citotoxicidade, foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$), através do programa *GraphPad Prism 5*. Para a análise dos RT-qPCR foi utilizado o programa REST.

RESULTADOS

Ensaio de citotoxicidade – MTT

Por meio do Ensaio do MTT foi possível observar que o selenito de sódio foi citotóxico em todas as concentrações analisadas [10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 μ M] no período de 24 horas, porém não de forma dose-dependente (Figura 10). O critério de seleção das concentrações foi baseado em concentrações similares, realizadas em testes com outras linhagens celulares de acordo com a literatura. O valor mínimo encontrado de viabilidade celular, foi de 63,04% na maior concentração testada [80 μ M]. Houve alterações na morfologia celular seguindo o gradiente de concentração, com o aparecimento de grânulos no interior das células, até 40 μ M, a partir do qual, se manteve morfologia semelhante para as demais concentrações (Figura 11).

Figura 10. Valores da viabilidade celular da linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 μ M de selenito de sódio no período de 24h. As barras representam as médias \pm desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*) em relação ao controle negativo.

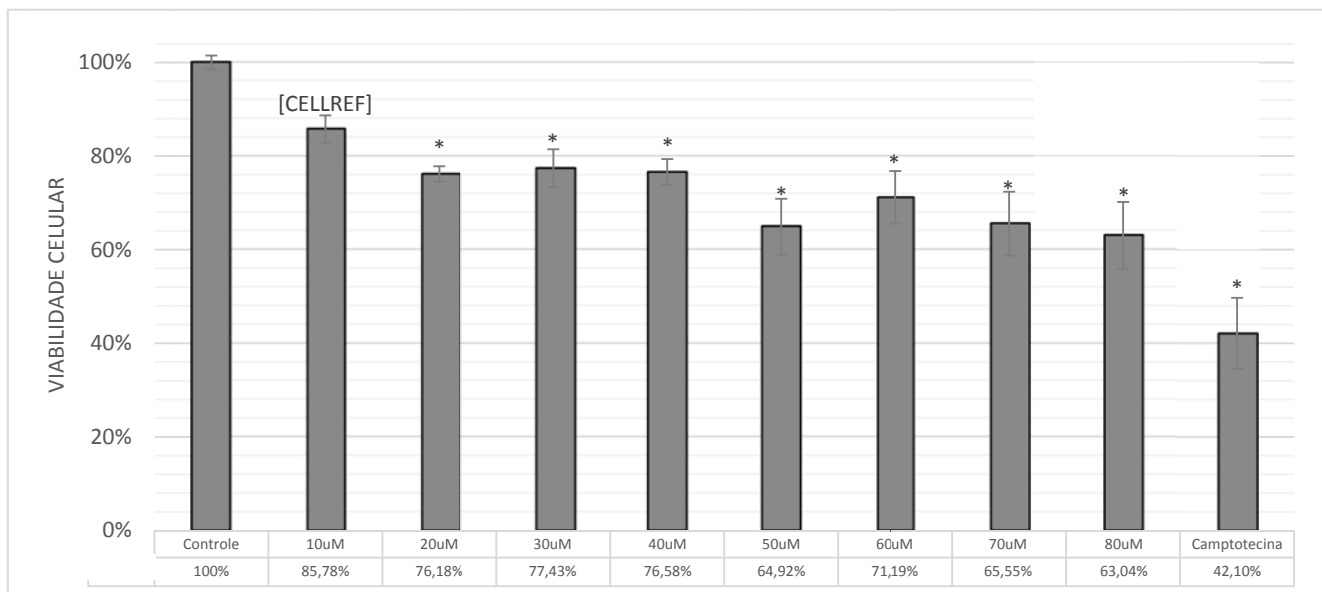
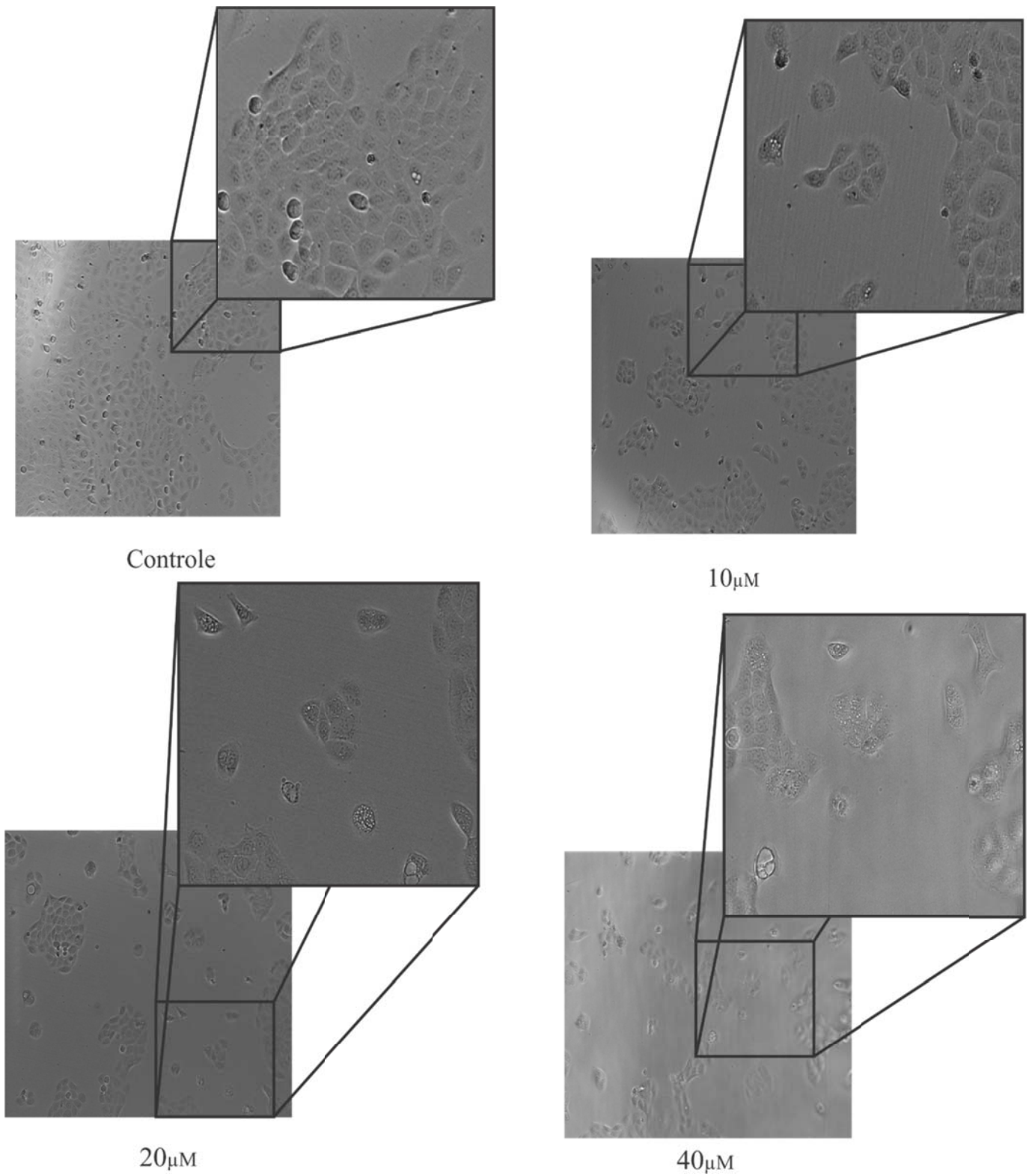


Figura 11: Imagens das células HaCat após 24h de tratamento com Selenito de sódio a 10, 20 e 40 μM . Microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) com aumento de 200X.



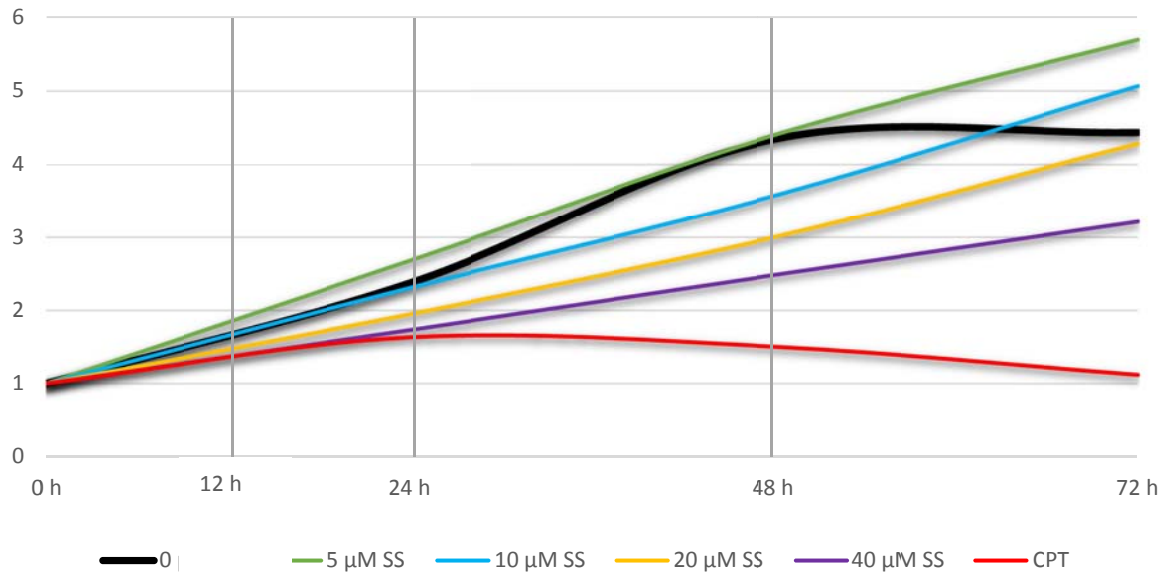
Índice celular em tempo real (RTCA)

Através da Análise Celular em Tempo Real (RTCA) pôde-se notar a interferência do tratamento com o selenito de sódio na curva de proliferação celular da HaCat. Com base nos resultados do MTT, decidiu-se utilizar quatro concentrações com fator 2x a partir de 5 μ M. Os tratamentos com 5, 10, 20 e 40 μ M de selenito de sódio resultaram na perturbação do padrão da curva de índice celular quando comparadas com o controle. A curva do controle negativo começa a entrar em platô por volta das 48h de análise (Figura 12). As duas maiores concentrações [20 e 40 μ M], nas primeiras horas (<12h) após o tratamento já apresentam uma redução do índice celular, sendo este valor inclusive menor do que o controle positivo (camptotecina 0,5 μ M) a partir do qual, apresentaram seguidos aumentos de índice celular.

Foi realizada uma análise das curvas nos pontos correspondentes à 12, 24 e 48h para estabelecer o momento em que as curvas apresentam diferenças estatísticas em comparação ao controle negativo. Em 12h de análise, os tratamentos não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Em 24h de análise, os tratamentos de 20, 40 μ M e o controle positivo apresentaram significância estatística, indicado pela redução do índice celular, enquanto o tratamento com 5 μ M foi significativamente maior que o controle negativo, indicado pelo aumento no índice celular. Em 48h de análise, os tratamentos de 10, 20 e 40 μ M de selenito de sódio, bem como o controle positivo apresentaram redução significativa do índice celular em relação ao controle negativo, enquanto o tratamento com 5 μ M não apresentou diferença significativa (Figura 12).

Após o término da análise de RTCA, foram fotografados os poços para fins comparativos com as curvas. Notou-se que as imagens coincidem com o índice celular apresentado na Figura 12 gerado pelo programa (Apêndice-Figura 14).

Figura 12. Curva de Proliferação Celular da linhagem HaCat, tratada com selenito de sódio nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 μ M e controle positivo tratado com camptotecina (CPT) a 0,5 μ M. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*) em relação ao controle negativo.

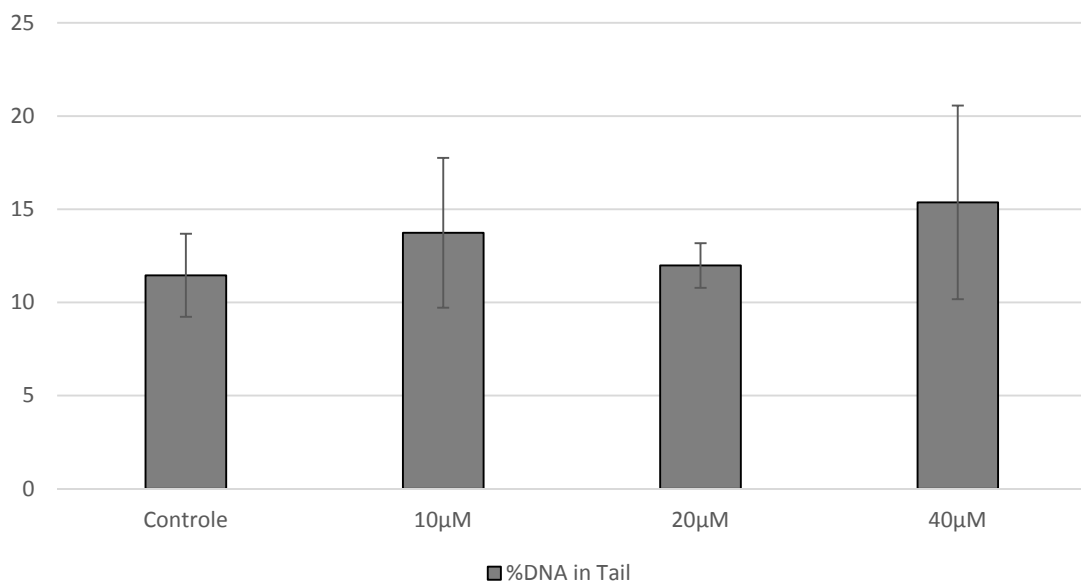


[] μ M SS		24h		48h	
0	0,6		$2,38 \pm 0,21$		$4,39 \pm 0,46$
5	0,7	-	$2,68 \pm 0,35$	*	$4,47 \pm 0,53$
10	$1,52 \pm 0,09$	-	$2,31 \pm 0,17$	-	$3,65 \pm 0,37$
20	$1,50 \pm 0,06$	-	$1,95 \pm 0,09$	*	$3,07 \pm 0,27$
40	$1,43 \pm 0,07$	-	$1,73 \pm 0,10$	*	$2,52 \pm 0,24$
CPT- 0,5 μ M	$1,47 \pm 0,04$	-	$1,63 \pm 0,09$	*	$1,47 \pm 0,08$

Ensaio do Cometa

A Figura 15 representa os dados obtidos através da análise do cometa (Apêndice-Figura 16) após os tratamentos com selenito de sódio nos parâmetros de *% DNA in tail* e *Tail Moment*, gerados pelo programa CometScore[®]. Observou-se que, em ambos parâmetros analisados, o tratamento nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, ou seja, não induziu quebra de fita do DNA quando comparado com o controle, indicando que o selenito de sódio não foi genotóxico nas concentrações testadas.

