



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

THALITA ALVES ZANETTI

**EFEITO PROTETOR DO SELENITO DE SÓDIO FRENTE
AOS DANOS CAUSADOS PELO H₂O₂ EM CÉLULAS
HEPG2/C3A**



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

THALITA ALVES ZANETTI

**EFEITO PROTETOR DO SELENITO DE SÓDIO FRENTE
AOS DANOS CAUSADOS PELO H₂O₂ EM CÉLULAS
HEPG2/C3A**

THALITA ALVES ZANETTI

**EFEITO PROTETOR DO SELENITO DE SÓDIO FRENTE
AOS DANOS CAUSADOS PELO H₂O₂ EM CÉLULAS
HEPG2/C3A**

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2016

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

Zanetti, Thalita Alves.

Efeito protetor do selenito de sódio frente aos danos causados pelo H₂O₂ em células HepG2/C3A / Thalita Alves Zanetti. - Londrina, 2016.
69 f.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Selenito de Sódio - Teses. 2. Estresse Oxidativo - Teses. 3. Ciclo Celular - Teses. 4. Expressão Gênica e Proteica - Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

THALITA ALVES ZANETTI

**EFEITO PROTETOR DO SELENITO DE SÓDIO FRENTE AOS DANOS
CAUSADOS PELO H₂O₂ EM CÉLULAS HEPG2/C3A**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Zaira da Rosa Guterres
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul -
UEMS

Prof. Dr. Sandra Regina Lepri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 07 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pelo dom da vida, pelo seu amor infinito, sem Ele nada sou.

Agradeço a minha mãe, Maria Regina, meu maior exemplo. Obrigada por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor, pela preocupação para que estivesse sempre andando pelo caminho correto.

Aos meus amigos de laboratório que no decorrer desses anos deixaram os longos dias de estudos mais divertidos, em especial a Bruna, Glaucia, Eliane, Ingrid, Adrivanio, Lilian, Andressa, Simone, Giuliana, Natanael, Amanda, Daniel e Igor. Obrigada por todos os momentos em que fomos estudiosos, brincalhões, cozinheiros e cúmplices. Porque em vocês encontrei verdadeiros irmãos. Obrigada pela paciência, pelo sorriso, pelo abraço, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês.

Ao meu irmão Erickson, tios, tias, avós e primos que sempre estiveram presentes. Obrigada pelo carinho e compreensão que tem me dedicado.

Ao professor Mário Sérgio Mantovani que, com muita paciência e atenção, dedicou do seu valioso tempo para me orientar em cada passo deste trabalho.

Aos meus amigos, Elquer, Paula, Willian, Fabiana, Márcia, Marinês, Gislaine e Diego por todo apoio e cumplicidade. Porque mesmo quando distante, estavam presentes em minha vida.

Obrigada a todos que, mesmo não estando citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa e para a Thalita que sou hoje.

ZANETTI, Thalita Alves. **Efeito protetor do selenito de sódio frente aos danos causados pelo H₂O₂ em células HepG2/C3A**. 2016. 69f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) estão envolvidas em vários processos patológicos. Esses efeitos são minimizados no organismo por compostos com atividade antioxidante como o Selênio. O Selenito de Sódio (SS) é uma forma inorgânica de selênio e sua capacidade protetora precisa ser melhor esclarecida. Por isso, o estudo investigou o efeito do SS contra o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células HepG2/C3A analisando citotoxicidade e proliferação celular comparando com dados molecular (mRNAs e proteínas). O SS apresentou atividade citoprotetora e antígeno-tóxica, entretanto, não foi observado alteração na curva de proliferação celular e na alteração das fases de ciclo celular (retenção em G2/M) nos tratamentos associados (SS+ H₂O₂) quando comparado com H₂O₂. O SS modulou o sistema de defesa antioxidante nas células induzidas ao estresse oxidativo pelo H₂O₂, onde observou-se um aumento da expressão relativa do mRNA *GPX1* no tratamento associado mostrando resposta antioxidante. Além disso, alterações do mRNA *CAT* e proteína SOD1 e PRX2 pelo H₂O₂, foram minimizadas pelo tratamento associado também. Observou-se normalização dos níveis do mRNA *CCN2B* nos tratamentos associados, entretanto, esse efeito não foi evidenciado na expressão dos outros genes controladores de ciclo celular, onde observou-se aumento na expressão dos mRNAs *CDKN1A*, *CDKN1C*, *CDKN2B* e *GADD45A* nos tratamentos com H₂O₂ independente de SS. Desta maneira, nossos resultados demonstram que a proteção do SS se deve pela modulação do sistema de defesa antioxidante, entretanto este efeito não foi eficiente ao ponto de modular a expressão de genes que controlam o ciclo celular impedindo a continuidade do crescimento celular.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Ciclo celular. Antioxidante. Citoproteção. Antígeno-tóxico.

ZANETTI, Thalita Alves. **Protective effect of sodium selenite against the damage caused by H₂O₂ in HepG2/C3A cells.** 2016. 69p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Reactive Oxygen Species (ROS) are involved in various pathological processes. These effects are minimized in the body by compounds with antioxidant activity such as Selenium. Sodium selenite (SS) is an inorganic form of selenium and its cytoprotective and antioxidant capacity need to be clarified. Therefore, the study investigated the effect of SS against hydrogen peroxide (H₂O₂) in HepG2/C3A cells analyzing cytotoxicity and cell proliferation compared with molecular data (mRNA and protein). The SS showed antigenotoxic and cytoprotective activity, however, was not observed change in cell proliferation curve and change of cell cycle phases (G₂/M arrest) in the associated treatments (SS+H₂O₂) when compared with H₂O₂. The SS modulate the antioxidant defense system in cells to oxidative stress induced by H₂O₂, where there was an increase in the relative expression *GPX1* mRNA in the associated treatment showing antioxidant response. In addition, changes in the *CAT* mRNA and SOD1 and PRX2 protein H₂O₂ were also minimized by the associated treatment too. There was normalization of the levels of *CCN2B* mRNA in the associated treatments, however, this effect was not observed in the expression of other cell cycle controlling genes, which increase was observed in the expression of *CDKN1A*, *CDKN1C*, *CDKN2B* and *GADD45A* mRNAs in treatments with H₂O₂ independent of SS. Thus, our results show that SS protection is provided by modulation of antioxidant defense system, however this effect was not efficient to the point of modulating the expression of genes that control cell cycle blocking the continuity of cell growth.

Keywords: Oxidative stress. Cell cycle. Antioxidant. Cytoprotective. Antigenotoxic.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Estágios do ciclo celular	14
Figura 2 – Estruturas das principais formas orgânicas e inorgânicas de Selênio.....	16
Figura 3 – Via metabólica do selênio.....	18

ARTIGO

Figura 1 – Representação dos protocolos de tratamentos e seus respectivos tempos nos diferentes ensaios	29
Figura 2 – Valores de viabilidade celular da linhagem HepG2/C3A após tratamentos com H ₂ O ₂ e/ou SS	34
Figura 3 – Curva de Proliferação Celular da linhagem HepG2/C3A, após tratamento com H ₂ O ₂ e/ou SS	35
Figura 4 – Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (PI).....	36
Figura 5 – Valores médios de Comet Length (a) e Tail Moment (b) em células HepG2/C3A tratadas com H ₂ O ₂ e/ou SS.....	37
Figura 6 – Expressão relativa dos genes de estresse oxidativo (GPX1 e CAT), ciclo celular (CCNB2, CDKN1A, CDKN1C e CDKN2B) e danos de DNA (GADD45A) em células HepG2/C3A tratadas com SS e H ₂ O ₂	38
Figura 7 – Expressão de proteína do sistema de defesa antioxidante em células HepG2/C3A tratada com SS e/ou H ₂ O ₂ nos tempos de 6, 12 e 24 horas de recuperação celular	40
Figura 8 – Esquema representativo das alterações ocorridas nas células conforme o tratamento	47

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Valores de absorbância em 540 nm (médios \pm desvio padrão) obtida no Ensaio de Citotoxicidade MTT.....	64
Tabela 2 – Valores médios de IC obtidas no ensaio RTCA no período de recuperação celular em leituras a cada 24 horas.....	64
Tabela 3 – Média das porcentagens da distribuição das células nas fases do ciclo celular (G1, S e G2/M)	64
Tabela 4 – Média e desvio padrão dos resultados encontrado no Ensaio Cometa utilizando o programa CometScore©	65
Tabela 5 – Iniciadores utilizados na RT-Qpcr.....	65
Tabela 6 – Expressão relativa normalizada com o gene de referência ACTB utilizando o programa REST	65
Tabela 7 – Valores de média em RTq-PCR em tempo real dos genes estudados em células HepG2/C3A após 6 horas de recuperação celular	66
Tabela 8 – Média da Intensidade de Fluorescência obtidos na análise de proteína utilizando o aparelho MAGPIX® System.....	69