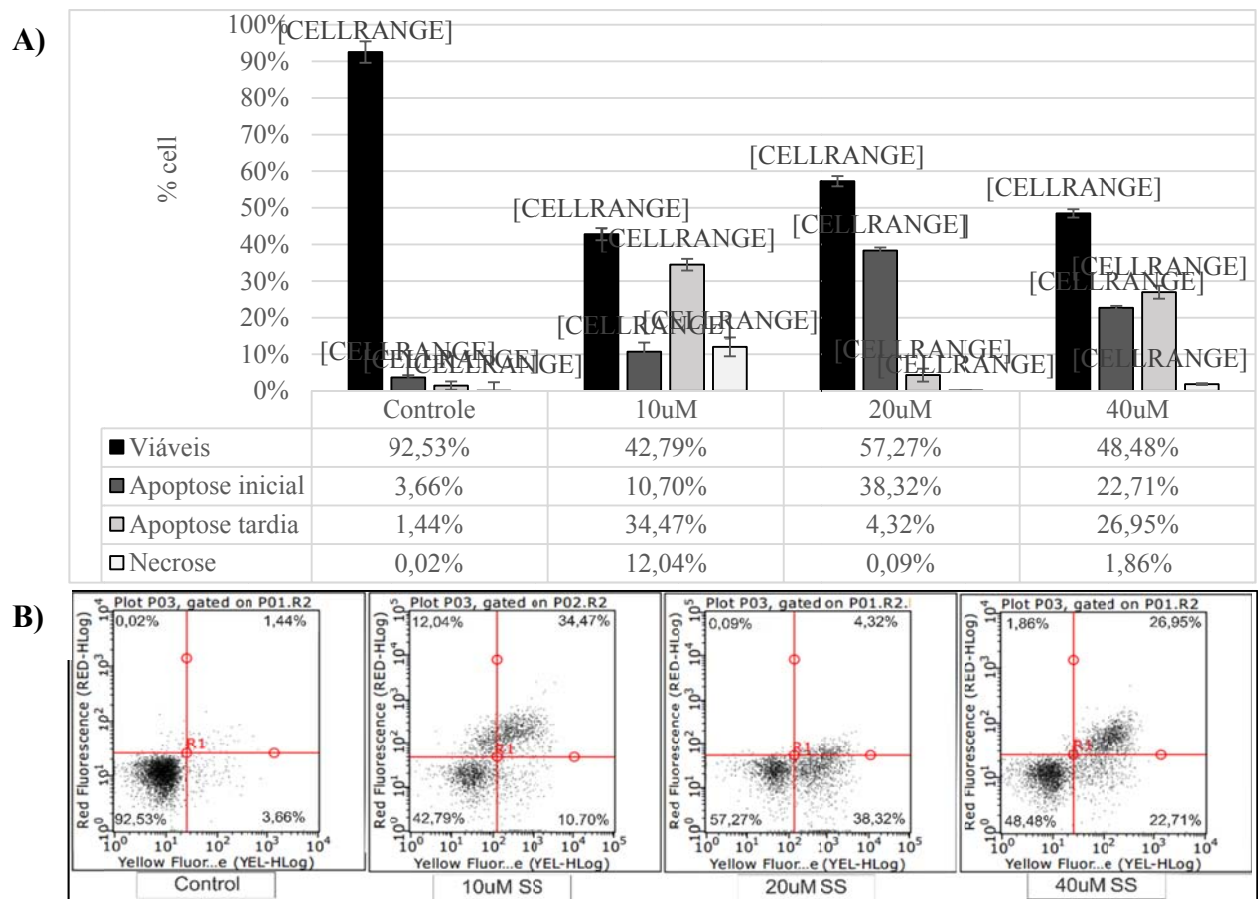
Figura 15. Média dos valores de *%DNA in tail* linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M de selenito de sódio no período de 3h. As barras representam o desvio. Não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.



Análise de apoptose por citometria de fluxo

Por meio da análise de apoptose por citometria de fluxo, foi possível observar que o selenito de sódio induziu a morte em todas as três concentrações citotóxicas analisadas [10, 20 e 40 μ M] quando comparadas com o controle, apresentando significativa redução de viabilidade. Dentre os tratamentos, a concentração de 10 μ M, apresentou o maior índice de células em apoptose tardia e necrose enquanto a concentração de 20 μ M apresentou o maior índice de células em apoptose inicial. Já o tratamento com 40 μ M apresentou valores semelhantes entre os índices de células em apoptose inicial e tardia. Esse resultado demonstra que o tratamento com selenito de sódio apresenta um padrão de morte celular variável conforme a concentração testada (Figura 17).

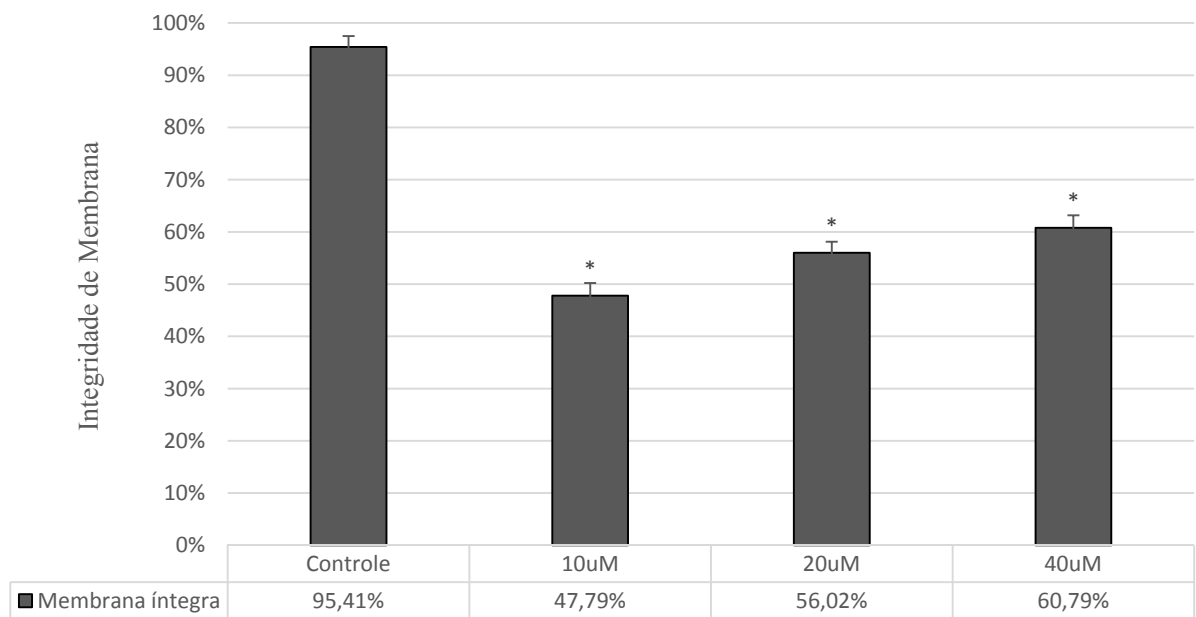
Figura 17. Valores da viabilidade celular da linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M de selenito de sódio no período de 24h através da citometria de fluxo. **A)** As barras representam as médias \pm desvio padrão. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*). **B)** gráficos em dotplot representativo dos tratamentos



Análise da integridade de membrana por citometria de fluxo

A análise da integridade de celular revelou que o selenito de sódio apresenta ser um eficiente indutor de dano de membrana nas três concentrações citotóxicas analisadas [10, 20 e 40 μ M] (Figura 18). A concentração de 10 μ M apresentou a maior porcentagem de células com a membrana não íntegra (52,13%), já a concentração de 40 μ M apresentou o menor índice de células com a membrana danificada entre os tratamentos (39,28%).

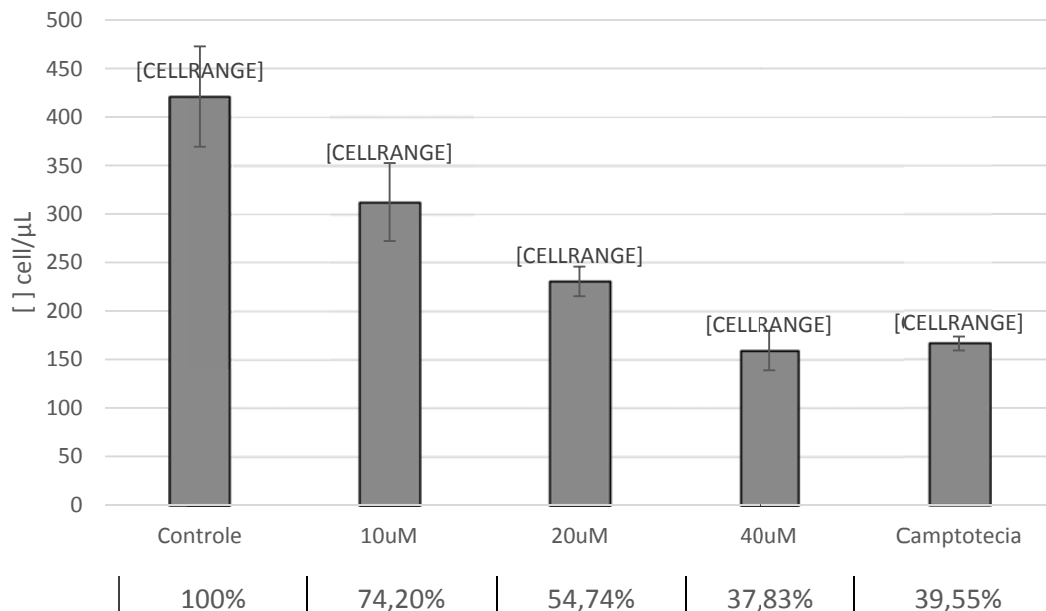
Figura 18. Valores da integridade da membrana celular da linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M de selenito de sódio no período de 24h. As barras representam as médias \pm desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*).



Concentração celular por citometria de fluxo

Através da análise da concentração celular, obtido pela citometria de fluxo, pode-se notar que, o tratamento com 10 μM de selenito de sódio apresentou uma redução de 25,8% de células quando comparada ao controle. As concentrações de 20 μM e 40 μM apresentaram redução de 45,26% e 62,17%, respectivamente. Essa última concentração mostrou uma redução levemente superior que a do controle camptotecina [1 μM], a qual, apresentou uma redução de 60,45% do número de células comparado ao controle (Figura 19). Pode-se observar ainda, que a concentração celular é inversamente proporcional à concentração do selenito de sódio testada, revelando uma resposta dose-dependente das células quando expostas a este composto.

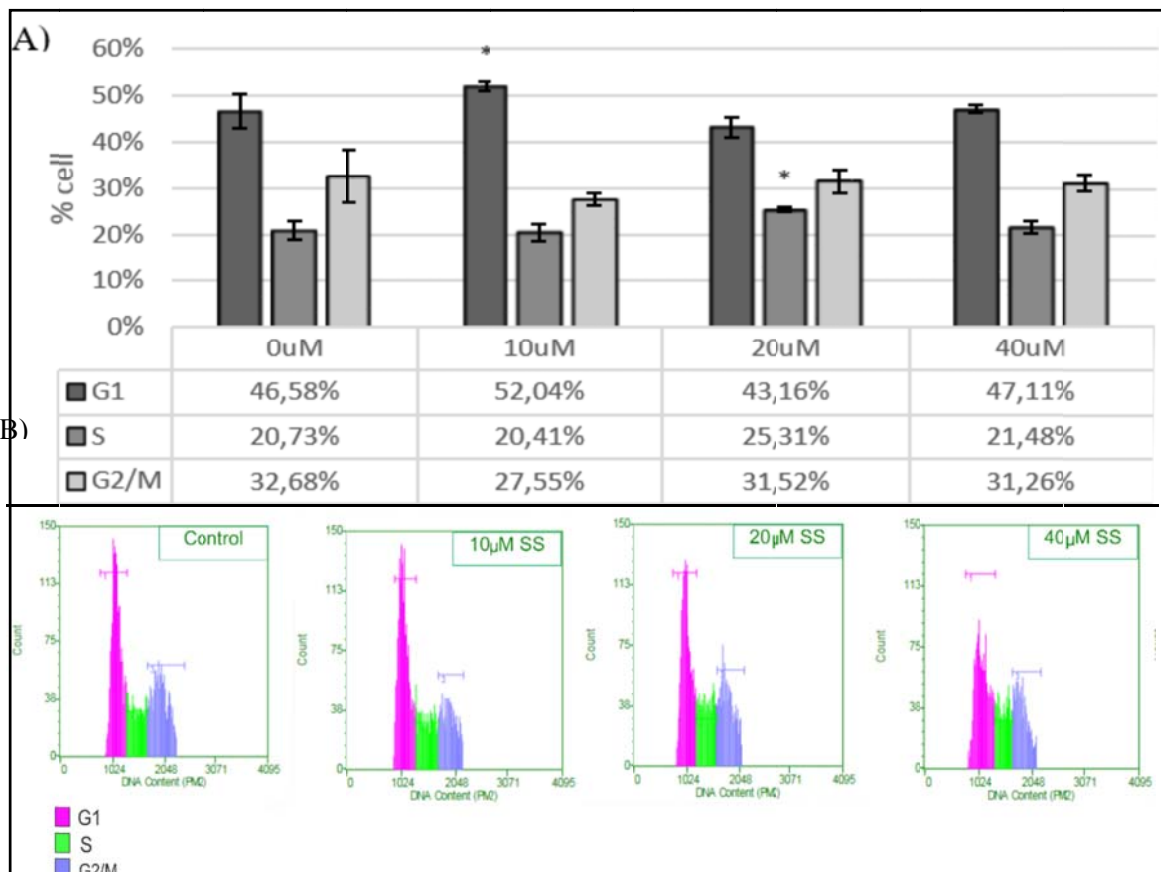
Figura 19. Valores médios da concentração celular da linhagem HaCat referente aos tratamentos de 10, 20 e 40 μM de selenito de sódio no período de 24h. As barras representam as médias \pm desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*).



Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

Através da análise do ciclo celular por meio da citometria de fluxo, pode-se notar que o tratamento com 10 μ M de selenito de sódio apresentou um padrão de interferência no ciclo celular similar ao controle positivo camptotecina [1 μ M] onde ambos tratamentos apresentaram aumento em G1, quando comparados com o controle negativo. Já o tratamento com 20 μ M de selenito de sódio, apresentou mais células em na fase S enquanto o tratamento com 40 μ M de selenito de sódio não apresentou diferença significativa em nenhuma das fases do ciclo celular analisadas (Figura 20).

Figura 20. Valores médios da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo da linhagem HaCat referente aos tratamentos de 10, 20 e 40 μ M de selenito de sódio no período de 24h. **A)** Barras das médias \pm desvio padrão. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*). **B)** Representação dos histogramas. Gráficos representativos de uma repetição cujo resultado foi similar aos demais.