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	11
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Espécies reativas de Oxigênio	11
2.2	Ciclo Celular e Estresse Oxidativo	12
2.3	Selênio: Principais características	15
2.4	Atividades gerais do Selênio	19
2.5	Efeito protetor do selenito de sódio	21
3.	JUSTIFICATIVA	23
4.	OBJETIVOS	24
4.1	Objetivo Específico	24
5.	ARTIGO	25
5.1	Introdução	26
5.2	Materiais e Métodos	28
5.2.1	<i>Delineamento Experimental</i>	28
5.2.2	<i>Ensaio de Citotoxicidade – MTT</i>	29
5.2.3	<i>Análise da proliferação celular em tempo real pelo sistema xCELLigence</i>	30
5.2.4	<i>Análise de Ciclo Celular por Citometria de Fluxo</i>	30
5.2.5	<i>Ensaio do Cometa</i>	31
5.2.6	<i>Expressão Gênica</i>	32
5.2.7	<i>Análise de proteína</i>	33
5.2.8	<i>Análise Estatística</i>	33
5.3	Resultados	33
5.3.1	<i>Ensaio de citotoxicidade – MTT</i>	33
5.3.2	<i>Cinética de Proliferação celular em tempo real (RTCA)</i>	34
5.3.3	<i>Análise de ciclo celular por citometria de fluxo</i>	35
5.3.4	<i>Ensaio do Cometa</i>	37
5.3.5	<i>Expressão Gênica</i>	37

5.3.6	<i>Análise de proteína</i>	39
5.4	Discussão	40
5.5	Conclusão	47
6.	CONCLUSÕES GERAIS	55
	REFERÊNCIA	56
	APÊNDICES	62
	APÊNDICE A - Tabelas	64

1. INTRODUÇÃO GERAL

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) estão envolvidas em reações no sistema biológico que podem iniciar vários processos patológicos como aterosclerose, hipertensão, doenças isquêmicas, doença de Alzheimer, Parkinson, câncer e inflamação (TIWARI, 2001). Os efeitos das EROs no organismo variam, onde essas moléculas podem causar danos nos lipídios, proteínas, DNA, RNA e outras biomoléculas, contribuindo para a disfunção de vários sistemas celulares e posteriormente induzindo as células a morte celular (apoptose e necrose) e bloqueio ciclo celular (HELD, 2015).

Os efeitos das EROs nas células podem ser minimizados por alguns compostos com atividade antioxidante que muitas vezes são encontrados em alimentos. O elemento selênio, um micronutriente essencial, é importante na saúde humana e têm demonstrado potencial antioxidante, por constituir o centro ativo de inúmeras enzimas do sistema de defesa antioxidante como Glutathione Peroxidase (GPx) (COMINETTI; COZZOLINO, 2009), Tioredoxina Redutase (TrxR) (KOHÁRYOVÁ; KOLLÁROVÁ, 2008) e a família de Selenoproteínas (LIU; ROZOVSKY, 2015).

Por ser um constituinte importante de proteínas do sistema de defesa antioxidante celular, o selênio pode minimizar o efeito citotóxico e genotóxico de muitos agentes que são utilizados pelo ser humano no cotidiano. A efetividade de proteção deste micronutriente é dependente de sua dose e forma química no qual o selenito de sódio tem demonstrando grande efetividade citoprotetora (ROSA et al., 2012).

O selenito de sódio é uma forma inorgânica e fonte de selênio para o corpo, no entanto, a sua capacidade citoprotetora e antígenotóxica correlacionada com avaliação de expressão gênica e proteica desses efeitos ainda precisam ser esclarecidas quanto aos danos ocasionado pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células HepG2/C3A.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espécies reativas de Oxigênio

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são moléculas reativas e radicais livres derivados de oxigênio produzidas naturalmente durante o metabolismo celular através da

cadeia transportadora de elétrons na respiração aeróbica, por enzimas oxidorreductase ou por fontes externas como por exemplo, poluentes, radiação UV ou tabagismo (HELD, 2015).

Dentre as EROs, existem os radicais livres, que por vez apresentam elétrons desemparelhados em suas moléculas, como radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil ($\bullet OH$) e óxido nítrico (NO^\bullet) e os não- radicais que não apresentam elétrons desemparelhados em sua molécula como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozônio (O_3) e o oxigênio singlete (1O_2)² (BERRA; MENCK, 2006).

Por serem instáveis eletronicamente, as EROs são capazes de reagir com grandes números de estruturas celulares (HELD, 2015). Por conta disso, as células possuem mecanismo de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares dessas moléculas, entretanto, um desequilíbrio entre compostos oxidantes e os mecanismos de defesa antioxidantes podem ocasionar a geração excessiva destas moléculas levando as células a um estado denominado de estresse oxidativo. Este aumento de EROs em células ou tecidos podem fazer com que o mesmo interaja com lipídios, proteínas, DNA, RNA e outras biomoléculas, contribuindo para a disfunção dos sistemas celulares e para o desenvolvimento de inúmeras doenças como aterosclerose, hipertensão, doenças isquêmicas, doença de Alzheimer, parkinsonismo, câncer e inflamação (TIWARI, 2001).

O sistema de defesa antioxidante cuja função está relacionada ao impedimento da formação e ação das EROs é dividido em sistema enzimático, no qual se destaca as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) e sistema não-enzimático que são substâncias com potencial antioxidante de origem endógena e dietética. No último caso, vitaminas e minerais tem se demonstrado com grandes atividades antioxidantes. Por conta disso, estudos toxicológicos estão voltados à análise desses compostos com potencial antioxidante (EVANS; HALLIWELL, 2001).

O efeito das EROs no organismo varia conforme tempo de exposição e concentrações desses radicais onde a resposta celular varia desde aumento de proliferação celular, morte celular (apoptose e necrose) ou bloqueio ciclo celular (HELD, 2015).

2.2 Ciclo Celular e Estresse Oxidativo

A correta progressão do ciclo celular é essencial para a sobrevivência de um organismo. Erros nos processos envolvidos no ciclo celular podem acarretar diversos problemas, como o surgimento do câncer. Por conta disso, a progressão do ciclo celular é

estritamente regulada. O ciclo celular consiste de 4 fases sendo elas: *gap1* (G1), fase de síntese de DNA (S), *gap 2* (G2) e mitose (M) que são regulados por mecanismos moleculares cuja função é induzir ou bloquear a progressão do ciclo conforme a condição em que as células se encontram (DEPAMPHILIS et al., 2012).

Os componentes centrais do sistema de controle do ciclo celular são as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas (CDKs, *cyclin-dependent kinases*). As CDKs são ativadas pelas ciclinas para que ocorra a progressão do ciclo celular e suas atividades se alteram à medida que as células progridem no ciclo, levando a mudanças cíclicas na fosforilação de proteínas que iniciam ou regulam os principais eventos do ciclo celular (DEPAMPHILIS et al., 2012).

Fatores de crescimento ativam a síntese do fator de transcrição Ap1, no qual promove a síntese da ciclina D. Com o aumento dos níveis desta ciclina, a mesma ativa as CDK4/6 pela formação dos complexos ciclina D/CDK4/6 permitindo a entrada em G1 (**Figura 1A**). Estes complexos ativam uma cascata de fosforização e transcrição de genes necessários para a progressão do ciclo. No final dessa fase, ocorre a ativação de CDK2 pela formação do complexo ciclina E/CDK2 permitindo a entrada na fase S (**Figura 1B**). Nesta fase ocorre a duplicação do DNA e após esse processo, ocorre a formação do complexo ciclina A/CDK2 que causa a inativação de proteínas envolvidas na replicação do DNA (**Figura 1C**). Após isso, as células entram em G2, e o próximo complexo a se formar é o ciclina A/CDK1 que promove a entrada na mitose (**Figura 1D**). A mitose é ainda regulada pelo complexo ciclina B/CDK1 que promove a fosforilação de substratos nucleares necessários para a fase M (**Figura 1E**) (DEPAMPHILIS et al., 2012; VERBON et al., 2012; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