Expressão Gênica

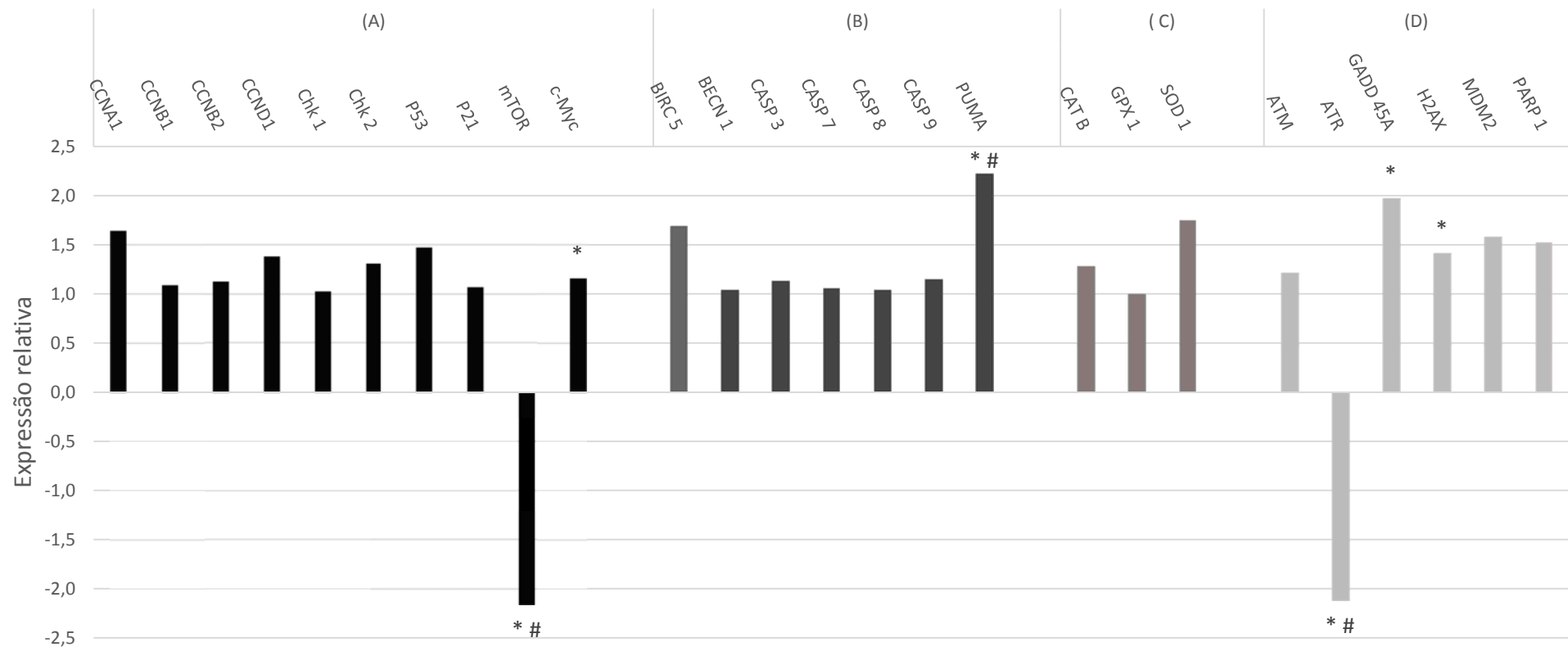
Para a análise da modulação da expressão gênica mediante o tratamento com selenito de sódio, foi realizado um teste da produção de mRNA nas células tratadas com as concentrações de 10 e 20 μM de selenito de sódio por 12h (Tabela 3). Entretanto, apenas no tratamento de 10 μM foi possível obter a quantidade de RNA total ($<150\text{ng}/\mu\text{L}$) suficiente para as análises após um período de tratamento de 12h, visto que concentração de 20 μM apresentou níveis de mRNA 2,6 vezes menor que o controle, sugerindo que o selenito de sódio é um potente inibidor de expressão gênica em concentrações acima de 10 μM em células HaCat. Desta forma, a concentração de 10 μM foi selecionada para as posteriores análises.

A Figura 21 mostra os valores obtidos dos 27 genes analisados, dos quais apenas três genes tiveram alterações significativas na expressão relativa. O gene mTor, diretamente relacionado ao ciclo celular, apresentou uma redução na expressão gênica de 2,162 vezes quando comparado as células sem tratamento e os genes PUMA e ATR, sinalizadores de morte celular e dano no DNA, respectivamente, apresentaram aumento na expressão de 2,227 e redução na expressão gênica de 2,119, na dada sequência. Não houve alteração significativa nos principais genes analisados envolvidos no estresse oxidativo em relação ao controle.

Tabela 3. Valores médios dos dados obtidos pela quantificação de RNA total por espectrofotometria

Tratamento	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Razão (260/230)	Razão (260/280)
Controle	200,57	1,39	2,07
10 μM	240,73	1,2	2,06
20 μM	76,82	0,76	2,07

Figura 21. Expressão relativa dos genes envolvidos em: **A)** ciclo celular (*CCNA 1*, *CCNB 1*, *CCNB 2*, *CCND 1*, *CHK 1*, *CHK 2*, *mTOR*, *p53* e *p21*, *c-MYC*); **B)** danos ao DNA (*ATM*, *ATR*, *GADD 45A*, *H2AX*, *MDM 2* e *PARP 1*); **C)** estresse oxidativo (*CAT B*, *GPX 1* e *SOD 1*); e **D)** morte celular (*CASP 3*, *CASP 7*, *CASP 8*, *CASP 9*, *BIRC 5*, *BECN 1* e *PUMA*) na linhagem HaCat tratadas 10 μ M de selenito de sódio em um período de 12h. O gene RPL-13A como gene constitutivo. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*) em relação ao constitutivo. Razão de corte ≥ 2 (#)



DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado a fundamental importância da compreensão dos mecanismos de ação dos micronutrientes no metabolismo celular, principalmente no que se refere ao seu uso terapêutico para a saúde humana. Trabalhos *in vitro*, com selenito de sódio, têm demonstrado tanto os seus efeitos protetores quanto antitumorais (STOICA; PENTECOST; MARTIN, 2000; ZHAO et al., 2009). Desta forma, tais trabalhos trazem este composto como um potencial agente contra o câncer, fatos que têm estimulado a sua utilização na suplementação alimentar

Nossos dados, obtidos pelo teste do MTT revelaram que, o selenito de sódio foi citotóxico nas células HaCaT mostrando perda de viabilidade celular em todas as concentrações analisadas, além de alterar o padrão morfológico, no qual as células apresentaram-se mais largas, achatadas e com a presença de granulações citoplasmáticas (Apêndice-Figuras 13 e 14). As alterações no padrão morfológico dessas células também é evidenciado pelo trabalho de Bandura et al. (2005) que, em seu estudo comparativo do efeito das formas inorgânicas do selênio em linhagem primária de queratinócitos e melanócitos, mostrou que o tratamento com selenito de sódio a 10 μ M, caracteriza essa modificação morfológica como padrão morfológico “ovo frito” sendo justificado pelo efeito modulador do selenito de sódio na polimerização dos filamentos de actina. Além disso, o selênio na forma de selenito também pode se ligar a α -tubulina e β -tubulina por meio de pontes dissulfeto, cuja formação induz uma grande alteração conformacional da proteína podendo haver inibição de 50% da formação de microtúbulos *in vitro* na concentração de 10 μ M (LEYNADIER et al., 1991). Da mesma forma, nossos dados por citometria de fluxo mostram que este composto foi indutor de dano na membrana e de morte celular, efeitos que contribuem para a redução na viabilidade celular.

Quando analisado se o selenito de sódio interferia no índice celular em tempo real, nos revela que o seu efeito sobre a célula mesmo depois de três dias de tratamento. Ao término das 72h de tratamento, a placa foi visualizada no microscópio, afim de observar a morfologia das células e pôde-se notar as alterações semelhantes com as obtidas na placa de MTT, sendo representadas na Figura 14 do apêndice. Abassi e colaboradores em 2009 descrevem o índice celular como sendo uma análise dependente de três parâmetros celulares: o número de células, morfologia e adesão. Foi observado no presente trabalho que o tratamento com selenito de sódio distinguiu a morfologia celular do controle (Figuras 13 e 14), sendo um fator que deve ser levado em consideração para a análise do índice celular, sendo assim, não sendo muito

apropriado a utilização do termo “ análise de proliferação celular” para os dados obtidos pelo RTCA.

Alterações na proliferação celular pode ser verificadas, também, pela citometria de fluxo no qual o selenito de sódio apresentou potencial em parada de ciclo em G1 na concentração de 10 μ M e parada na fase S na concentração de 20 μ M. Os genes relacionados a passagem de ciclo celular (*CCNA1*, *CCNB1*, *CCNB2*, *CCND1* e *CDKN1A*) bem como os de ponto de checagem (*P21*, *P53*, *CHEK1*, *CHEK2* e *c-MYC*) não foram modulados de forma diferente do controle. Desta forma, torna-se necessário mais estudos para compreender esse mecanismo que modula o ciclo celular em fases diferentes como o aumento da concentração do composto. Entretanto, esses efeitos podem estar correlacionados com inibição da expressão do gene mTor, visto que, tal gene, está diretamente relacionado com progressão do ciclo celular. A literatura nos revela a importância da inibição deste gene em células tumorais no tratamento contra o câncer, devido a sua ação direta no crescimento celular, proliferação, metabolismo e até mesmo angiogênese (BALDO et al., 2008; ZHOU; LUO; HUANG, 2010).

Nossos dados da análise de morte celular por citometria de fluxo, mostraram o potencial indutor de morte do selenito de sódio em todas as concentrações analisadas, corroborando com os diversos estudos em diferentes tipos celulares. Este fato, justifica a dificuldade de obtenção de mRNA nas concentrações de 20 e 40 μ M. Em câncer de próstata o selenito de sódio induz apoptose pela geração de superóxido mediada pela via mitocondrial (XIANG; ZHAO; ZHONG, 2009), assim como em carcinoma nasofaríngeo o selenito de sódio demonstrou indução de apoptose mediada pela mitocôndria através da via intrínseca das caspases (CUI et al., 2015) e em melanócitos (BANDURA et al., 2005). Porém, em nossas análises de expressão dos genes relacionados ao estresse oxidativo (*CAT B*, *GPX 1* e *SOD 1*) mostraram que o selenito não tem potencial modulador destas vias nas células HaCaT.

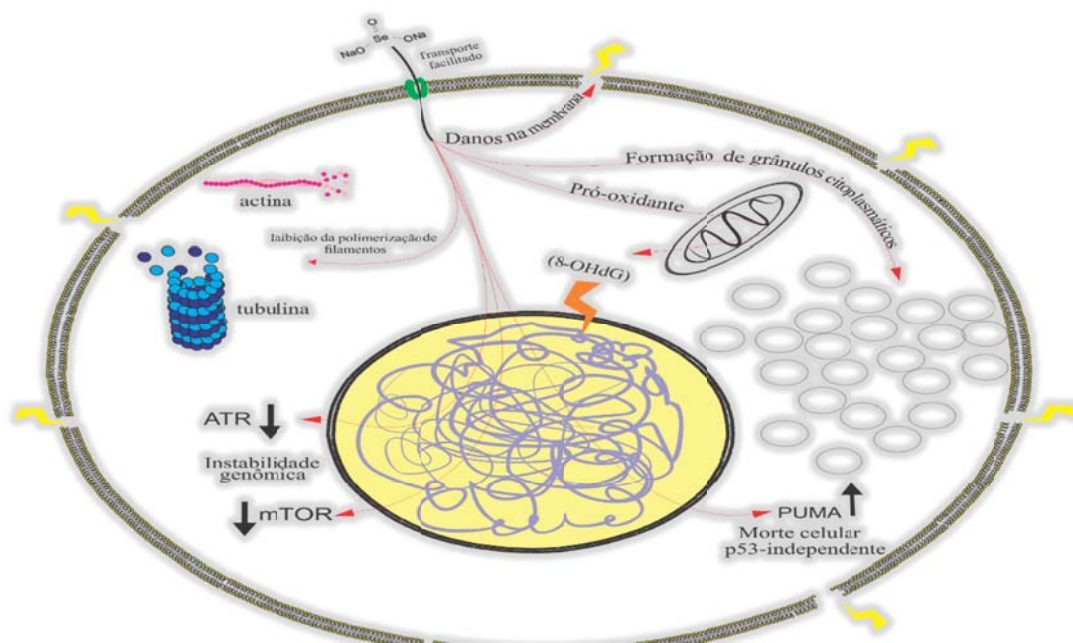
A análise da expressão gênica dos principais genes envolvidos na ativação da morte celular por apoptose e autofagia, revelou o selenito de sódio como modulador da expressão do gene *PUMA*, indicando que este composto pode estar ativando uma via alternativa de morte celular não precisando alterar a expressão do genes das caspases. Yu e Zhang, 2008 em seus estudos, apontam o *PUMA* com um importante indutor de apoptose com ou sem a indução pela p53 podendo ser induzido por vários inibidores de quinases. Efeito observado pelo tratamento com estauroporina, que é um inibidor de pan-quinases ativando apoptose *PUMA*-dependente.

Não foi observado dano no material genético induzido pelo tratamento nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M através do ensaio do cometa, porém nossos dados de

expressão gênica, revelaram a inibição do gene *ATR*, podendo ser um indicativo de que o selenito de sódio possa estimular a instabilidade genômica em células não-tumorais, visto que a expressão de tal gene é fundamental para o funcionamento das principais vias de reparo da célula.

Nossos dados mostram que este composto, nas concentrações analisadas [10-40 μ M], não apresentou perfil genotóxico. Tal resposta corrobora com estudos que avaliaram o selenito de sódio em concentrações variadas de 0,1 -10 μ M e demonstram o efeito protetor antígeno-tóxico deste composto em células sanguíneas (CEMELI et al., 2003; GEYIKOGLU; TÜRKEZ, 2006). Entretanto, Shen; Song e Pence (2001) demonstram a capacidade do selenito de sódio como agente genotóxico em células de linhagem primária de queratinócitos humanos em altas doses [126,6 μ M] provenientes de suplementação, genotoxicidade ocasionada pela saturação intracelular de selenito, ter efeito pró-oxidante resultante de sua metabolização, que induz a formação de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) um potente aduto de DNA.

Figura 26. Esquema representativo da ação do selenito de sódio em células HaCat. A literatura indica que entrada do composto é dada por transporte facilitado (GANYC; SELF, 2008), e ao entrar na célula ele pode: interferir na polimerização dos filamentos de tubulina (LEYNADIER et al., 1991), e de actina (BANDURA et al., 2005), em altas concentrações pode ter ação pró-oxidante induzindo a formação de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) (SHEN; SONG; PENCE, 2001). Nossos dados mostraram que, o selenito de sódio, atua induzindo danos na membrana plasmática, estimula a formação de grânulos citoplasmáticos, incita a instabilidade genômica suprimindo a expressão dos genes envolvidos no ciclo celular (*mTOR*) e dano no DNA (*ATR*), e potencializa a expressão do gene *PUMA*, sendo um indicativo de provocar morte celular p53-independente.



Desta forma, o presente estudo demonstrou, que o selenito de sódio apresentou um efeito tóxico, modulando a expressão de genes envolvidos no ciclo celular (*mTOR*), dano no DNA (*ATR*) e morte celular (*PUMA*), bem como alterou a morfologia celular e induziu parada de ciclo nas células não-tumorais HaCaT em concentrações que são semelhantes a testes em linhagens tumorais, sendo indicativo de possíveis efeitos colaterais indesejáveis, se usado como alternativa agente terapêutico em concentrações a partir de 10 μ M (Figura 26).

CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo demonstrou que a exposição da linhagem de células não tumorais – HaCat ao selenito de sódio altera o padrão morfológico, estimulando a formação de granulações citoplasmáticas, porém não apresentou efeito genotóxico. Bem como, apresentou ser indutor de dano na membrana, morte e de parada de ciclo celular, alterando também a expressão de genes pró-apoptóticos bem como de gene envolvido na progressão do ciclo celular.

O potencial citotóxico do selenito de sódio, é possivelmente causado pela repressão do gene *mTOR*, o que poderia estar impedindo a progressão do ciclo celular que, em conjunto ao aumento dos níveis de RNAm do gene *PUMA*, pode ser um indicativo de indução de apoptose p53-independente.

Os dados de cinética celular em tempo real revelam que o selenito de sódio interfere no índice celular de queratinócitos por, pelo menos, 72h. Os diferentes efeitos do selenito de sódio na morfologia, viabilidade e crescimento em diferentes concentrações em linhagens celulares não tumorais, indicam a necessidade de maiores estudos, para melhor compreender os efeitos intracelulares do tratamento e assim apresentar a melhor alternativa para o uso do selenito de sódio como agente terapêutico sem efeitos colaterais indesejáveis.

REFERÊNCIAS

- ABASSI, Y. A. et al. Kinetic Cell-Based Morphological Screening: Prediction of Mechanism of Compound Action and Off-Target Effects. **Chemistry and Biology**, v. 16, n. 7, p. 712–723, 2009a.
- ABASSI, Y. A. et al. Kinetic Cell-Based Morphological Screening: Prediction of Mechanism of Compound Action and Off-Target Effects. **Chemistry and Biology**, v. 16, n. 7, p. 712–723, 2009b.
- ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400–414, 14 jun. 2009.
- ABDO, K. M. Sodium Selenate and Sodium Selenite. **National Toxicology Report on Toxicity Studies**, v. Toxicity R, n. 38, p. 127, 1994.
- ABREU, C. L. D. C. Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3t3. **Annals of Physics**, v. 54, p. 104, 2008.
- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 8551, n. January, p. 1–14, 2016.
- AL-BADER, A. et al. Selenium and liver cirrhosis. **Molecular and Cellular Biochemistry** **185**:, p. 1–6, 1998.
- AMARAL, J. B. DO; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, v. 34, n. January, p. 1–20, 2011.
- ARRIGONI, C. et al. In Vitro Co-Culture Models of Breast Cancer Metastatic Progression towards Bone. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1405, 2016.
- ARYA, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Rev. Mol. Diagn**, v. 5, n. 2, p. 209–219, 2005.
- BALDO, P. et al. mTOR pathway and mTOR inhibitors as agents for cancer therapy. **Current cancer drug targets**, v. 8, n. 8, p. 647–65, 2008.
- BANDURA, L. et al. Differential effects of selenite and selenate on human melanocytes, keratinocytes, and melanoma cells. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 83, n. 2, p. 196–211, 2005.
- BARRETO, G. et al. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. **Nature**, v. 445, n. February, p. 671–675, 2007.
- BARTEK, J.; LUKAS, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell**, v. 3, n. 5, p. 421–429, 2003.
- BAUM, M. K. et al. Effect of Micronutrient Supplementation on Disease Progression in Asymptomatic, Antiretroviral-Naive, HIV-Infected Adults in Botswana A Randomized Clinical Trial. **Original Investigation Research**, v. 310, n. 20, p. 2154–2163, 2013.
- BENDICH, A. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. **National Academy Press**, v. 9007, n. 0, p. 9007, 2000.

- BHOGAL, N.; BALLS, M. Translation of new technologies: from basic research to drug discovery and development. **Current drug discovery technologies**, v. 5, n. 3, p. 250–62, 2008.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, v. 5, n. January, p. 9–19, 2012.
- BOUKAMP, P. et al. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell-Line. **Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 3, p. 761–771, 1988.
- BOYD, R. Selenium stories. **Nature Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 570–570, 2011.
- BOYLE, P.; LEWIN, B. World Cancer Report 2008. **International agency for research on Cancer**, 2008.
- BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.
- BRAZIL(ANVISA). Guia Para a Condução De Toxicologia E Segurança. p. 1–48, 2013.
- CARERE, A.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. In vitro toxicology methods: Impact on regulation from technical and scientific advancements. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1–3, p. 153–160, 2002.
- CARLO M. CROCE. Oncogenes and cancer. **new england journal o f medicine**, v. 11, p. 358;5, 2008.
- CARROLA, J. et al. Insights into the impact of silver nanoparticles on human keratinocytes metabolism through NMR metabolomics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 589, p. 53–61, 2016.
- CASIMIRO, M. C. et al. Cyclins and cell cycle control in cancer and disease. **Genes & cancer**, v. 3, n. 11–12, p. 649–57, 2012.
- CASTANEDA, F. et al. Role of undecan-2-one on ethanol-induced apoptosis in HepG2 cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 23, n. 6, p. 477–485, 2007.
- CEMELI, E. et al. Antigenotoxic Properties of Selenium Compounds on Potassium Dichromate and Hydrogen Peroxide. **Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement Teratogenesis Carcinog. Mutagen. Suppl**, v. 2, n. 2, p. 53–6753, 2003.
- CHEN, X. et al. **Survivin and tumorigenesis: Molecular mechanisms and therapeutic strategies** **Journal of Cancer**, 2016.
- CLAASSEN, G. F.; HANN, S. R. A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 17, p. 9498–503, 2000.
- COMINETTI, C.; COZZOLINO, S. M. F. Selênio. In: COMINETTI, C.; COZZOLINO, S. M. F. (Eds.). . **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes-Selênio**. [s.l.] ILSI Brasil, 2009. v. 8.
- COMMISSION, E. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Selenium. n. October, 2000.
- CUI, Z. et al. Sodium selenite (Na₂SeO₃) induces apoptosis through the mitochondrial

pathway in CNE-2 nasopharyngeal carcinoma cells. **International Journal of Oncology**, p. 2506–2514, 2015.

DESAULNIERS, D. et al. Causes of genome instability: The effect of low dose chemical exposures in modern society. **Carcinogenesis**, v. 36, p. S61–S88, 2015.

ERRANTE, P. R. et al. Flow cytometry : a literature review. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 14, p. 211–224, 2015.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Revista Brasileira De Cancerologia**, v. 52, n. 2, p. 165–171, 2006.

FINK, S. L. et al. Eukaryotic Cells MINIREVIEW Apoptosis , Pyroptosis , and Necrosis : Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907–1916, 2005.

FINLEY, J. W. Selenium accumulation in plant foods. **Nutrition reviews**, v. 63, n. June, p. 196–202, 2005.

FITZGERALD, K. A. et al. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 215, p. 39–54, 2015.

FRANCESCONI, K. A.; PANNIER, F. Selenium metabolites in urine: A critical overview of past work and current status. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 2240–2253, 2004.

FUCHS-TARLOVSKY, V. Role of antioxidants in cancer therapy. **Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 16, n. 6, p. 329–344, 2015.

GANYC, D.; SELF, W. T. High affinity selenium uptake in a keratinocyte model. **FEBS Letters**, v. 582, n. 2, p. 299–304, 2008.

GEYIKOGLU, F.; TÜRKEZ, H. Protective Effect of Sodium Selenite against the Genotoxicity of Aflatoxin B 1 in Human Whole Blood Cultures. v. 49, n. May, p. 393–398, 2006.

GIBBS, S. In vitro irritation models and immune reactions. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, n. 2, p. 103–113, 2009.

GLEI, M.; SCHNEIDER, T.; SCHLÖRMANN, W. Comet assay : an essential tool in toxicological research. **Archives of Toxicology**, 2016.

GOLIAS, C. H.; CHARALABOPOULOS, A.; CHARALABOPOULOS, K. Cell proliferation and cell cycle control : a mini review. **International Journal of Clinical Practice**, v. 58, n. 12, p. 1134–1141, 2004.

GOYAL, M. M.; BASAK, A. Human catalase: Looking for complete identity. **Protein and Cell**, v. 1, n. 10, p. 888–897, 2010.

GREGORI-PUIGJANÉ, E. et al. Identifying mechanism-of-action targets for drugs and probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 28, p. 11178–83, 2012.

GUO, C. H. et al. Effects of Selenium Yeast on Oxidative Stress, Growth Inhibition, and

- Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. **Int J Med Sci**, v. 12, n. 9, p. 748–758, 2015.
- HARTIKAINEN, H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, n. 4, p. 309–318, 2005.
- HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, v. 90, n. 2–3, p. 183–188, 1997.
- HAWKES, W. C.; TUREK, P. J. Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. **Journal of andrology**, v. 22, n. 5, p. 764–72, 2001.
- HODGSON, S. Mechanisms of inherited cancer susceptibility. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 9, n. 1, p. 1–4, 2008.
- HOLBOURN, K. P.; ACHARYA, K. R.; PERBAL, B. The CCN family of proteins: structure-function relationships. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 33, n. 10, p. 461–473, 2008.
- HOUTGRAAF, J. H.; VERSMISSEN, J.; VAN DER GIESSEN, W. J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, v. 7, n. 3, p. 165–172, 2006.
- HUAWEI, Z. Selenium as an essential micronutrient: Roles in cell cycle and apoptosis. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1263–1278, 2009.
- IPCS. **INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc58.htm#SectionNumber:2.1>>. Acesso em: 4 out. 2016.
- IWAKUMA, T.; LOZANO, G. MDM2 , An Introduction. v. 1, n. December, p. 993–1000, 2003.
- JAISWAL, P. K.; GOEL, A.; MITTAL, R. D. Survivin: A molecular biomarker in cancer. **Indian Journal of Medical Research**, v. 141, n. April, p. 389–397, 2015.
- KANG, R. et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 4, p. 571–80, 2011.
- KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–323, 2004.
- KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. [s.l.: s.n.].
- KLÖPPEL, C. et al. In yeast redistribution of Sod1 to the mitochondrial intermembrane space provides protection against respiration derived oxidative stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 403, n. 1, p. 114–119, 2010.
- KODYDKOVÁ, J. et al. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of Its activity in different diseases. **Folia Biologica (Czech Republic)**, v. 60, n. 4, p. 153–167, 2014.
- KROEMER, G. et al. Classification of Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization

in Cell Death. **Physiology Review**, p. 99–163, 2007.

LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. **Physiological reviews**, v. 94, n. 3, p. 739–77, 2014.

LAKIN, N. D.; JACKSON, S. P. Regulation of p53 in response to DNA damage. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7644–7655, 1999.

LAKSHMI, B. V. S.; SUDHAKAR, M.; PRAKASH, K. S. Protective Effect of Selenium Against Aluminum Chloride-Induced Alzheimer's Disease: Behavioral and Biochemical Alterations in Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 165, n. 1, p. 67–74, 2015.

LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 8, n. 7, p. 547–566, 2009.

LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 10, p. 1–18, 2010.

LEI, X. G.; CHENG, W.-H.; MCCLUNG, J. P. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. **Annual review of nutrition**, v. 27, p. 41–61, 2007.

LEYNADIER, D. et al. Selenium: Inhibition of microtubule formation and interaction with tubulin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 79, n. 1, p. 91–102, 1991.

LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6194–206, 2008.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079–93, 2013.

LIU, W. et al. DISTRIBUTION OF CuZn SUPEROXIDE DISMUTASE IN RAT LIVER. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 201–207, out. 1993.

LIU, J.; ROZOVSKY, S. Membrane-Bound Selenoproteins. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 10, p. 795–813, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOSCALZO, J. Keshan Disease, Selenium Deficiency, and the Selenoproteome. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 18, p. 1756–1760, 2014.

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 7, p. 1957–97, 2011.

MACFARQUHAR, M. J. K. et al. Acute Selenium Toxicity Associated With a Dietary Supplement. **Archive of Internal Medicine**, v. 170, n. 3, p. 256–261, 2010.

MARÉCHAL, A.; ZOU, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 9, p. 1–18, 2013.

MATTHAIOS, D. et al. H2AX a promising biomarker for lung cancer: a review. **Cancer investigation**, v. 31, n. 9, p. 582–99, 2013.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase Functions in Cell Death and Disease: Figure 1. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 4, p. a026716, 2015.

- MEHDI, Y. et al. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3292–3311, 2013.
- MELOROSE, J.; PERROY, R.; CAREAS, S. Study Guide - Biotechnology and Cell Culture. In: **Study Guide - Biotechnology and Cell Culture**. [s.l.] Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015, 2015. v. 1p. 2604.
- MIGITA, N. A. “Cultivo celular in vitro : importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares”. **Monografia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP**, 2012.
- MILANI, P. et al. SOD1 transcriptional and posttranscriptional regulation and its potential implications in ALS. **Neurology Research International**, v. 2011, n. Figure 1, 2011.
- MORALES, J. C. et al. Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.**, v. 24, n. 1, p. 15–28, 2014.
- MOXON, A. L. Alkali disease or selenium poisoning. p. 91, 1937.
- MUTH, O. H. et al. Effects of Selenium and Vitamin E on White Muscle Disease. **Science**, v. 128, p. 576, 1958.
- NAKANO, K. et al. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. **Molecular cell**, v. 7, n. 3, p. 683–94, 2001.
- NATSCH, A.; EMTER, R. Reporter cell lines for skin sensitization testing. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 10, p. 1645–1668, 2015.
- NCBI. **CAT**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/847>>. Acesso em: 2 fev. 2017a.
- NCBI. **GPX1**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2876>>. Acesso em: 2 fev. 2017b.
- NCBI. **SOD1**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6647>>. Acesso em: 2 fev. 2017c.
- NCBI. **CHEK1**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1111>>. Acesso em: 6 fev. 2017d.
- NCBI. **CHEK2**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11200>>. Acesso em: 6 fev. 2017e.
- NCBI. **mTOR**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2475>>. Acesso em: 6 fev. 2017f.
- NCBI. **tp53**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>>.
- NCBI. **CDKN1A**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1026>>. Acesso em: 7 fev. 2007h.
- NCBI. **MYC**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=26292>>. Acesso em: 7 fev. 2017i.
- NCBI. **ATM**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/472>>. Acesso em: 7 fev. 2017j.

NCBI. **ATR**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/545>>. Acesso em: 7 fev. 2017k.

NCBI. **GADD45A**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1647>>. Acesso em: 7 fev. 2017l.

NCBI. **H2AFX**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3014>>. Acesso em: 7 fev. 2017m.

NCBI. **MDM2**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4193>>. Acesso em: 7 fev. 2017n.

NCBI. **PARP1**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/142>>. Acesso em: 7 fev. 2017o.

NCBI. **BIRC5**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/332>>. Acesso em: 7 fev. 2017p.

NCBI. **BECN1**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8678>>. Acesso em: 7 fev. 2017q.

NELSON, A. A.; FITZHUGH, O. G.; CALVERY, H. O. Liver Tumors Following Cirrhosis Caused by Selenium in Rats. **Cancer Research**, v. 3, n. 4, p. 230–236, 1943.

NIIDA, H.; NAKANISHI, M. DNA damage checkpoints in mammals. **Mutagenesis**, v. 21, n. 1, p. 3–9, 2006.