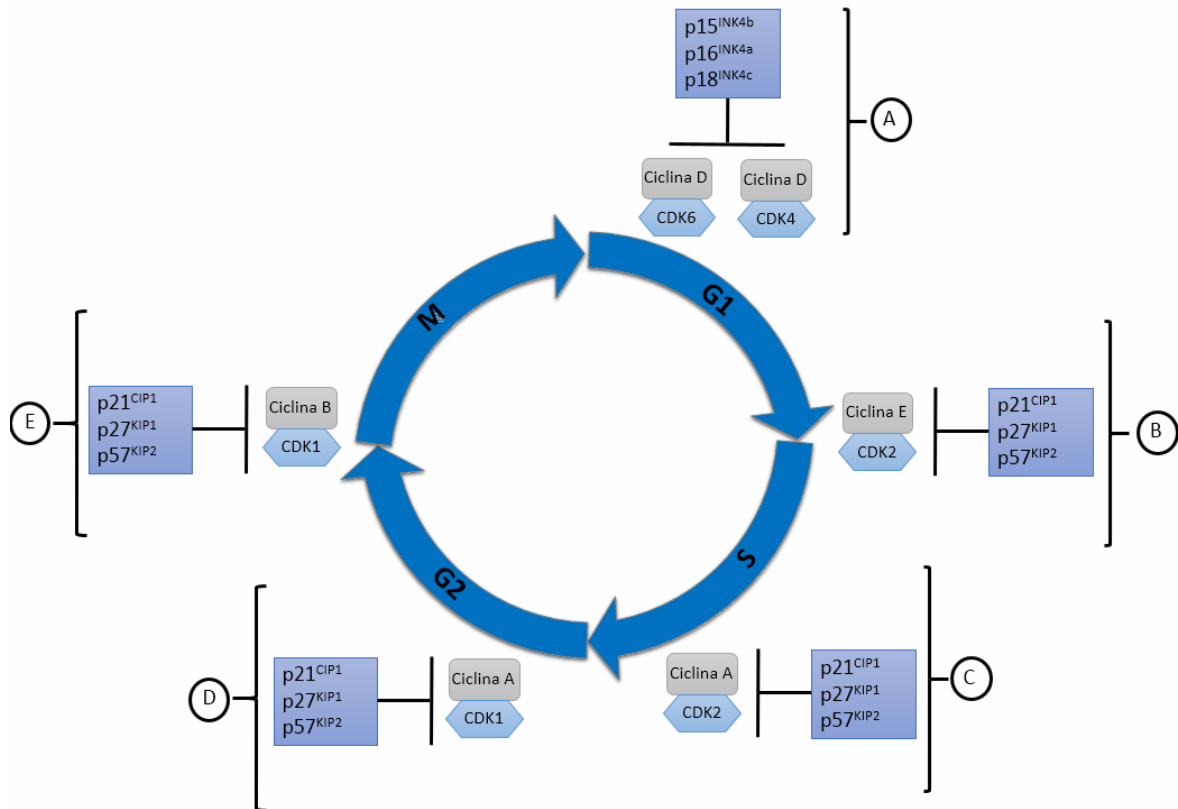


Figura 1. Estágios do ciclo celular. Os complexos formados em cada estágio do ciclo celular assim como seus respectivos inibidores de quinase dependente de ciclina.

Fonte: VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003 com modificações.

Além disso, as atividades das CDKs são controladas pelas famílias de inibidores de quinases dependentes de ciclina, as CIP/KIP e a INK4. Regulados por fatores internos e externos, esses inibidores se ligam a CDKs só ou ao complexo ciclina/CDK regulando a atividade de CDKs. A família CIP/KIP (*cyclin-dependent kinases inhibitor*) são constituídas dos inibidores CDKN1A^{p21/CIP1}, CDKN1B^{p27/KIP1} e CDKN1C^{p57/KIP2} e inibem a atividade dos complexos ciclina E/CDK2, ciclina A/CDK2, ciclina A/CDK1, ciclina B/CDK1 e menos efetivamente ciclina D/CDK4/6. A família INK4 é constituída pelo CDKN2A^{p16/INK4a}, CDKN2B^{p15/INK4b} e CDKN2C^{p18/INK4c} e inibem especificadamente o complexo ciclina D/CDK4/6 (**Figura 1**) (SILVA et al., 2009; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003)

A progressão do ciclo celular também é controlada por pontos de verificação (*Checkpoint*) que funcionam como pontos de controle de qualidade. Quando há algum dano nas células durante a divisão celular, esses pontos de verificação ativam uma cascata de sinalização bloqueando o ciclo e ativação de mecanismo de reparo (DEPAMPHILIS et al., 2012). O ponto de verificação mais elucidado é o de danos no DNA. Estes são posicionados

logo antes da fase S (G1/S) ou após a replicação do DNA (G2/M). Diferentes proteínas reconhecem danos ao DNA e ativam cascatas de sinalização, onde a principal proteína ativada em resposta a este tipo de dano é a p53 (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Inúmeros fatores (internos e externos) promovem a parada do ciclo celular. O H₂O₂, o principal gerador de estresse oxidativo em ensaios *in vitro*, por exemplo promoveu a parada do ciclo celular em diferentes linhagens e por diferentes mecanismos. Barnouin et al (2002) observaram o bloqueio de fibroblastos de ratos nas fases G1 e G2 tratadas com 250 a 500 µM de H₂O₂. Os autores mostraram também que o bloqueio foi ocasionado pela repressão da proteína ciclinas D1 e D3, redução da atividade dos complexos Ciclina D/CDK4, Ciclina A/CDK2, Ciclina E/CDK2 e Ciclina B/CDK2 e pelo aumento de p21 (independente de p53). A diminuição da ciclina B1 e parada celular em G2/M também foi evidenciada em linhagem de osteoblastos derivada de ratos (MC3T3-E1) tratados com 200 µM de H₂O₂ (LI et al., 2009).

Seomun et al (2005) observaram a retenção de epitélio de córnea humana (HLE B-3) tratadas com H₂O₂ (200 µM) em G2/M mediada pelo aumento da proteína p21 (via JNK e ERK1/2). No entanto, não foi observado a modulação de outras proteínas relacionado ao ciclo celular, como ciclina A, D1 e E, p27 e p57.

Células de musculo liso vascular (VSMC) ficaram retidas em G1 quando tratadas com 100 µM de H₂O₂. A parada do ciclo celular nesta fase foi devido ao bloqueio da atividade de CDK2, diminuição dos níveis transcricionais de ciclina A e aumento da expressão gênica e proteicas de p21 (dependente de p53) (DESHPANDE et al., 2002).

Xie et al (2001) mostraram que o H₂O₂ pode ativar a fosforilação e ativação da proteína p53 (via ATM/ATR). A ativação dessa proteína, pode diminuir a expressão dos genes ciclina B1 e B2 levando a célula a retenção em G2/M (QUAAS; MÜLLER; ENGELAND, 2013; KRAUSE et al., 2000).

2.3 Selênio: Principais características

O elemento Selênio (Se^{16}_34) foi descoberto pelo sueco J. J. Berzelius em 1817. Este por vez, nomeou-o para homenagear a deusa grega da lua, *Selena* (selênio, do grego σελήνη, lua). Pertencente ao grupo 16 (calcogênios) da tabela periódica, ele pode ser encontrado em formas inorgânicas com os selenetos (-2), selênio elementar (0), selenito (+4) e selenato (+6)

ou forma orgânicas, cujo os mais conhecidos são a selenocisteína (SeCys) e selenometionina (SeMet) (**Figura 2**) (MEHDI et al., 2013; SAZUKI; OGRA, 2002, apud. SUZUKI, 2005).

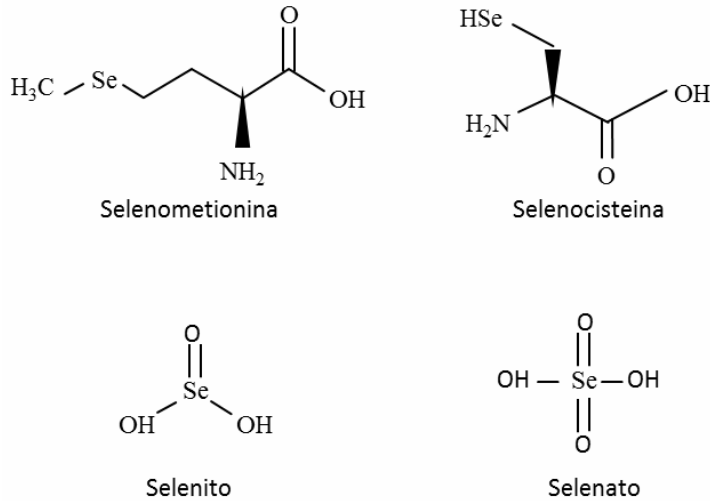


Figura 2. Estruturas das principais formas orgânicas e inorgânicas de Selênio.
Fonte: Baseado em MEHDI et al., 2013; SUZUKI, 2005.

Este micronutriente é importante para a saúde humana e está distribuído em toda a crosta terrestre, onde os valores no solo podem variar de traços a níveis altos tornando-se tóxicos. Os níveis de selênio no solo refletem a sua presença nos alimentos e posteriormente na população humana (HARTIKAINEN, 2005). De forma geral, dentre os principais alimentos que possuem selênio em sua composição, a castanha-do-brasil e o rim bovino são considerados as melhores fontes. Entretanto outros alimentos também são fonte deste micronutriente como carne bovina, ovos, peixes, frango, leites e seus derivados e os vegetais considerados “acumuladores de selênio”, como alho, mostarda, brócolis, couve-de-bruxelas, rabanete, couve-flor, repolho, cebola, cebolinha e também alguns cogumelos (NAVARRO-ALARCON; VIQUE, 2008). Nos mamíferos, o selênio é absorvido e metabolizado em diferentes vias sendo excretado (urina, pele ou respiração) ou incorporado em cadeias polipeptídicas (**Figura 3**) (KUMAR; PRIYADARSINI, 2014; PAPP; COMINETTI; COZZOLINO, 2009; HOLMGREN; KHANNA, 2007).

As formas orgânicas SeCys e SeMet são aminoácidos análogos a cisteína e metionina, respectivamente, diferindo somente na inserção de uma molécula de Selênio (Se) no local do enxofre (S) em suas estruturas químicas. As proteínas recebem o nome de selenoproteína, quando possui em sua cadeia o aminoácido SeCys ou podem ser chamadas de

proteínas contendo selênio quando possuem SeMet em sua cadeia (IWAOKA et al., 2008; SUZUKI, 2005).