O'NEIL, M. J. (ED. .); SMITH, A. (ED. .); HECKELMAN, P. E. (ED. . Sodium Selenite. In: **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 11. ed. [s.l: s.n.]. p. 1368.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. Cu,Zn-SOD in mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38388–38393, 2001.

OLM, E. et al. Extracellular thiol-assisted selenium uptake dependent on the x(c)- cystine transporter explains the cancer-specific cytotoxicity of selenite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 27, p. 11400–11405, 2009.

PAPP, L. V; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. K. Selenium and selenoproteins in health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 7, p. 793–795, 2010.

PATTERSON, E. L.; MILSTREY, R.; STOKSTAD, E. L. R. Effect of Selenium in Preventing Exudative Diathesis in Chicks. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 95, 1957.

REDDI, A. S.; BOLLINENI, J. S. Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF-beta1 in normal and diabetic rats. **Kidney international**, v. 59, n. 4, p. 1342–53, 2001.

REEVES, M. A.; HOFFMANN, P. R. The human selenoproteome: Recent insights into functions and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 15, p. 2457–2478, 2009.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1º ed. Canoas/RS: editora da ULBRA, 2003.

- RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 11, p. 897–907, 2004.
- RISHER, J. et al. Toxicological Profile for Selenium. **ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, n. September, p. 1–457, 2003.
- ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.
- RONCO, C. et al. ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells. **Med. Chem. Commun.**, 2016.
- ROULEAU, M. et al. PARP inhibition: PARP1 and beyond. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 4, p. 293–301, 2010.
- SANCAR, A. et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu.Rev.Biochem.**, v. 73, n. 0066–4154 (Print) LA–eng PT–Journal Article PT–Review RN–0 (Cross–Linking Reagents) RN–9007–49–2 (DNA) SB–IM, p. 39–85, 2004.
- SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal of the American Chemical Society**, v. v79, p. 3292–3293, 1957.
- SHEN, C.; SONG, W.; PENCE, B. C. Interactions of Selenium Compounds with Other Antioxidants in DNA Damage and Apoptosis in Human Normal Keratinocytes 1. v. 10, n. April, p. 385–390, 2001.
- SHILOH, Y. ATM and ATR: Networking cellular responses to DNA damage. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 11, n. 1, p. 71–77, 2001.
- SIGMA-ALDRICH. Sodium selenite Product. **Product Information**, v. 173, n. C, p. 6628, 2003.
- SINHA, S.; LEVINE, B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. **Oncogene**, v. 27 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S137–48, 2008.
- STAHL, P. L. et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. **Science**, v. 353, n. 6294, p. 78–82, 1 jul. 2016.
- STOICA, A; PENTECOST, E.; MARTIN, M. B. Effects of selenite on estrogen receptor-alpha expression and activity in MCF-7 breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 141, n. 10, p. 3595–3602, 2000.
- STRANO, S. et al. Mutant p53: an oncogenic transcription factor. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2212–2219, 2007.
- SUN, W.; YANG, J. Functional mechanisms for human tumor suppressors. **Journal of Cancer**, v. 1, n. 1, p. 136–140, 2010.
- SUZUKI, K. T. Metabolomics of Selenium: Se Metabolites Based on Speciation Studies. **Journal of Health Science**, v. 51, n. 2, p. 107–114, 2005.
- TAMURA, R. E. et al. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. **Current molecular medicine**, v. 12, n. 5, p. 634–51, 2012.
- TSCHARNER, C. V. O. N.; JENSEN, P. J. Review article Keratinocyte biology and

pathology. **Veterinary Dermatology**, v. 8, n. 2, p. 67–100, 1997.

TURINETTO, V.; GIACHINO, C. Survey and summary multiple facets of histone variant H2AX: A DNA double-strand-break marker with several biological functions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 5, p. 2489–2498, 2015.

URUSHITANI, M. et al. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 108–118, 2006.

VINCETI, M. et al. Friend or Foe? The Current Epidemiologic Evidence on Selenium and Human Cancer Risk. **Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 305–341, 2013.

VOUSDEN, K. H.; RYAN, K. M. P53 and Metabolism. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 10, p. 691–700, 2009.

VYSSOKIKH, M. Y.; BRDICZKA, D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 2, p. 389–404, 2003.

WADE, M.; LI, Y.-C.; WAHL, G. M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews: Cancer**, v. 13, n. 2, p. 83–96, 2013.

WASTNEY, M. E. et al. A human model of selenium that integrates metabolism from selenite and selenomethionine. **The Journal of nutrition**, v. 141, n. C, p. 708–717, 2011.

WIRAWAN, E. et al. Beclin1: A role in membrane dynamics and beyond. **Autophagy**, v. 8, n. 1, p. 6–17, 2012.

XIANG, N.; ZHAO, R.; ZHONG, W. Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 351–362, 2009.

YANG, Y. et al. The anticancer effects of sodium selenite and selenomethionine on human colorectal carcinoma cell lines in nude mice. **Oncol Res**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2009.

YEGER, H.; PERBAL, B. The ccn family of genes: A perspective on ccn biology and therapeutic potential. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 1, n. 3–4, p. 159–164, 2007.

YOON, S. O.; KIM, M. M.; CHUNG, A. S. Inhibitory Effect of Selenite on Invasion of HT1080 Tumor Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 20085–20092, 2001.

YU, J.; ZHANG, L. PUMA, a potent killer with or without p53. **Oncogene**, v. 27 Suppl 1, p. S71–83, 2008.

YUAN, J.; ADAMSKI, R.; CHEN, J. Focus on histone variant H2AX: To be or not to be. **FEBS Letters**, v. 584, n. 17, p. 3717–3724, 2010.

ZEIGER, E. History and rationale of genetic toxicity testing: An impersonal, and sometimes personal, view. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, n. 5, p. 363–371, 2004.

ZHAO, R. et al. Effects of selenite and genistein on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. **Nutrition and cancer**, v. 61, n. 3, p. 397–407, 2009.

ZHOU, H.; LUO, Y.; HUANG, S. Updates of mTOR inhibitors. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 10, n. 7, p. 571–81, 2010.

ZHU, M.; GONG, Y.; FRENKEL, G. D. Studies on the mechanism of the selenite-induced decrease in cell attachment: effect of selenite on the levels of fibronectin receptor (alpha5beta1 integrin) mRNAs. **Biol Trace Elem Res**, v. 62, n. 3, p. 123–134, 1998.

6. APÊNDICE

Figura 4: Esquema da condição de cultura das linhagens celulares

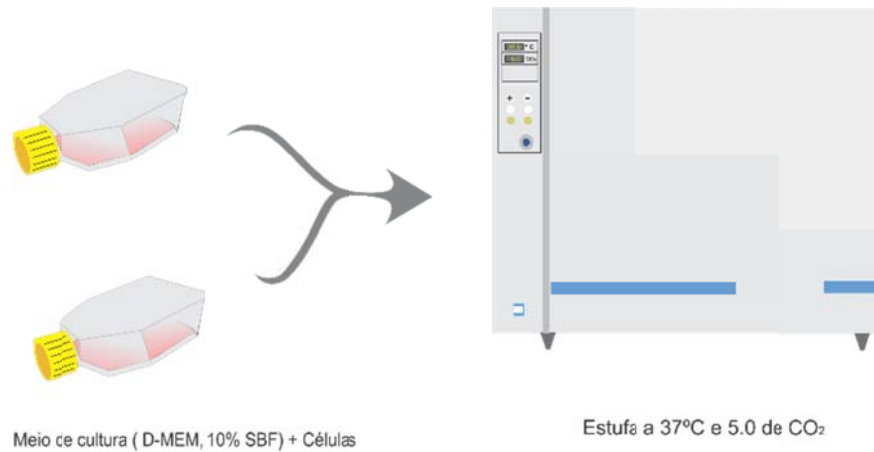


Figura 5: Esquema da metodologia realizada no ensaio de citotoxicidade-MTT.

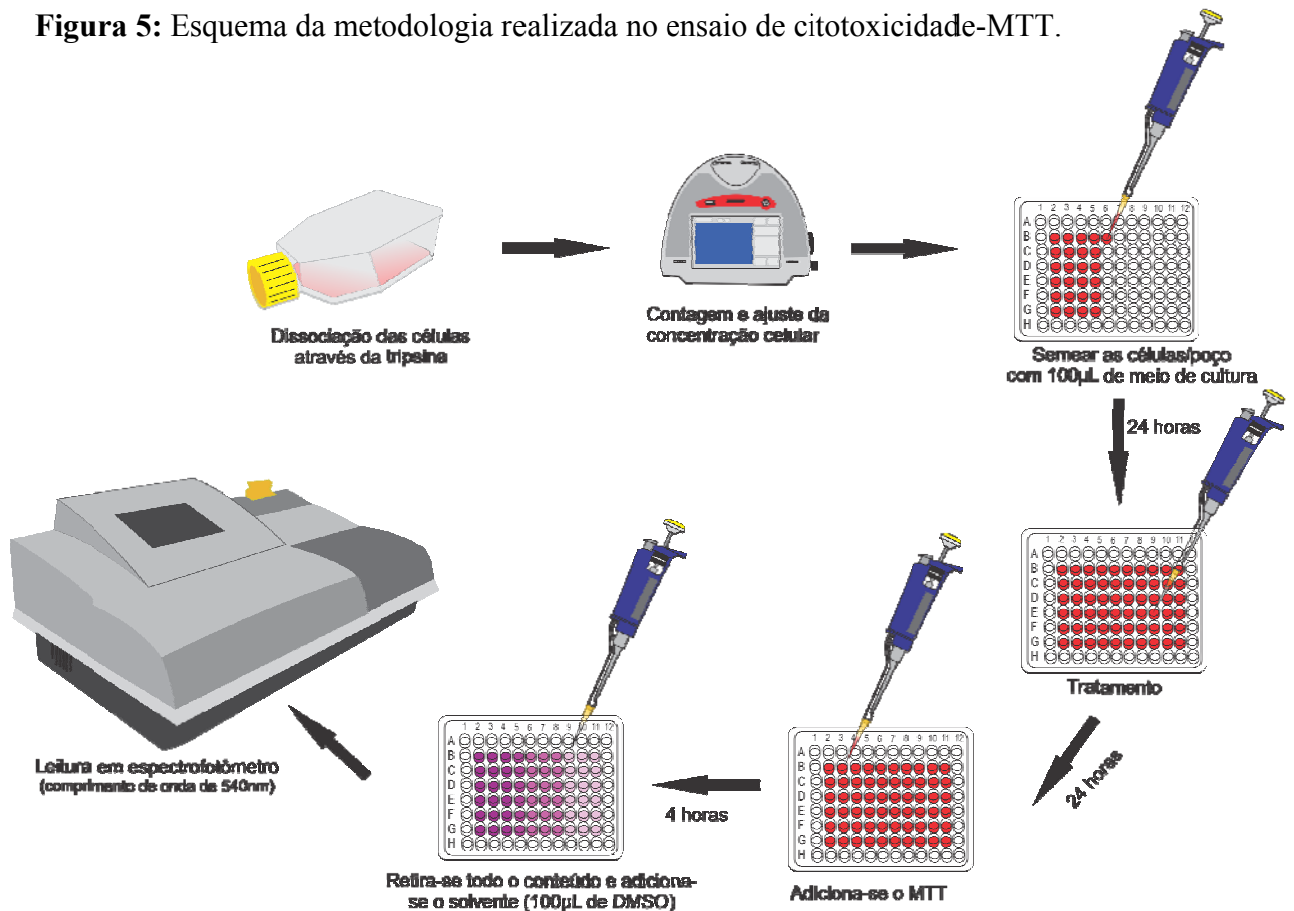


Figura 6: Esquema da metodologia realizada no ensaio de cinética de proliferação celular.

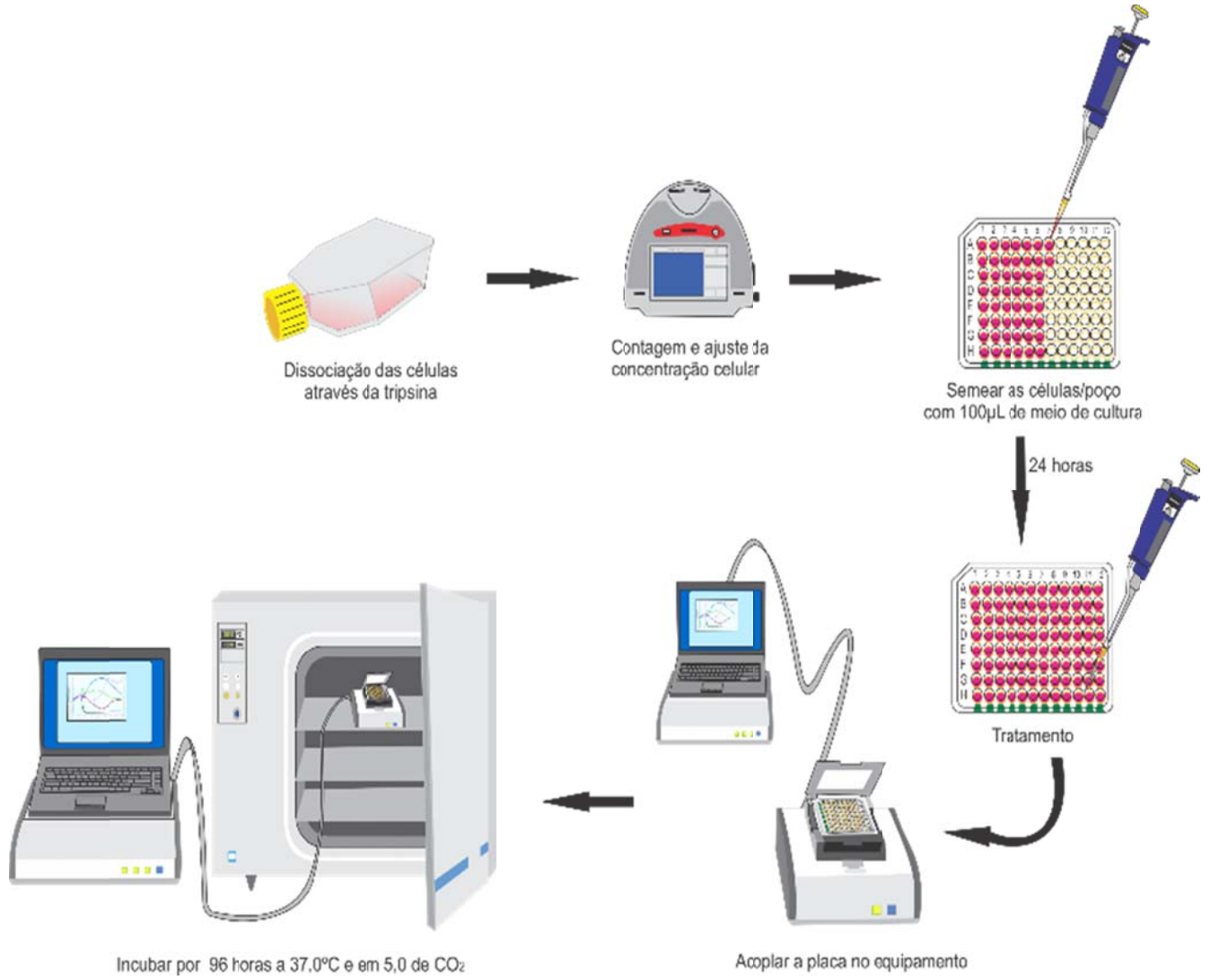


Figura 7: Esquema da metodologia realizada no teste do cometa.

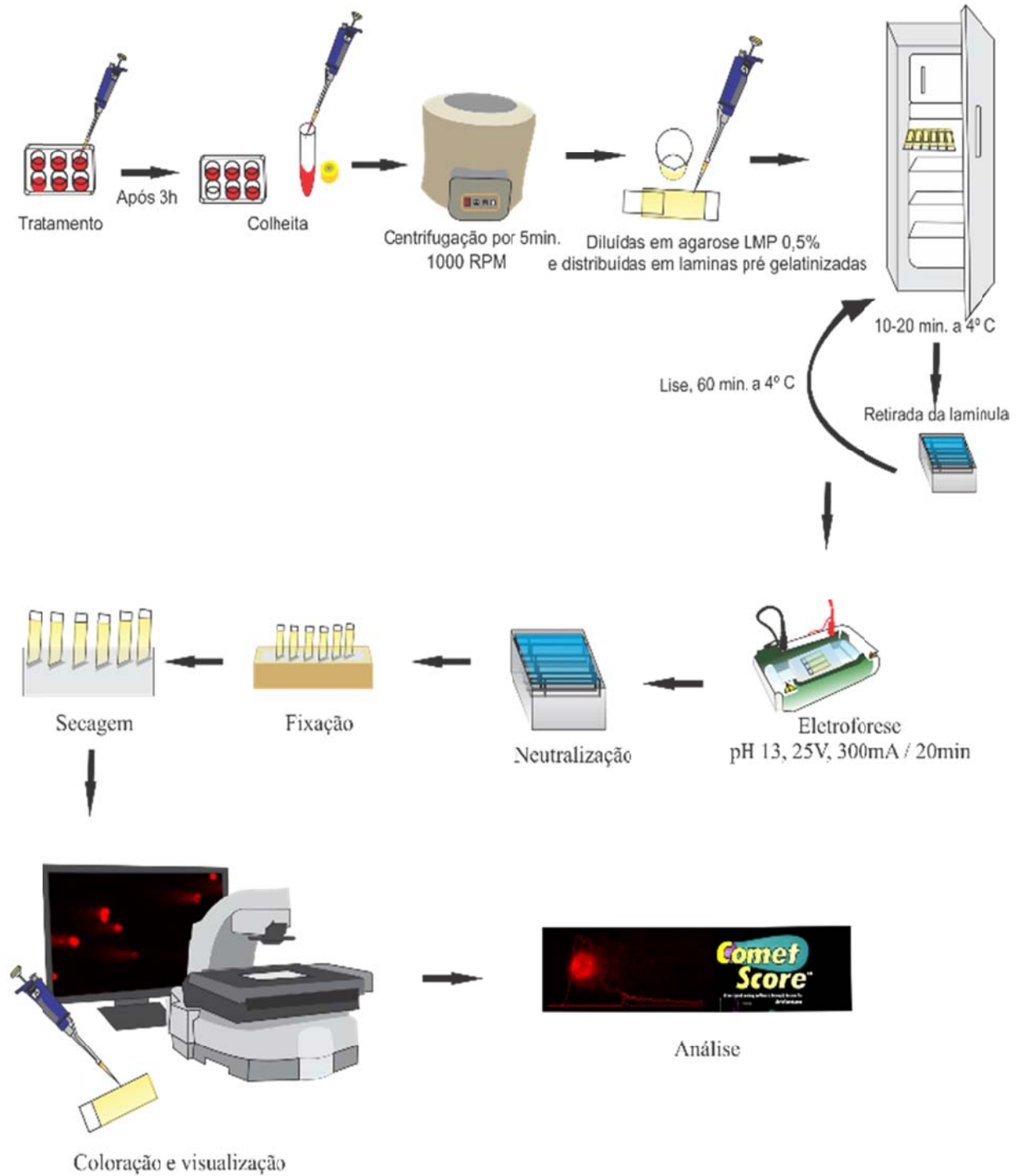


Figura 8: Esquema da metodologia realizada na análise por citometria de fluxo.

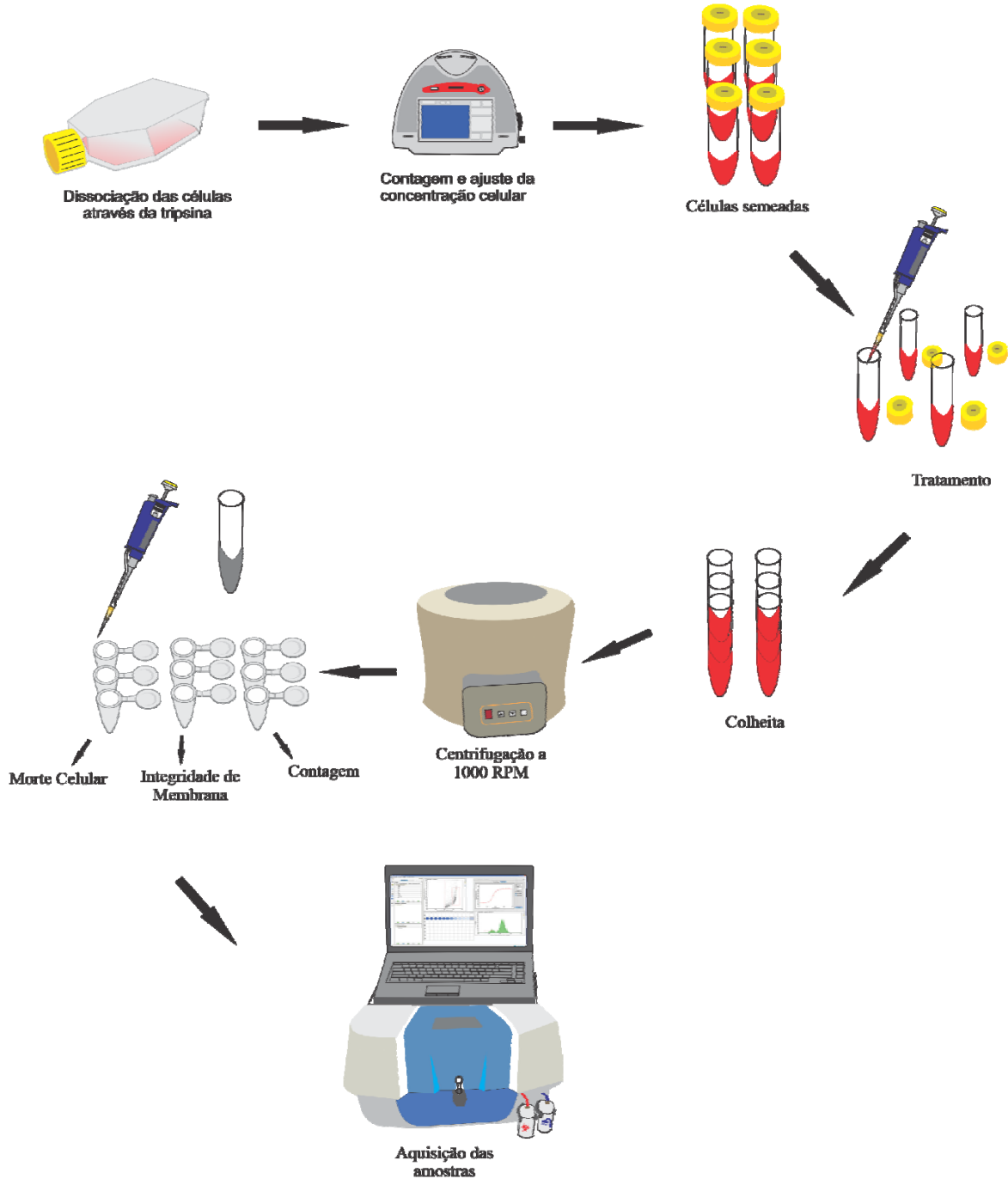


Figura 9: Esquema da metodologia realizada na análise da expressão gênica

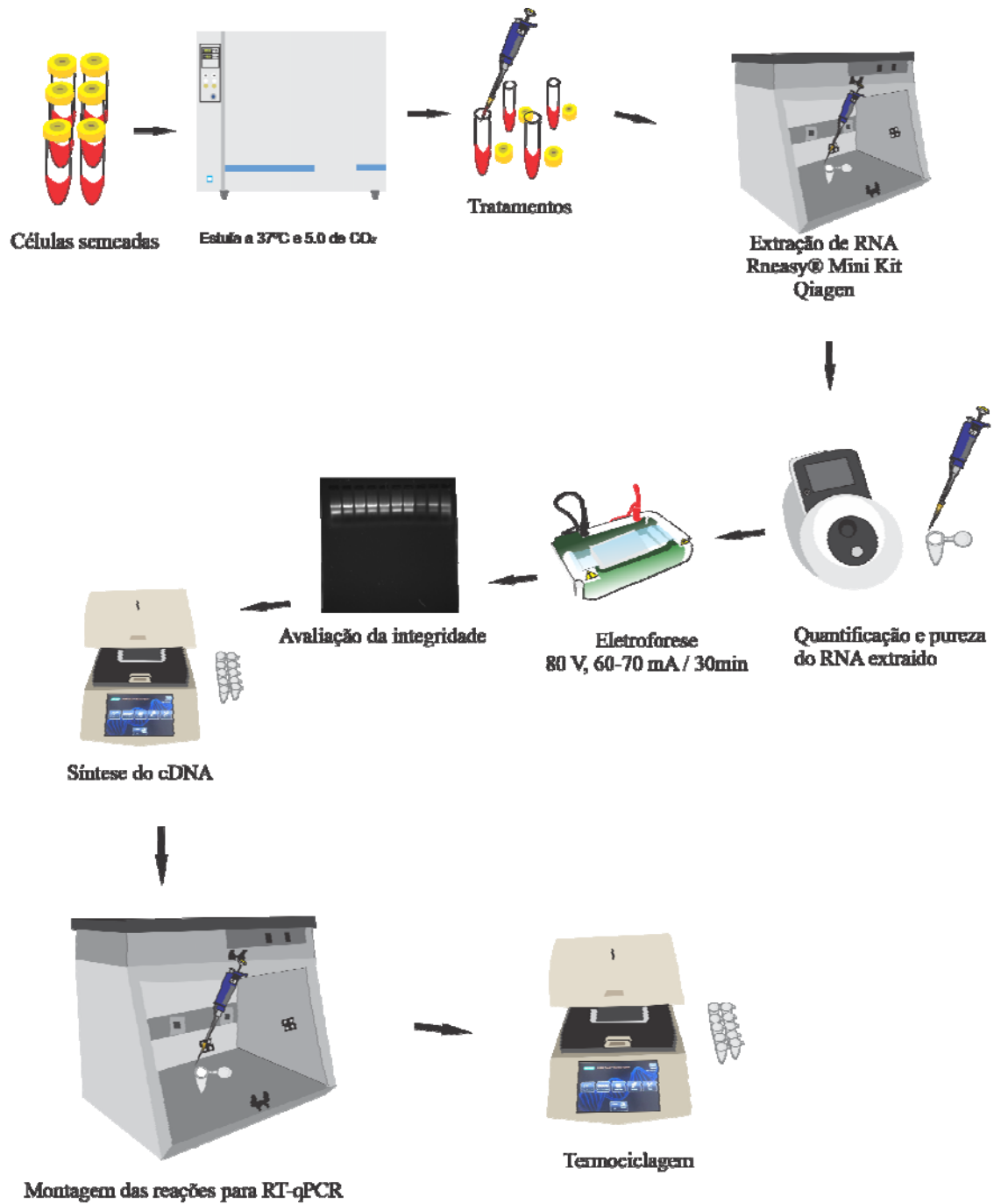
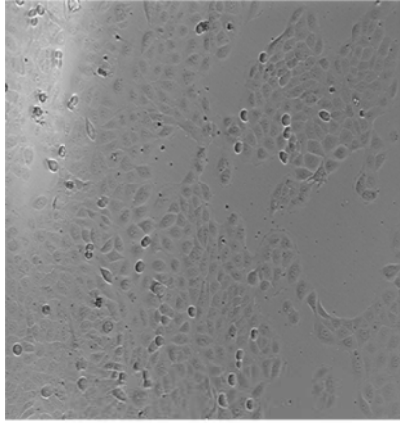


Figura 13. Imagens das células HaCat após 24h de tratamento com selenito de sódio nas concentrações de 10 μ M, 20 μ M e 40 μ M. Microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) com aumento de 200X



Controle

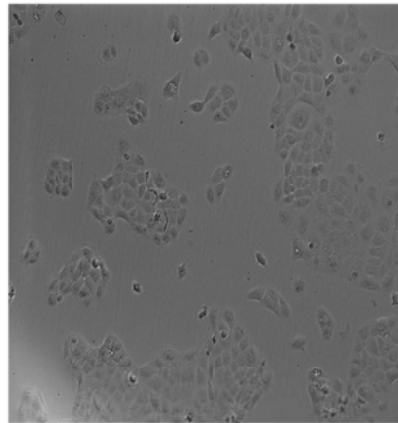
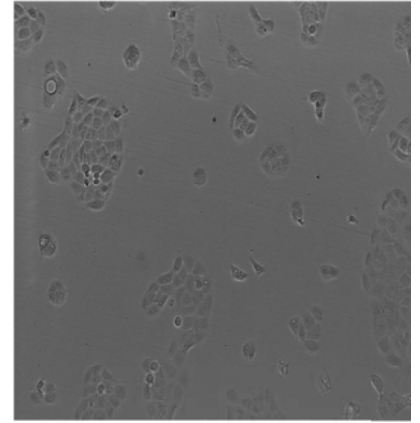
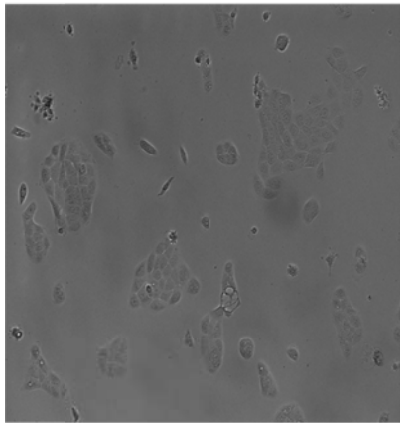
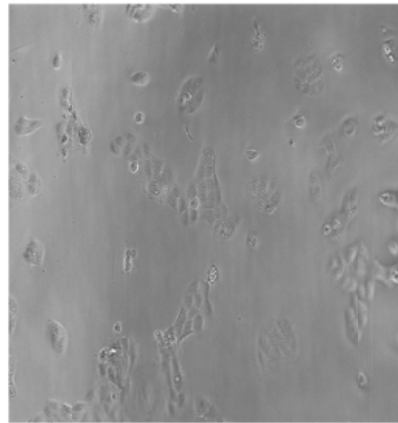
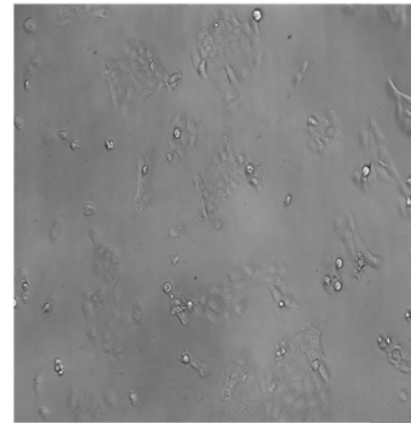
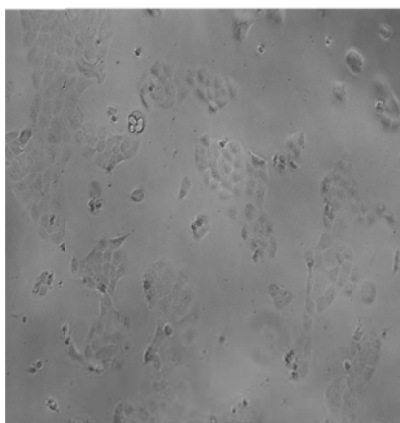
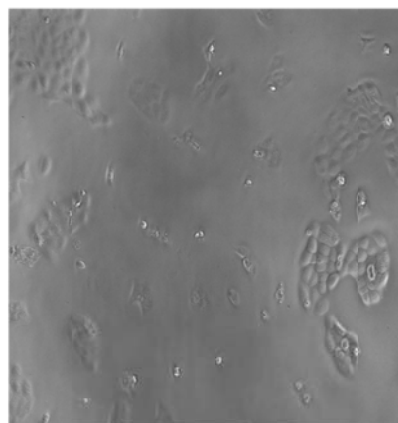
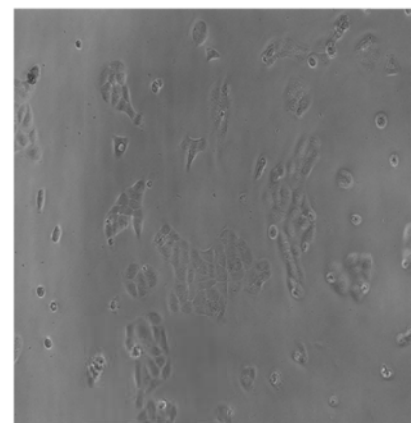
10 μ M20 μ M30 μ M40 μ M50 μ M60 μ M70 μ M80 μ M