A SeMet está presente em grande quantidade nos tecidos humanos, entretanto, os humanos não possuem a capacidade de sintetizar estes compostos que é introduzido no organismo através da alimentação (BEUTH; MOSS, 2011). Este pode seguir diferente rotas metabólicas, como incorporar-se em proteínas no lugar da metionina (não há distinção entre esses dois aminoácidos), ser convertido em SeCys pela via de trans-selenação, ou ser lisada para o metabólito intermediário de seleneto de hidrogênio (H_2Se) (**Figura 3**) (SUZUKI, 2005).

A SeCys é a forma do selênio mais ativa biologicamente, sendo considerado o 21º aminoácido do código genético. É incorporado à cadeia polipeptídica sob formação em resposta ao códon UGA. Este, embora seja normalmente um códon de terminação, também é usado como o códon do SeCys em numerosos organismos (TURANOV et al., 2011; BÖCK et al., 1991). Para a incorporação deste aminoácido no polipeptídeo, elementos como um tRNA específico ($tRNA^{[Ser]Sec}$) e proteínas auxiliares são necessárias. Para o reconhecimento do códon UGA como um sinal de inserção de SeCys, existe uma estrutura em alça na região 3' do mRNA, denominada de SECIS (*Seleno Cystein Insertion Sequence*) que auxilia neste processo. A SeCys da dieta não é incorporada nas selenoproteínas, sendo reduzidas também ao metabólito H_2Se (**Figura 3**) (PAPP; HOLMGREN; KHANNA, 2007).

Os compostos inorgânicos (selenito e selenato) são muito utilizados na alimentação e são mais rapidamente transformados ao metabólito H_2Se que as formas orgânicas. O H_2Se é muito importante para a inserção do aminoácido SeCys na cadeia polipeptídica. Ele reage com ATP, formando o selenofosfato (em uma reação catalisada pela selenofosfato sintetase) e junto com um resíduo de serina, o selenofosfato forma uma SeCys que é inserida nas selenoproteínas em resposta ao códon UGA (**Figura 3**) (MIRANDA, 2012; COMINETTI; COZZOLINO, 2009; PAPP; HOLMGREN; KHANNA, 2007).

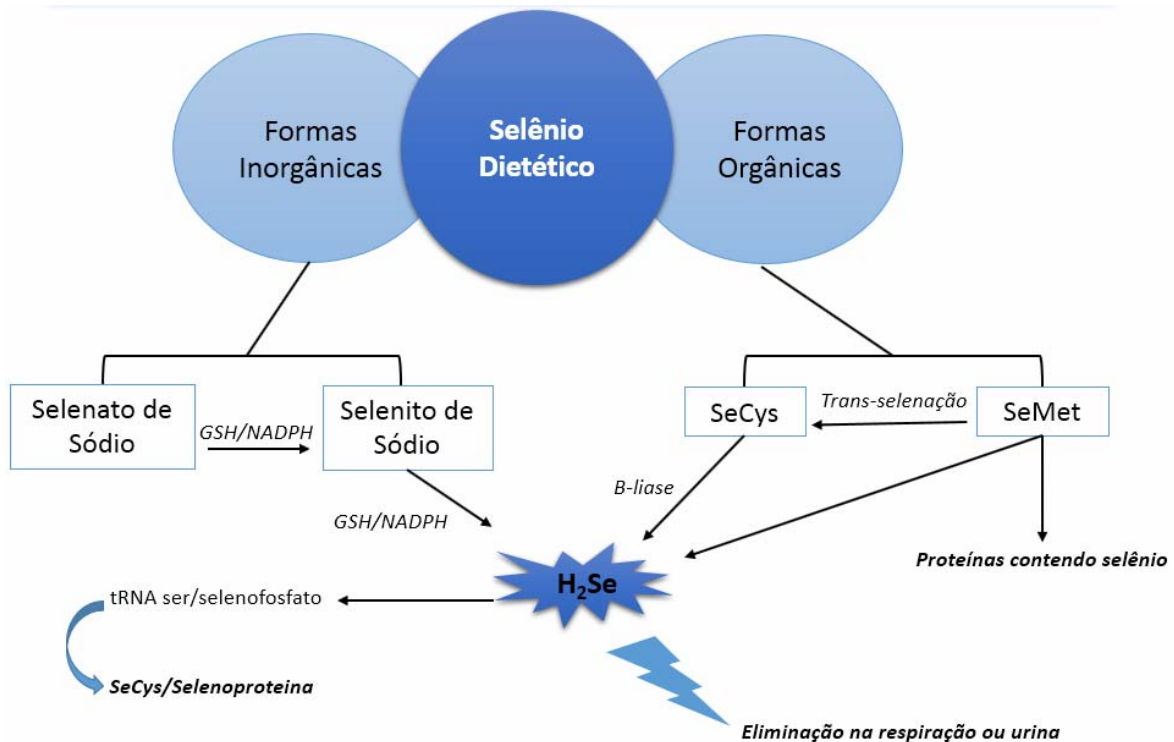


Figura 3. Via metabólica do selênio.
(SeCys – selenocisteína; SeMet – selenometionina; H₂Se – seleneto de hidrogênio)

Fonte: Miranda, 2012 com modificações.

A recomendação de ingestão diária (RDA) do selênio é de 55 µg (0,7 µmol/dia) para homens e mulheres sendo o máximo tolerável de até 400 µg (5,1 µmol/dia) (FNB - FOOD AND NUTRITION BOARD – USA INSTITUTE OF MEDICINE, 2000). A eficiência de absorção do selênio no organismo depende de sua forma química (SeMet>MeSeCys>Selenato>Selenito) (TRIRY et al., 2013) e a avaliação da biodisponibilidade é realizada através da atividade da Glutathione peroxidase (GPx). No corpo humano, esse elemento está presente em quase todas as células, sendo o rim e o fígado os órgãos que apresentam maior capacidade de acumulá-lo (NAVARRO-ALARCÓN; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2000).

Já a deficiência desse micronutriente no organismo está relacionada ao desenvolvimento de diversas doenças como: desordens cardiovasculares, cirrose, cânceres, diabetes entre outros. Sua ação preventiva e terapêutica contra estas patologias parece estar fortemente ligada à sua propriedade antioxidante (LOSCALZO, 2014; REDDI; BOLLINENI, 2001; AL-BADER et al., 1998).

Em humanos, já foram encontrados 25 genes de selenoproteína (LABUNSKYY; HATFIELD; GLADYSHEV, 2014). Apesar de muitas selenoproteínas não serem bem

caracterizadas, sabe-se que a maioria possui funções enzimáticas com atividades catalíticas e antioxidantes (PAPP; HOLMGREN; KHANNA, 2007).

Dentre as seleno-enzimas mais caracterizadas, destaca-se a família glutationa peroxidase. Esta foi uma das primeiras selenoproteínas identificadas em mamíferos e possui maior atividade antioxidante em relação às outras, sendo distribuída por diferentes tecidos e em diferentes quantidades no organismo no qual sua principal função é decompor o H_2O_2 à água, protegendo as células contra moléculas oxidantes (COMINETTI; COZZOLINO, 2009; FLOHE; GÜNZLER; SCHOCK, 1973).

Junto com esta família, há a família da tioredoxina redutase (TrxR) que junto com tiorredoxina (Trx) e NADPH compõem o Sistema Tioredoxina que, entre suas funções conhecida está a defesa antioxidante (BJÖRNSTEDT, 1995 apud. ALMONDES et al., 2010; KOHÁRYOVÁ; KOLLÁROVÁ, 2008).

Outra importante família são a Selenoproteínas, que é um grupo de diversas proteínas que atuam na atividade antioxidante no espaço intra e extracelular, homeostase de cálcio, biossíntese de fosfolípidios, regulação de complexos de membrana entre outros (LIU; ROZOVSKY, 2015).

2.4 Atividades gerais do Selênio

O selênio possui inúmeros benefícios para o ser humano. Nas indústrias, diversas formas desse elemento são utilizadas na fabricação de dispositivos eletrônicos, células fotovoltaicas, tambores de fotocopiadoras entre outros. Também são utilizados como pigmentos (vermelho-rubi) para óleos lubrificantes, vidros, esmaltes e nas indústrias de tintas. Além dessas utilidades, o selênio também é utilizado nas áreas de agricultura e pecuária (alterações de deficiência do solo, em inseticidas e na alimentação de animais) e está envolvido na fabricação de produtos farmacêuticos para fins humanos e veterinários (MEHDI et al., 2013).

Diversos estudos são desenvolvidos no sentido de esclarecer as possíveis funções deste elemento na prevenção e tratamento de várias doenças. Leite et al (2015) demonstraram, que o disseleneto de difenila $(PhSe)_2$, um composto organoselênio, influenciou, junto com atividade física (natação), os níveis de citocinas pró e anti-inflamatório conforme a idade de ratos Wistar. Neste estudo, os autores concluíram que a suplementação deste composto teve um efeito anti-inflamatório em ratos de meia-idade.

Indivíduos portadores do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) tipo C em fase inicial da doença foram suplementados com coquetéis contendo multivitaminas, selênio ou ambos (multivitaminas+selênio) durante 24 meses. Observou-se uma diminuição da progressão da doença em indivíduos que foram suplementados com o coquetel contendo multivitaminas e selênio. Por conta desse efeito, foi sugerido que esse micronutriente pode retardar a necessidade da Terapia Antirretroviral (ART) que por sua vez é uma terapia cara, sendo de extrema importância para países com recursos limitados (BAUM et al., 2013).

A sua atividade antifúngica também faz com que o selênio na forma de sulfeto de selênio, esteja na composição de shampoos que são utilizados com coadjuvante nos tratamentos de micoses de couro cabeludo, tal como a *Tinea capitis* em crianças (CHEN, et al., 2010), caspa (SANFILIPPO; ENGLISH, 2006) e dermatite seborreica (JOHNSON; NUNLEY, 2000).

O selênio também é importante para o bom funcionamento cerebral. Ratos Wistar induzidos a doença de Alzheimer pelo cloreto de alumínio ($AlCl_3$) e suplementados com selênio mostraram melhoras comportamentais, bioquímicas e histopatológicas sugerindo que este micronutriente ajudaria na profilaxia de doença de Alzheimer (LAKSHMI; SUDHAKAR; PRAKASH, 2015).

Este micronutriente também influencia em sintomas de depressão e humor negativo em indivíduos adultos. Concentrações do selênio no soro sanguíneo de 978 indivíduos foram avaliadas e observou-se que concentrações muito baixas ou muito elevadas deste micronutriente foram associados a sintomatologia depressiva e humor negativo (CONNER; RICHARDSON; MILLER, 2015).

A atividade anticâncer também vem sendo estudada com este elemento, Yang et al (2009) demonstraram que camundongos inoculados com a linhagem carcinoma colorretal humano (SW480), apresentaram inibição significativa do tumor quando tratados com selenito de sódio e SeMet. Entretanto, o mecanismo de ação do selênio para essa propriedade não é totalmente compreendido, sendo propostos vários mecanismos entre eles: proteção antioxidante, modulação da proliferação de células (do ciclo celular e apoptose), inibição da invasão de células tumorais e inibição da angiogênese (ZENG; COMBS Jr, 2008).

Behne et al (1996), avaliaram até a 4ª geração de ratos o desenvolvimento dos testículos em relação a baixa suplementação de selênio, no qual observaram que a deficiência desse elemento ocasionou um atraso de crescimento dos testículos, levando à atrofiação, em que os túbulos seminíferos foram consideravelmente reduzidos em diâmetro. Esses dados

sugerem que o selênio influencia na morfologia e função do desenvolvimento dos testículos. Hawkes e Turek (2001) avaliaram o sêmen de 11 homens saudáveis durante 120 dias. Dentre esses dias, ocorreu a suplementação de selênio em diferentes doses e o plasma seminal foi avaliado. Observaram que a fração de espermatozoides móveis e a concentração de selênio no plasma seminal diminuíram proporcionalmente, concluindo assim que o nível de selênio pode influenciar na fertilidade do homem.

Entretanto, grande parte dessas propriedades descritas acima, está relacionada principalmente à sua atividade antioxidante visto que o selênio é um constituinte de enzimas antioxidantes da célula (BURK, 2002; RAYMAN, 2000) e o estresse oxidativo pode desenvolver diversas doenças.

2.5 Efeito protetor do selenito de sódio

A atividade protetora do composto selênio é dependente de sua dose e forma química, sendo o selenito de sódio, L-selenometionina e selênio-metil-L selenocisteína eficientes formas de selênio contra agentes causadores de danos celulares. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que as concentrações desse elemento interferem em suas ações sendo que algumas doses de selênio exercem atividade citotóxica, por produção de radicais livres, induzindo parada de ciclo celular e apoptose via mitocondrial enquanto que outros estudos demonstram que exercem atividade antioxidante (LI et al., 2013; STOKEL, 2013; DRAKE, 2006).

O efeito do selenito de sódio (30 nM) e SeMet (10 µM) contra os danos causados pela radiação UVA, UVC, H₂O₂ e MMS foi demonstrado em linhagem de adenocarcinoma de próstata humana (LNCaP), no qual, o pré-tratamento por 72 horas dessas formas de selênio exerceram citoproteção e antigenotoxicidade principalmente contra a UVA (25 J/cm²) e H₂O₂ (200 µM) que possui como mecanismo de ação a formação de EROs. Essa proteção foi exercida pelo aumento da síntese de GPX1 e TrxR e pelo aumento da atividade de reparação do DNA (reparação de 8-oxoG). Neste trabalho, os autores concluíram que o selenito de sódio foi 300 vezes mais eficiente na proteção em relação a SeMet (ROSA et al., 2012).

A atividade antimutagênica do selenito de sódio (0,5 µM) também foi verificada na linhagem celular V79 de Hamster exposta a azoximetano, metilmetanosulfonato (MMS) e H₂O₂. Além disso, observou-se que o selenito de sódio induziu a atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase e catalase (BRONZETTI et al., 2003).

Abdullaev et al (2005) avaliaram o efeito do selenito de sódio (10 a 200 μM) quanto a citotoxicidade nas linhagens de células humanas CCD-18Lu, HeLa, A204 e HepG2 mostrando que esse elemento não teve efeitos citotóxico nas linhagens não tumorais, entretanto inibiu a formação de colônias nas linhagens tumorais. Além disso, foi observado atividade antimutagênica do selenito de sódio (672 $\mu\text{g/placa}$) contra o benzo[a]pireno no teste de AMES em *Salmonella typhimurium* TA98

Os efeitos protetores do selenito de sódio e SeMet (1 e 2 mg/Kg) contra danos ao DNA causado pela doxorubicina (DXR, 90 mg/Kg) em ratos Wistar foram observados através dos ensaios Micronúcleo (MN) e Cometa. Os animais foram suplementados durante 10 dias consecutivos com as duas formas de selênio e receberam uma única dose intraperitoneal de DXR. Além disso, observou-se aumento na concentração da glutathiona no sangue desses animais. Também se observou que os tratamentos nas mesmas doses dos compostos selênio apresentaram um padrão semelhante de quimioproteção (SANTOS et al., 2007).

Geyikoglu e Türkez (2005) observaram o efeito do selenito de sódio e aflatoxina B1 em linfócitos humano (WBC) quanto à sua ação genotóxica. Os autores observaram que somente a aflatoxina B1 (5 e 10 μM) induziu o aumento da frequência de trocas de cromátides irmãs, entretanto, quando associado ambos os agentes químicos, ocorreu a diminuição deste. Concluindo-se que o selenito de sódio (0,5 μM) não possuiu atividade genotóxica nestas condições e quando associado com a aflatoxina B1 exerceu um efeito antigenotóxico sobre a ação da aflatoxina B1.

O selenito de sódio também exerceu antigenotoxicidade contra o arsênito de sódio em ratos suíços. Os dois compostos foram administrados tanto só, associados ao mesmo tempo ou em tempos diferentes e somente o arsênito de sódio (2,5 mg/Kg) induziu significativas aberrações quando administrado só, já quando administrado o selenito de sódio (5,6 mg/Kg) antes do arsênito de sódio, ocorreu redução significativa de aberrações cromossômicas (BISWAS; TALUKDER; SHARMA, 1999).

Wang et al (2015) também observaram ação protetora do selenito de sódio quanto aos danos induzido pelo arsenito de sódio nas linhagens celulares NB4 e APL (linhagem primária). Neste estudo, observaram que concentrações baixas de selenito de sódio (1 μM) protegeu as células contra apoptose (via intrínseca), parada de ciclo celular, estresse oxidativo, diferenciação celular, e expressão de alguns genes apoptóticos induzidos pelo

arsenito de sódio (2 e 5 μM). Entretanto, dose alta de selenito de sódio (4 μM) exerceu efeitos sinérgicos com relação ao arsenito de sódio.

Células MCF-7 suplementadas por 3 dias com 30 nM de selenito de sódio e posteriormente expostas a 12 J/m^2 UV exibiram diminuição significativa de MN e um aumento na atividade enzimática de GPX1. Também foi evidenciado uma proteção contra a mutagenicidade da radiação UV em células Big Blue, células transfectadas com vetores que possuem genes marcadores de mutagenicidade (BALIGA et al., 2007).

3. JUSTIFICATIVA

O estresse oxidativo é um dos principais mecanismos para o surgimento de doenças que são consideradas como as principais causadoras de morte no mundo, tais como doenças isquêmicas, hipertensão, cânceres entre outros. Muitas vezes, o estresse oxidativo e posteriormente o surgimento destas doenças estão ligadas ao cotidiano dos indivíduos como a alimentação, ambiente e hábitos como o tabagismo e consumo excessivo de álcool.

Neste contexto, muitos trabalhos são realizados para avaliar compostos que podem minimizar os efeitos oxidativos, destacando-se os compostos utilizados na alimentação e que possuem atividade antioxidante.

Estudos indicam que várias formas do micronutriente selênio apresentam efeitos protetores contra agentes mutagênicos e genotóxicos devido a sua relação com o sistema de defesa antioxidante das células. Neste aspecto, destaca-se a forma inorgânica selenito de sódio, que já tem demonstrado maior efetividade de proteção em relação às outras formas (WANG et al., 2015; ROSA et al., 2012; BALIGA et al., 2007). No entanto, a sua capacidade citoprotetora e antígeno-tóxica correlacionada com a avaliação de expressão gênica e proteica ainda necessita ser melhor compreendida.