Figura 14. Imagens das células HaCat após 72h de tratamento com selenito de sódio a 10, 20 e 40 μ M na placa de RTCA. Microscópio EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher) com aumento de 200X

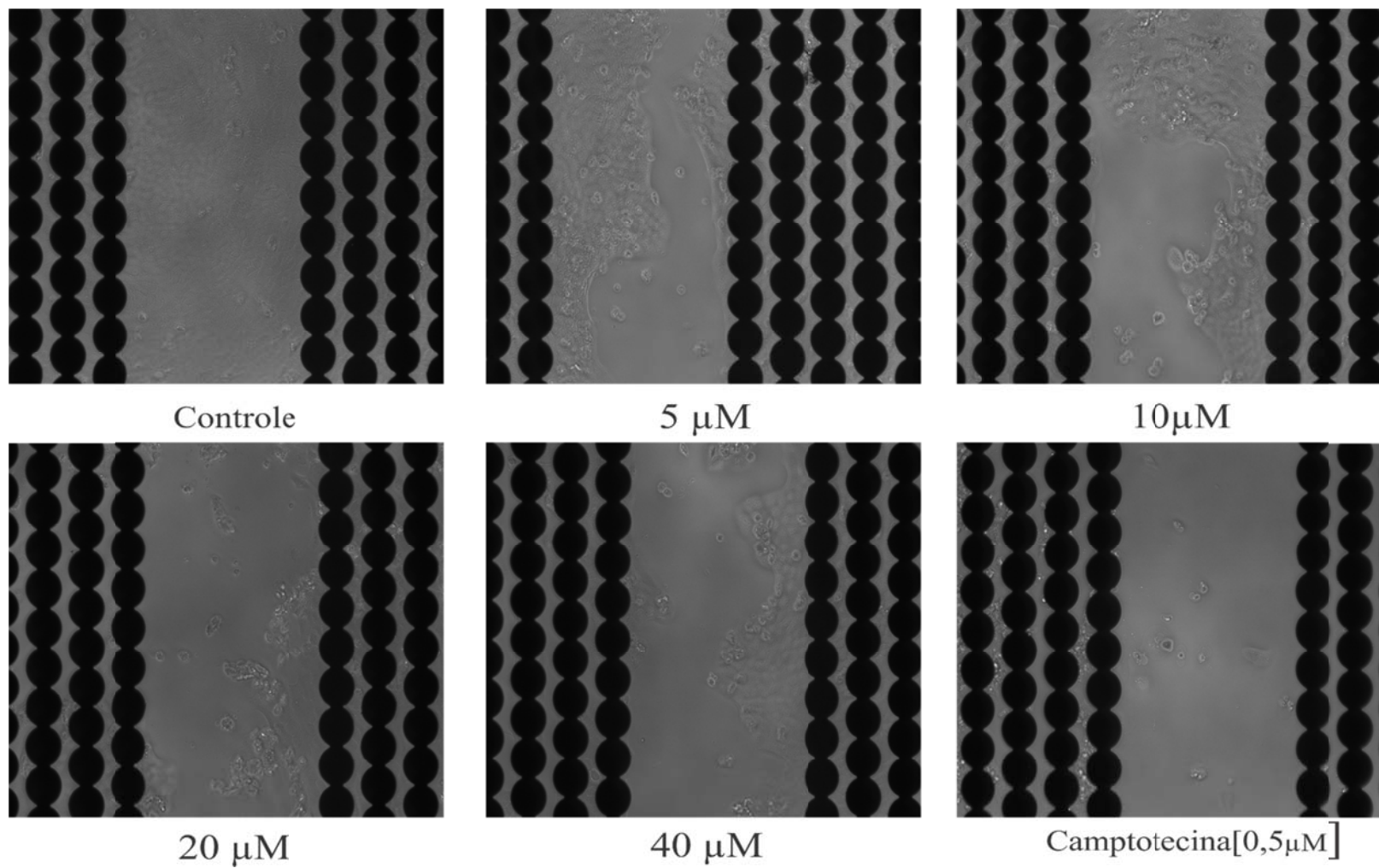


Figura 16. Imagem representativa analisadas pelo programa CometScore. versão 1.5 (TriTek-Corp, USA) 2004, capturadas através do Microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) com aumento de 200X.

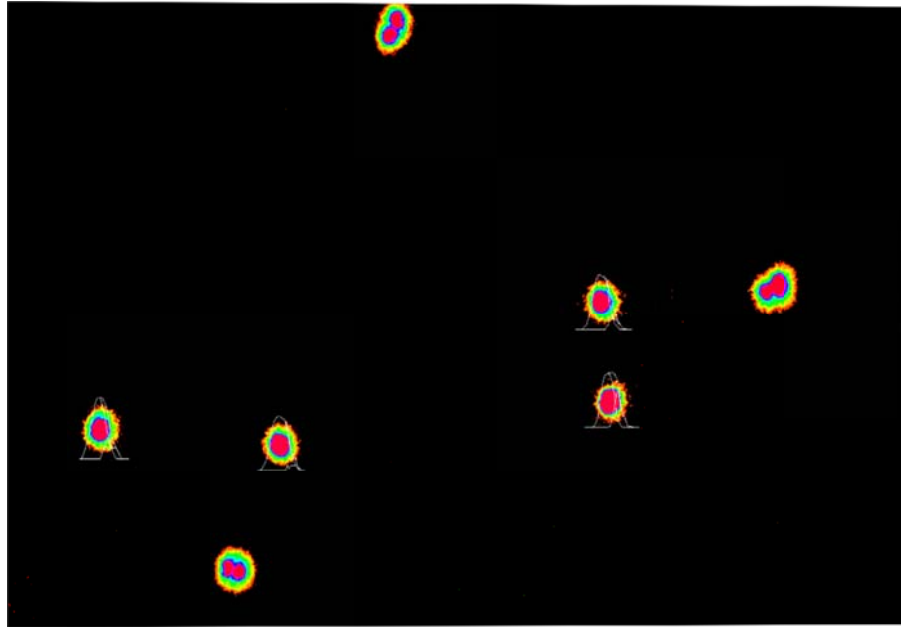


Figura 22. Média dos valores de %DNA in tail linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20 e 40µM de elenito de sódio no período de 3h. As barras representam o desvio. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*). Doxorubicina [1 µM] como controle +

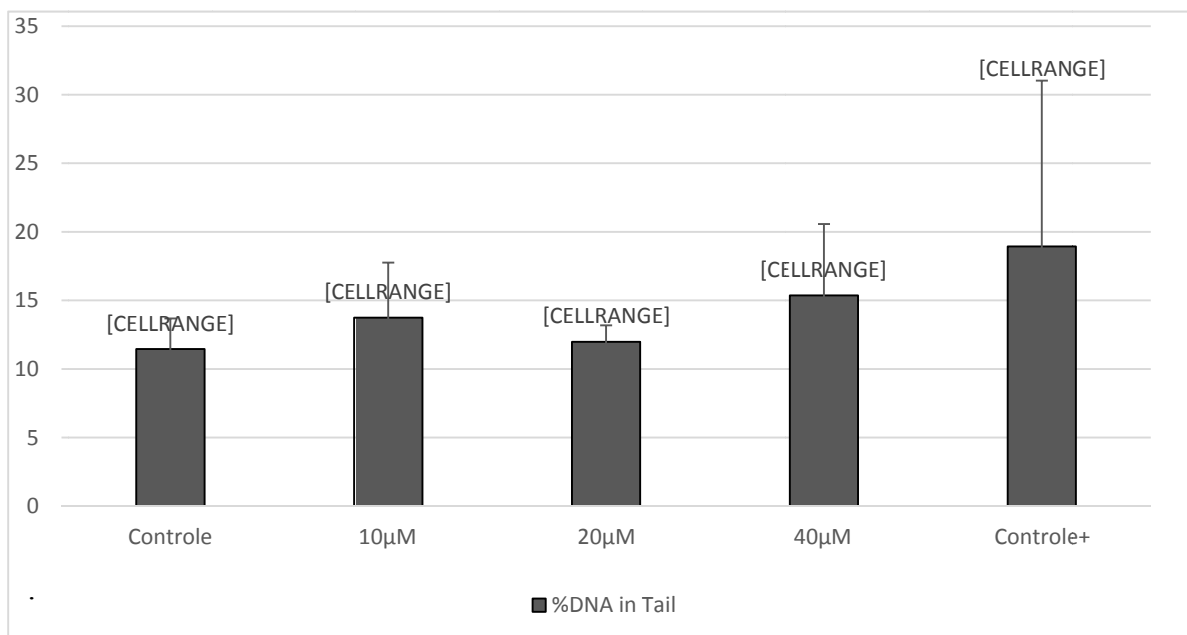
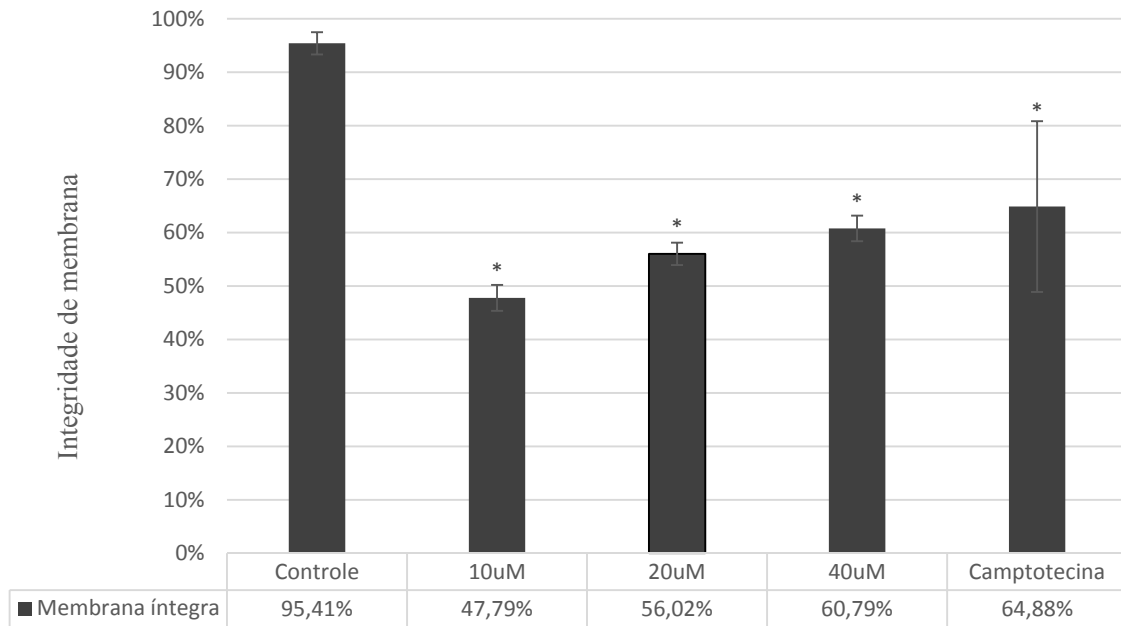


Figura 23. Valores da integridade da membrana celular da linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M de selenito de sódio e camptotecina [1 μ M] com controle + no período de 24h. As barras representam as médias \pm desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*).