Considerando a importância de mais compreensão sobre os mecanismos moleculares pelos quais este elemento atua no organismo humano e as novas metodologias disponíveis para essa verificação, faz-se necessário à realização dessas investigações para contribuir com o possível uso suplementar desta substância na dieta humana.

4. OBJETIVOS

Verificar o efeito do selenito de sódio contra os danos causados pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela avaliação da citotoxicidade, cinética de proliferação celular, fases do ciclo celular, danos no DNA e expressão de transcritos relacionados ao sistema de defesa antioxidante, parada de ciclo celular e danos de DNA e expressão de proteínas relacionado ao sistema de defesa antioxidante em células de carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A).

4.1 Objetivo Específico

- Avaliar, no Ensaio de Citotoxicidade (MTT), os efeitos citotóxicos do selenito de sódio (20 e 200 nM) e o efeito citoprotetor do mesmo frente ao estresse oxidativo ocasionado pelo peróxido de hidrogênio (300 μ M) em células HepG2/C3A;
- Analisar a cinética de proliferação celular em tempo real de células HepG2/C3A pré-tratadas com selenito de sódio (20 e 200 nM) e posteriormente induzidas ao estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio (300 μ M), utilizando o Ensaio de Proliferação Celular em Tempo Real, através do aparelho RTCA *xCELLigence*;
- Avaliar o perfil do ciclo celular em células HepG2/C3A quando pré-tratadas com selenito de sódio (20 e 200 nM) e posteriormente induzidas ao estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio (300 μ M), através da citometria de fluxo;
- Avaliar, através do ensaio do cometa, os efeitos genotóxicos do selenito de sódio (200 nM) e o efeito antígenotóxicos do mesmo frente ao estresse oxidativo ocasionado pelo peróxido de hidrogênio (300 μ M) em células HepG2/C3A;
- Avaliar a expressão dos genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante, ciclo celular e danos no DNA em células HepG2/C3A, quando pré-tratadas com selenito de sódio (200 nM) e posteriormente induzidas ao estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio (300 μ M), através do ensaio RT-qPCR;
- Avaliar a expressão proteica relacionados ao sistema de defesa antioxidante em células HepG2/C3A, quando pré-tratadas com selenito de sódio (200 nM) e posteriormente induzidas ao estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio (300 μ M), através do sistema LUMINEX (MAGPIX);
- Verificar possíveis correlações entre a suplementação do Selenito de Sódio e peróxido de hidrogênio.

5. ARTIGO

Artigo a ser submetido à revista **Mutation Research- Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**

Alterações causadas pelo Selenito de Sódio e H₂O₂ em mRNAs e proteínas de defesa antioxidante relacionadas ao ciclo celular e danos de DNA

Thalita Alves Zanetti¹; Bruna Isabela Biazi¹; Adrivanio Baranoski¹; Gláucia Fernanda Rocha D'Epiro¹; Amanda Cristina Corveloni¹, Simone Cristine Semprebon¹, Giuliana Castello Coatti²; Mário Sérgio Mantovani¹.

1. Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

2. Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo/SP

*Autor correspondente: Thalita Alves Zanetti

E-mail: tah_zanetti91@hotmail.com

Departamento de Biologia Geral – CCB

Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário

P.O. Box 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

Tel: +55 43 3371-4977

RESUMO

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) estão envolvidas em vários processos patológicos. Os efeitos das EROs são minimizados no organismo por compostos com atividade antioxidante como o Selênio. Este micronutriente é importante para a saúde humana, pois é um constituinte das principais enzimas do sistema de defesa antioxidante. O Selenito de Sódio (SS) é uma forma inorgânica de selênio e fonte de selênio para o corpo, entretanto sua capacidade protetora precisa ser melhor esclarecida. Por isso, o estudo investigou o efeito do SS contra o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em células HepG2/C3A analisando citotoxicidade e proliferação celular comparando com dados moleculares (expressão de mRNAs e proteínas). O SS apresentou atividade citoprotetora e antígeno-tóxica, entretanto, não foi observado alteração na curva de proliferação celular e nas fases de ciclo celular (retenção em G2/M) nos tratamentos associados (SS+ H_2O_2) quando comparado com H_2O_2 , mostrando que nestes ensaios o SS não apresentou proteção na progressão do ciclo celular. O SS modulou o sistema de defesa antioxidante nas células induzidas ao estresse oxidativo pelo H_2O_2 , onde observou-se um aumento da expressão relativa do mRNA *GPX1* no tratamento associado mostrando resposta antioxidante. Além disso, alterações do mRNA *CAT* e proteína SOD1 e PRX2 pelo H_2O_2 , foram minimizadas pelo tratamento associado também. Observou-se a normalização dos níveis do mRNA *CCN2B* nos tratamentos associados, entretanto, esse efeito não foi evidenciado na expressão dos outros genes controladores de ciclo celular, onde observou-se aumento na expressão dos mRNAs *CDKN1A*, *CDKN1C*, *CDKN2B* e *GADD45A* nos tratamentos com H_2O_2 independente de SS. Desta maneira, nossos resultados demonstram que a proteção do SS se deve pela modulação do sistema de defesa antioxidante, entretanto este efeito não foi eficiente ao ponto de modular a expressão de genes que controlam o ciclo celular impedindo a continuidade do crescimento celular.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, citoproteção, antígeno-tóxico.

5.1 Introdução

Espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas em reações no sistema biológico que podem iniciar vários processos patológicos como aterosclerose, hipertensão, doenças isquêmicas, doença de Alzheimer, Parkinson, cânceres e inflamação (TIWARI, 2001). Os efeitos das EROs no organismo variam, onde essas moléculas podem causar danos em lipídios, proteínas, DNA, RNA e outras biomoléculas, contribuindo para a disfunção de vários sistemas celulares e posteriormente induzindo as células a morte celular (apoptose e necrose) ou bloqueio ciclo celular (HELD, 2015).

Estudos têm demonstrado que o H_2O_2 , o principal gerador de estresse oxidativo em ensaios *in vitro*, ocasiona o bloqueio do ciclo celular, através da modulação da formação dos complexos ciclina/quinase dependente de ciclina (CDK) e dos inibidores de CDK que por vez são os principais reguladores do ciclo celular (LI et al., 2009; SEOMUN et al., 2005; BARNOUIN et al., 2002).

Os efeitos das EROs nas células podem ser minimizados por alguns compostos com atividades antioxidantes que muitas vezes são encontrados em alimentos. O elemento selênio, um micronutriente essencial, é importante para a saúde humana pois têm demonstrado potencial anti-inflamatório (LEITE et al., 2015), antifúngico (CHEN et al., 2010; SANFILIPPO; ENGLISH, 2006), anticâncer (YANG et al., 2009) e antioxidante. É encontrado na natureza através das formas orgânicas, como os aminoácidos selenometionina (SeMet) e selenocisteínas (SeCys) ou formas inorgânicas, como selenito e selenato, onde as principais fontes de suplemento desse micronutriente são a castanha-do-brasil e rim bovino (NAVARRO-ALARCON; VIQUE, 2008).

Em mamíferos, esse micronutriente é absorvido pelo organismo e incorporado em cadeias polipeptídicas através das formas SeMet e SeCys (PAPP; HOLMGREN; KHANNA, 2007). As formas orgânicas e inorgânicas de selênio quando ingeridas, são reduzidas a seleneto de hidrogênio (H_2Se). Este metabólito é importante para a formação da SeCys que será inserida nas proteínas em resposta ao códon UGA (PAPP; HOLMGREN; KHANNA, 2007). Proteínas que recebem o SeCys em suas cadeias polipeptídicas são chamados de selenoproteínas e atualmente já foram encontrados 25 genes que codificam selenoproteína em humanos (LABUNSKYY; HATFIELD; GLADYSHEV, 2014), no qual destaca-se muitos genes que codificam proteínas que compõe o sistema de defesa antioxidante como a Glutathione peroxidase (GPx) (COMINETTI; COZZOLINO, 2009), Tioredoxina redutase (TrxR) (KOHÁRYOVÁ; KOLLÁROVÁ, 2008) e a família de Selenoproteínas (LIU; ROZOVSKY, 2015).

Por ser um constituinte importantes de proteínas do sistema de defesa antioxidante celular, estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que este micronutriente pode minimizar os efeitos citotóxicos e genotóxicos de muitos agentes que são utilizados no cotidiano, como arsenito de sódio (BISWAS; TALUKDER; SHARMA, 1999), azoximetano, metilmetanosulfonato, (BRONZETTI et al., 2003), H_2O_2 (ZANELATTO, et al., 2013; BRONZETTI et al., 2003), benzo[a]pireno (ABDULLAEV et al., 2005), aflatoxina B₁ (GEYIKOGLU; TURKEY, 2005), radiação UV (BALIGA et al., 2007), doxorubicina (SANTOS et al., 2007), diazinon (SHOKRZADEH et al., 2013), radiação γ (CHAURASIA et al., 2014), di(2-etilhexil) ftalato (ERKEKOGLU et al., 2012).

Muitos trabalhos têm utilizado as linhagens de carcinoma hepatocelular como modelo *in vitro* para a avaliação de compostos com atividade protetora contra o estresse oxidativo (MARTIN et al., 2010; CUELLO et al., 2007). A linhagem HepG2/C3A, por

exemplo é um modelo *in vitro* bem estabelecidos e possui funções específicas do fígado, como a capacidade de expressar enzimas do metabolismo de xenobióticos em níveis próximos aos encontrados em hepatócitos primários, sendo assim, amplamente utilizadas em estudos de toxicologia (KELLY, 1994).

Para a avaliação do comportamento de culturas celulares quanto ao seu padrão de crescimento, estado metabólico e morte assim como identificar alvos biológicos, ensaio clássicos junto com técnicas moleculares são realizados (MIGITA, 2012). A citometria de fluxo é uma poderosa tecnologia utilizada atualmente nos estudos de drogas potencialmente terapêuticas no qual, caracteriza populações de células quanto a danos no DNA, regulação do ciclo celular, morte celular, estresse oxidativo entre outros parâmetros em um curto espaço de tempo. Contribuindo com esta análise, a expressão de mRNAs e proteínas estão entre os métodos mais utilizado pela biologia moderna. Essas análises fornecem dados muito poderosos, pois contribui para um melhor entendimento das vias de sinalização e leva a identificação de genes relevante nos processos biológicos, que por vez, são influenciados pelos compostos em análise (ELESPURU et al., 2009).

O selenito de sódio é uma forma inorgânica e fonte de selênio para o corpo, o qual já demonstrou maior efetividade de proteção quando comparado com outras formas de selênio (ROSA et al., 2012), no entanto, a sua capacidade citoprotetora e antígeno-tóxica correlacionada com a avaliação de expressão gênica e proteica ainda necessita ser melhor esclarecidas. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito protetor do selenito de sódio contra os danos causados pelo H_2O_2 na progressão do ciclo celular e danos no DNA correlacionando com a expressão de transcritos do sistema de defesa antioxidante (*CAT* e *GPX1*), parada de ciclo celular (*CCNB2*, *CDKN1A*, *CDKN1C*, *CDKN2B*) e danos de DNA (*GADD45A*) e expressão das proteínas do sistema de defesa antioxidante (Catalase, SOD1, SOD2, PRX2, TRX1) em células de carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A).

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Delineamento Experimental

Foi utilizado como modelo *in vitro* a linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2/C3A) obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em frascos para cultura de 25 cm² com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's*

Medium. Gibco, CAT. 12800-017) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco, CAT. 12657-029) e 0,1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). As células foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Nestas condições, o ciclo celular é de aproximadamente 24 horas.

As células após semeadas foram pré-tratadas com meio contendo Selenito de Sódio (Na₂SeO₃, (SS) Sigma, CAS: 10102-18-8) nas concentrações de 20 e/ou 200 nM por 24 horas. Após o pré-tratamento, as células foram induzidas ao estresse oxidativo através da co-incubação com 300 µM peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Sigma, CAS: 7722-84-1) diluído em PBS (tampão fosfato salino), por 2 horas. Posteriormente, foi removido os tratamentos, adicionado meio fresco sem tratamento e aguardado 0, 4, 10, 22 ou 94 horas de recuperação celular de acordo com o ensaio realizado (**Figura 1**). Os controles receberam meio e/ou PBS como tratamento. Todos os experimentos seguiram o mesmo protocolo de tratamento.

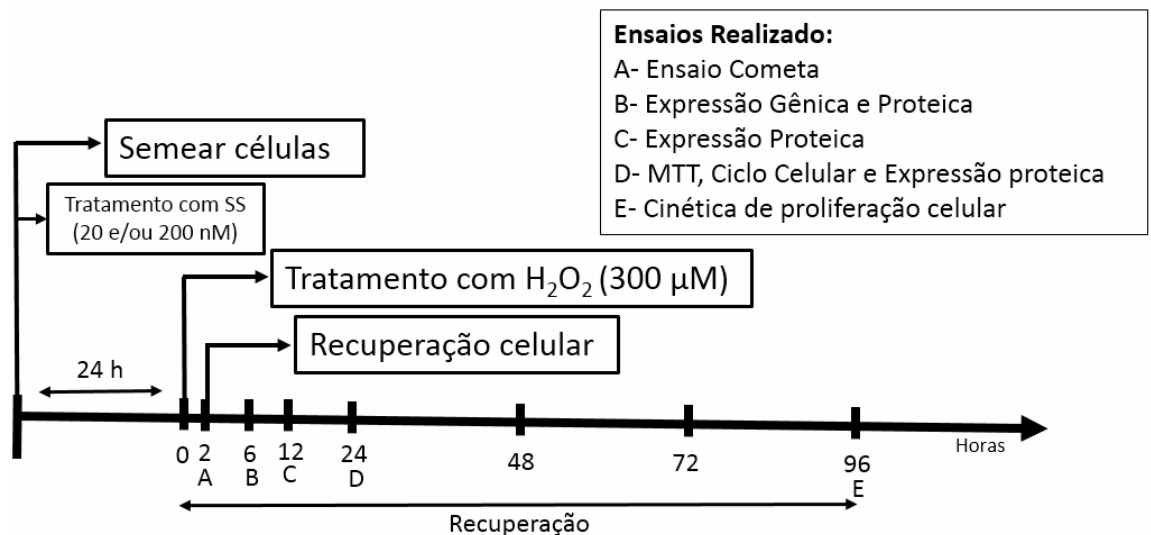


Figura 1. Representação dos protocolos de tratamentos e seus respectivos tempos nos diferentes ensaios.

5.2.2 Ensaio de Citotoxicidade – MTT

Para a avaliação da viabilidade celular através do estado de metabolização celular, o ensaio colorimétrico MTT (MOSMANN, 1983) foi realizado com algumas modificações. Em placas de 96 poços, 10⁴ células foram semeadas em cada poço. Em seguida, os poços foram tratados com SS e H₂O₂ conforme o delineamento experimental (**Figura 1**). Após a recuperação celular, 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 brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-

2-il)-2,5-Difeniltetrazólio (CAS 298931; Sigma Aldrich®) (MTT) a 0,25 µg/mL por 4 horas. Foi retirado o sobrenadante e os cristais de Formazan formados foram diluídos em 200 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido) para a leitura em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 540 nm. Os dados foram apresentados com percentuais de viabilidade celular que foram obtidos através do seguinte cálculo: $((\text{Absorbância Média de Tratamento} * 100) / \text{Absorbância Média de Controle})$. Os experimentos foram realizados em três repetições e os tratamentos em seis replicatas (poços) por experimento.

5.2.3 *Análise da proliferação celular em tempo real pelo sistema xCELLigence*

Através do aparelho *xCELLigence RTCA SP– Real Time Cell Analyzer* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) investigou-se o padrão de crescimento celular (curva de crescimento) através da leitura de impedância elétrica captadas por sistema de sensores de ouro presentes no fundo dos poços da placa de leitura (E-Plate, ROCHE). Alterações no status biológicos (número de células, morfologia e adesão celular) alteram os valores de impedância, os quais são expressos em Índice Celular (IC). O teste foi realizado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, resumido a seguir: Em placa de 96 poços (E-Plate), foi realizado inicialmente o *background* com 50 µL de meio de cultura com os tratamentos de SS para o aparelho identificar a menor impedância. Posteriormente cada poço, recebeu 100 µL de meio de cultura contendo 10^4 células e os tratamentos seguiram como o delineamento experimental (**Figura 1**). A placa permaneceu na *RTCA Station* durante todo o experimento para o monitoramento em tempo real, que foi realizado em intervalos de 30 minutos. O experimento foi realizado em quatro repetições com três replicatas (poços) por tratamento.

5.2.4 *Análise de Ciclo Celular por Citometria de Fluxo*

Através do aparelho Citômetro de Fluxo Guava easyCyte™ (Merck Millipore) foi avaliado a cinética de ciclo celular. Neste ensaio o conteúdo de DNA das células coradas com iodeto de propídio foram distribuídos em porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo (G1, S e G2/M) de acordo com a intensidade de fluorescência. Em placa de 6 poços um total de $2,67 \times 10^5$ células foram adicionadas em cada poço. Em seguida, os poços foram tratados

com SS e H₂O₂ (**Figura 1**). Após a recuperação celular, as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm por 5 min, ressuspensas em 200 µL de PBS e incubadas com 5 µL de RNase (2 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) protegidos da luz. Após esses procedimentos, as amostras foram analisadas pelo citômetro de fluxo utilizando o *Software CellCycle* com 5 mil eventos por tratamento. A avaliação de ciclo celular foi realizada em três repetições experimentais.