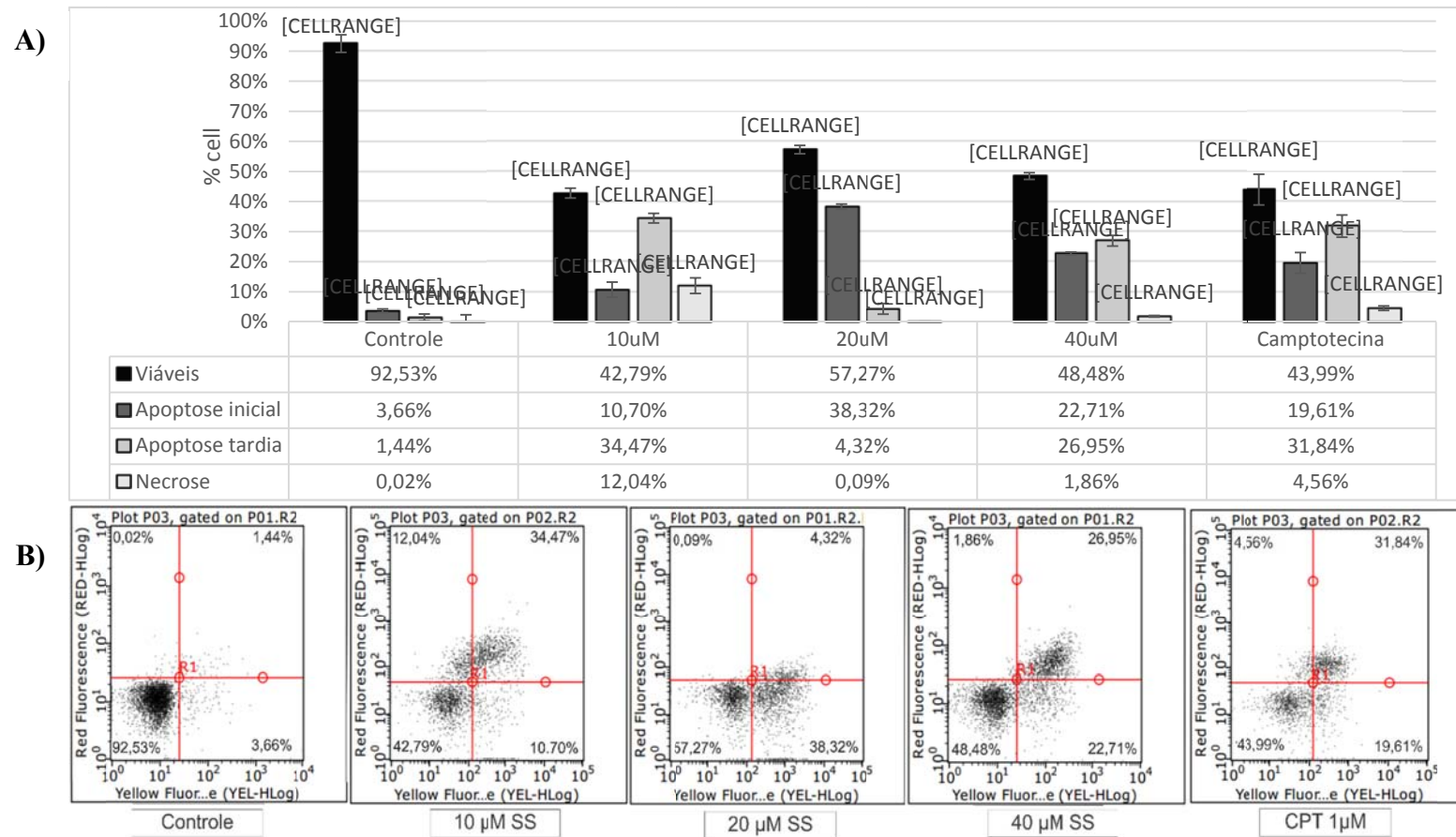


Figura 24. Valores da viabilidade celular da linhagem HaCat tratada nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M de selenito de sódio e camptotecina [1 μ M] com controle + no período de 24h através da citometria de fluxo. **A)** As barras representam as médias \pm desvio padrão. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*). **B)** gráficos em dotplot representativo dos tratamentos.

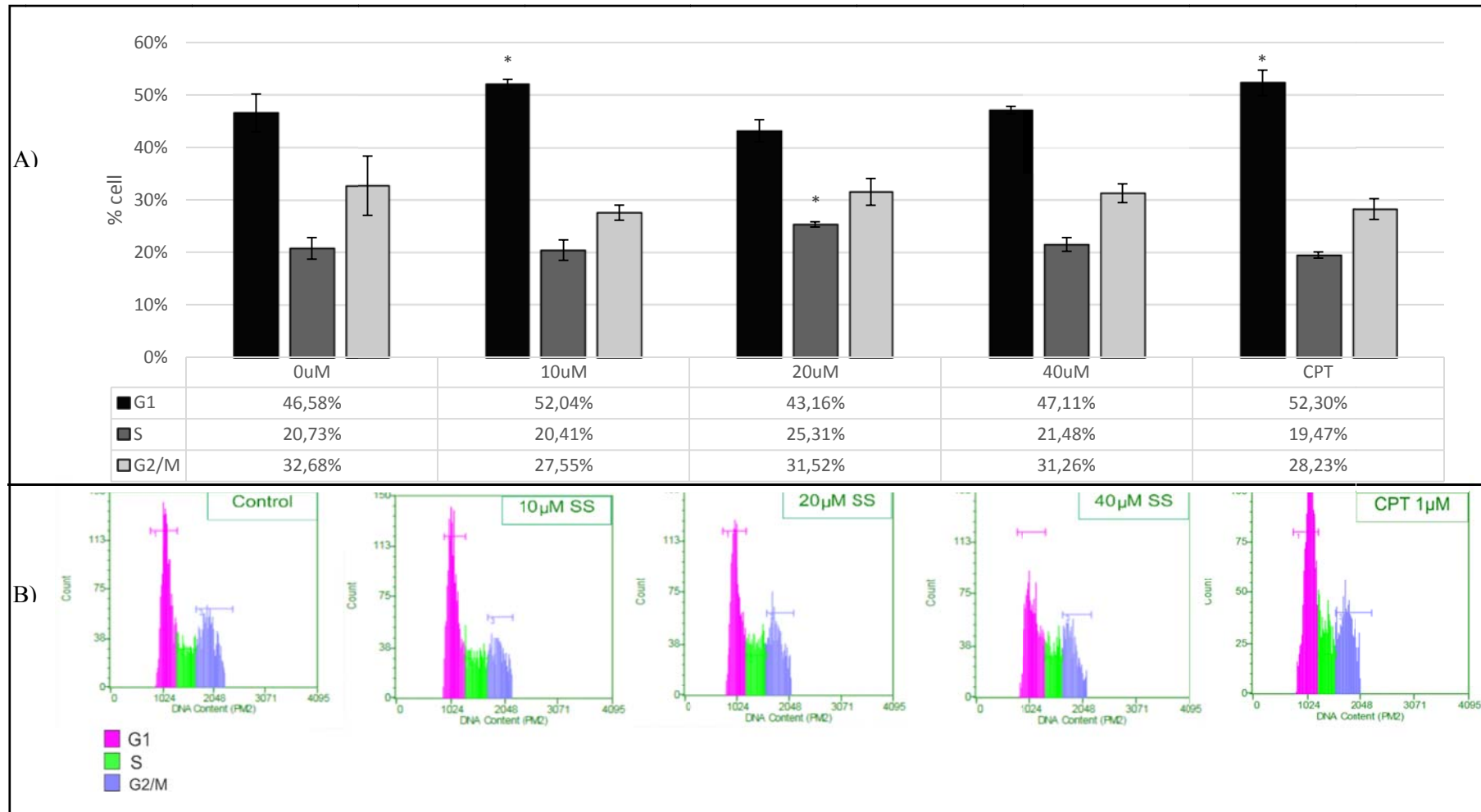


Figura 25. Valores médios da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo da linhagem HaCat referente aos tratamentos de 10, 20 e 40 μ M de selenito de sódio e camptotecina [1 μ M] no período de 24h. **A)** Barras das médias \pm desvio padrão. Diferença estatística $p \leq 0,05$ (*). **B)** Representação dos histogramas. Gráficos representativos de uma repetição cujo resultado foi similar aos demais.

Tabela 1: Lista dos primers utilizados para a análise da expressão gênica e suas respectivas sequências

Gene		Sequência
RPL13A	Forward	CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA
	Reverse	TTG AGG ACC TCT GTG TAT TTG TCA A
PUMA	Forward	GTA AGA TAC TGT ATA TGC GCT G
	Reverse	TTT TCC ACT GTT CCA ATC TG
CCNA2	Forward	GAC CCT GCA TTT GGC TGT G
	Reverse	ACA AAC TCT GCT ACT TCT GG
CCNB1	Forward	AGA GCA TCT AAG ATT GGA GAG
	Reverse	CCA TGT CAT AGT CCA ACA TAG
CCNB2	Forward	ATT TTT ACA GGT TCA GCC AG
	Reverse	ATC TCC TCA TAC TTG GAA GC
CCND1	Forward	GCC TCT AAG ATG AAG GAG AC
	Reverse	CCA TTT GCA GCA GCT C
CDKN1A	Forward	CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC
	Reverse	CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG
TP53	Forward	TAC CAC CAT CCA CTA CAA CT
	Reverse	GAC AGG CAC AAA CAC GCA C
CHEK1	Forward	GGT GAA TAT AGT GCT GCT ATG TTG ACA
	Reverse	TTG GAT AAA CAG GGA AGT GAA CAC
CHEK2	Forward	CCC AAG GCT CCT CCT CAC A
	Reverse	AGT GAG AGG ACT GGC TGG AGT T
mTOR	Forward	GGA GGA GAA ATT TGA TCA GG
	Reverse	GGG CAA CAA ATT AAG GAT TG
CASP7	Forward	AAG CCA TGG AGA AGA AAA TG
	Reverse	CCT GAA TGA AGA AGA GTT TGG
CASP8	Forward	CTA CAG GGT CAT GCT CTA TC
	Reverse	ATT TGG AGA TTT CCT CTT GC
CASP9	Forward	CTC TAC TTT CCC AGG TTT
	Reverse	TTT CAC CGA AAC AGC ATT
PARP1	Forward	AAA AGG AGG TGG AAA AGA TG
	Reverse	GCT AAG AAC AAC TCC TGA AG
BIRC5	Forward	CAT CTC TAC ATT CAA GAA CTG G
	Reverse	CCT TGA AGC AGA AGA AAC AC
CASP3	Forward	AAC TGG ACA GTA ACA TGG AG
	Reverse	TTG CTG GCA AAG TAG AAA AG
BECN 1	Forward	CAG TAT CAG AGA GAA TAC AGT G
	Reverse	TGG AAG GTT GCA TTA AAG AC
Catalase B	Forward	CAT CGC CAC ATG AAT GGA TA
	Reverse	CCA ACT GGG ATG AGA GGG TA

GPX1	Forward	CTCCCCTTACAGTGCTTGTTTCG
	Reverse	CGATGTCAATGGTCTGGAAG
SOD1	Forward	CTA GCG ACT TAT GGC GAC
	Reverse	GAA TGT TTA TTG GGC GAT C
c-MYC	Forward	TGA GGA GGA ACA AGA AGA TG
	Reverse	ATC CAG ACT CTG ACC TTT TG
ATM	Forward	ACC ATT GTA GAG GTC CTT C
	Reverse	GTC TCA TTA AGA CAC CGT TCA G
ATR	Forward	CCT TCA GAT TTC CCT TGA ATA C
	Reverse	GCA GTT CAT GTT TTG ATG AG
GADD45A	Forward	TCA GCG CAC GAT CAC TGT C
	Reverse	CCA GCA GGC ACA ACA CCA C
MDM2	Forward	CCT TAG CTG ACT ATT GGA AAT G
	Reverse	TGT TGA GTT TTC CAG TTT GG
H2AFX	Forward	AAT CCA AGC ACC TAG ATA CC
	Reverse	CAG AAT TCC AGT TCA GAA GC

Primers adquiridos na Sigma

Tabela 2. Ensaio de citotoxicidade:

Selenito de sódio 24 horas	Absorbância 550nm	% do controle	Desvio
Controle	1,04		0,015
10uM	0,89*	85,78%*	0,029
20uM	0,79*	76,18%*	0,016
30uM	0,81*	77,43%*	0,040
40uM	0,80*	76,58%*	0,028
50uM	0,68*	64,92%*	0,060
60uM	0,74*	71,19%*	0,056
70uM	0,68*	65,55%*	0,068
80uM	0,66*	63,04%*	0,072
Camptotecina	0,44*	42,10%*	0,076

P ≤ 0,05 *

Resultados detalhados do RT-PCR

Tabela 4. Resultados detalhados do RT-PCR em tempo real dos genes analisados. Calculado de acordo com o método $\Delta\Delta Ct$ descrito por Livak e Schmittgen, 2001 e significância calculada pelo Rest

	Gene		Delta Ct	$\Delta\Delta Ct$	Fold-change		Significância
Controle	ATM	23,456	7,423	0,286	0,820173		
Tratado	ATM	24,251	7,709				
Controle	ATR	24,32556	8,274	1,083	0,472	2,119	*
Tratado	ATR	25,87767	9,357				
Controle	BECN	21,884	5,851	-0,056	1,039579		
Tratado	BECN	22,337	5,795				
Controle	BIRC5	19,904	3,871	0,76	0,590496		
Tratado	BIRC5	21,173	4,631				
Controle	Caspase 7	24,185	8,152	0,078	0,94737		
Tratado	Caspase 7	24,772	8,23				
Controle	Caspase 8	24,924	8,891	-0,056	1,039579		
Tratado	Caspase 8	25,377	8,835				
Controle	Caspase 9	28,488	12,455	-0,203	1,151089		
Tratado	Caspase 9	28,794	12,252				
Controle	Caspase 3	22,391	6,358	0,174	0,886382		
Tratado	Caspase 3	23,074	6,532				
Controle	Catalase B	20,421	4,388	0,362	0,778085		
Tratado	Catalase B	21,292	4,75				
Controle	CCNA1	22,244	6,211	-0,714	1,640346		
Tratado	CCNA1	22,039	5,497				
Controle	CCNB1	19,771	3,738	-0,125	1,090508		
Tratado	CCNB1	20,155	3,613				
Controle	CCNB2	20,618	4,585	-0,176	1,129747		
Tratado	CCNB2	20,951	4,409				
Controle	CCND1	24,233	8,2	-0,465	1,380317		
Tratado	CCND1	24,277	7,735				
Controle	Chk 1	22,946	6,913	0,042	0,971307		
Tratado	Chk 1	23,497	6,955				
Controle	Chk 2	23,432	7,399	0,386	0,765248		
Tratado	Chk 2	24,327	7,785				
Controle	c-MYC	20,467	4,434	-0,213	1,159275		*
Tratado	c-MYC	20,76278	4,221				
Controle	GADD 45A	23,119	7,067	-0,983	1,977		*
Tratado	GADD 45A	22,605	6,084				
Controle	GPX 1	23,276	7,225	0,002	0,999		

Tratado	GPX 1	23,747	7,227				
Controle	H2AX	18,504	2,471	0,505	0,70466		
Tratado	H2AX	19,518	2,976				
Controle	MDM2	25,67	9,637	0,66	0,632878		
Tratado	MDM2	26,839	10,297				
Controle	mTor	26,453	10,402	1,112	0,463	2,162	*
Tratado	mTor	28,034	11,514				
Controle	P21	21,73	5,697	-0,101	1,072517		
Tratado	P21	22,138	5,596				
Controle	P53	19,753	3,72	0,557	0,679714		
Tratado	P53	20,819	4,277				
Controle	PARP-1	20,809	4,776	0,611	0,654743		
Tratado	PARP-1	21,929	5,387				
Controle	PUMA	28,80667	12,77367	-1,155	2,227015		*
Tratado	PUMA	28,16056	11,61856				
Controle	RPL-13A	16,05167	0	0	1	1	
Tratado	RPL-13A	16,52056	0				
Controle	SOD 1	18,98	2,947	0,807	0,571569		
Tratado	SOD 1	20,296	3,754				

Tabela 5. Dados obtidos pela quantificação de RNA total por espectrofotometria

Tratamento	Repetição 1			Repetição 2			Repetição 3		
	µg/µL	Razão (260/230)	Razão (260/280)	µg/µL	Razão (260/230)	Razão (260/280)	µg/µL	Razão (260/230)	Razão (260/280)
Controle	169,8	2,06	2,06	204,5	1,04	2,07	227,4	1,07	2,07
10µM	196,2	1,08	2,06	301,6	1,11	2,07	224,4	1,4	2,05
20uM	50,74	0,65	2,08	69,62	0,59	2,07	110,1	1,04	2,07