5.2.5 *Ensaio do Cometa*

Para a avaliação de genotoxicidade foi utilizado o Ensaio do Cometa (COLLINS et al., 2008). Um total de $2,67 \times 10^5$ células foi adicionado em poços de placas de 6 poços. Em seguida, os poços foram tratados com SS e H₂O₂ (**Figura 1**). Neste ensaio utilizou-se somente a maior concentração de selenito de sódio (200 nM). Logo após a co-incubação com H₂O₂ as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm por 5 min e ressuspensas. Em seguida, foram suspensas em agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point* – 0,5%) e distribuídas em lâminas pré-gelatinizadas com agarose comum a 1,5%. As células foram lisadas (NaCl 2,225 M, EDTA-titriplex 89 mM e Tris 8,9 mM) por 60 min à 4 ° C e submetidas a condições alcalinas (EDTA-titriplex 1 mM e NaOH 0,3 N) por 20 minutos. As lâminas foram levadas à eletroforese que foi realizada em pH>13, 25 V, 300 mA durante 20 minutos. Após isso, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 N e pH 7,5 corrigido com HCl) e fixadas em álcool absolutos, secadas e mantidas a 4 °C para posterior coloração. Para análise, as lâminas foram coradas com 100 µL de brometo de etídio (2 µg/mL) e analisadas 100 células por lâmina, sendo 2 lâminas por tratamentos e três repetições experimentais. As imagens foram obtidas através do Microscópio EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher) com aumento de 200X. As imagens (cometas) foram analisadas no programa CometScore[®], com o intuito de avaliar os parâmetros: “*Comet Length*” (Tamanho total do cometa) e “*Tail Moment*” (% de DNA presente na cauda multiplicado pelo tamanho da cauda do cometa).

5.2.6 Expressão Gênica

A RT-qPCR foi utilizada para analisar alterações na expressão relativa de genes relacionado ao sistema de defesa antioxidante, ciclo celular e danos de DNA. Um total de $7,5 \times 10^5$ células foi adicionado em frascos de cultura (25 cm^2). Em seguida, os tratamentos foram realizados e após o tempo de recuperação (**Figura 1**) o meio foi retirado e o RNA total foi extraído utilizando lise por Trizol LS (cat. N° 10296010, Thermo Fisher) associado ao RNeasy® Mini Kit (cat. N° 74106, Qiagen), seguindo as especificações do fabricante. O RNA total foi estocado em freezer de -80°C para posterior utilização. Posteriormente, uma parte da amostra foi encaminhada para leitura em espectrofotômetro (BioDrop μ Lite, *BioDrop*) para quantificação e avaliação da pureza de RNA total sendo a razão ($A_{260/280\text{nm}}$) obtida entre 1,8 e 2 e sua integridade foi verificada em gel de agarose 0,8 %. Três repetições experimentais foram realizadas. A síntese de cDNA foi realizada em termociclador T100™ *Thermal Cycler* BIO-RAD, onde 1000 ng de RNA foi diluído em H_2O DEPC (volume de 12,4 μL), 1 μL de oligo dT (10 pmd/mL, Invitrogen – *Life Technologies*) e 2 μL de dNTPs (2,5 mM, Invitrogen – *Life Technologies*) e mantidas por 15 minutos a 60°C . Em seguida, foi adicionado em gelo, adicionado 4 μL de 5X First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2 e 100 mM, Invitrogen – *Life Technologies*) aguardado 2 minutos a temperatura ambiente e adicionado 0,1 μL de RNA out e 0,5 μL de enzima transcriptase reversa (M-MLV – Invitrogen, *Life Technologies*) por amostra, as quais foram mantidas por $37^\circ \text{C}/50'$, $70^\circ \text{C}/15'$ e a etapa final à 10°C .

Para PCR em tempo real foi utilizado 5 μL de *Platinum SYBER Green* qPCR Supermix-UDG (cat. N° 172-5260 Bio-Rad), 0,5 μL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol) e 5 μL de cDNA de cada amostra (250 ng).

As reações de qPCR foram realizadas nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos e 45 ciclos de $95^\circ \text{C}/20$ segundo, $60^\circ \text{C}/30$ segundos, $72^\circ \text{C}/20$ segundos no aparelho *StepOnePlus Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*). A análise da curva de *Melting* foi realizada no final de cada reação com temperatura de 50°C a 90°C a cada 0,5 graus por 20 segundos. Os genes utilizados estão relacionados ao sistema de defesa antioxidante (*CAT* e *GPX1*), ciclo celular (*CCN2B*, *CDKN1A*, *CDKN1C* e *CDKN2B*) e danos de DNA (*GADD45A*) e foram comparados com a expressão do gene normalizador *ACTB* (**Tabela 5**). A eficiência dos oligonucleotídeos foi calculada pelo programa *LinRegPCR*, versão 2013.1.

5.2.7 *Análise de proteína*

Através do equipamento MAGPIX® *System* foi avaliada alterações nas concentrações de proteínas relacionada ao sistema de defesa antioxidante. O ensaio é baseado na tecnologia LUMINEX xMAP® no qual envolve a utilização de microesferas magnéticas revestidas com anticorpos de captura no qual os analitos se ligam, um segundo anticorpo de detecção se liga ao analito formando um “sanduíche” de anticorpos e analito. Um marcador fluorescente (Estreptavidina-Ficoeritrina (PE)) liga-se ao anticorpo de detecção que posteriormente é detectado pelo aparelho. As células foram processadas seguindo o protocolo do MILLIPLEX®_{MAP} Kit *Human Oxidative Stress Magnetic Bead Panel* (Cat. H0XSTMAG-18K) utilizando o programa *xPONENT 4.2*. Este kit consiste na análise das proteínas catalase, PRX2 (Peroxirredoxina 2), SOD 1 (Superoxido dismutase 1 - Cu/Zn-SOD1), SOD2 (Superoxido dismutase 2 – MnSOD) e TRX1 (Tioredoxina 1). O experimento foi realizado em 3 tempos de recuperação celular (6, 12 e 24 horas), com três repetições experimentais e duplicatas por tratamento.

5.2.8 *Análise Estatística*

Os resultados obtidos nos ensaios de MTT, RTCA e proteína foram comparados por ANOVA seguida de Dunnet ($p < 0,05$). O Ensaio Cometa foi analisado pelo Programa CometScore® e a média dos valores foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnet ($p < 0,05$). A análise de Ciclo Celular foi comparada por Kruskal-Wallis seguida de Dunn ($p < 0,05$). Essas análises estatísticas foram realizadas através do programa *GraphPad Prism 5*.

A análise dos dados de expressão gênica foi realizada com o método *Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test* inserido no programa *Rest 2009* (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002) tendo significância estatística estabelecida em $p < 0,05$. Sendo considerado significativo com diferença estatística significativa pelo *Rest* e fator de expressão (Fold change-razão) acima/a baixo de 2 vezes.

5.3 Resultados

5.3.1 *Ensaio de citotoxicidade – MTT*

As doses e método de tratamento utilizados no presente estudo foram previamente determinadas através do ensaio MTT. O ensaio de viabilidade celular mostrou que o SS não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas onde os valores ficaram acima de 96 %. A exposição das células ao H_2O_2 causou uma redução significativa da viabilidade celular (66,44 %). Nos tratamentos associados (SS+ H_2O_2), observou-se que ambas as concentrações de SS aumentaram de forma significativa a viabilidade celular quando comparada com o tratamento com o H_2O_2 , onde as mesmas apresentaram viabilidade de 82,7 e 84,6 % respectivamente, demonstrando citoproteção (**Figura 2**).

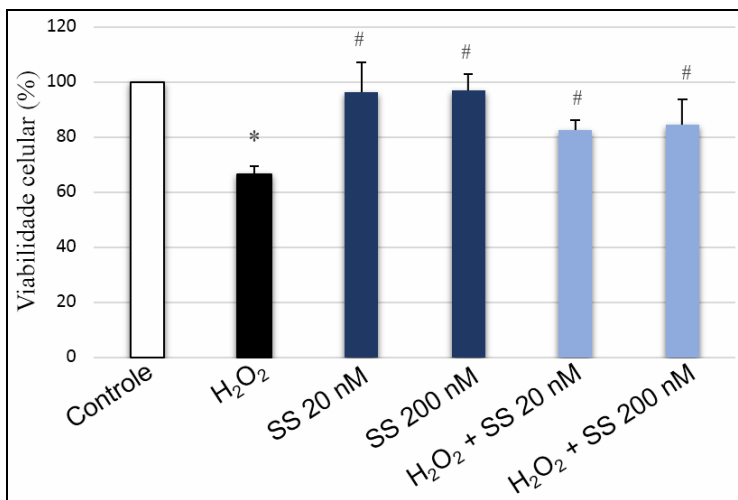


Figura 2. Valores de viabilidade celular da linhagem HepG2/C3A após tratamentos com H_2O_2 e/ou SS. (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle sem tratamento, $p < 0,05$; (#) Estatisticamente significativo em relação ao H_2O_2 , $p < 0,05$.

5.3.2 Cinética de Proliferação celular em tempo real (RTCA)

A avaliação da cinética de proliferação celular realizada pelo RTCA (**Figura 3**), mostrou que no período de recuperação celular as curvas de crescimento do tratamento com H_2O_2 apresentou menores Índice Celular (IC) quando comparado com o controle. Além disso, os tratamentos com SS apresentaram um pequeno aumento do IC quando comparado com o controle, porém não significativo. Esse efeito também foi evidenciado nos tratamentos de forma associada (SS+ H_2O_2) quando comparados com o tratamento somente com o H_2O .

Após 48 horas de recuperação celular observou-se que o IC do tratamento com o H_2O_2 manteve-se basicamente o mesmo até o final do experimento. Esse padrão de curva de crescimento celular também foi observado nos tratamentos associados (SS+ H_2O_2) até o fim do experimento.

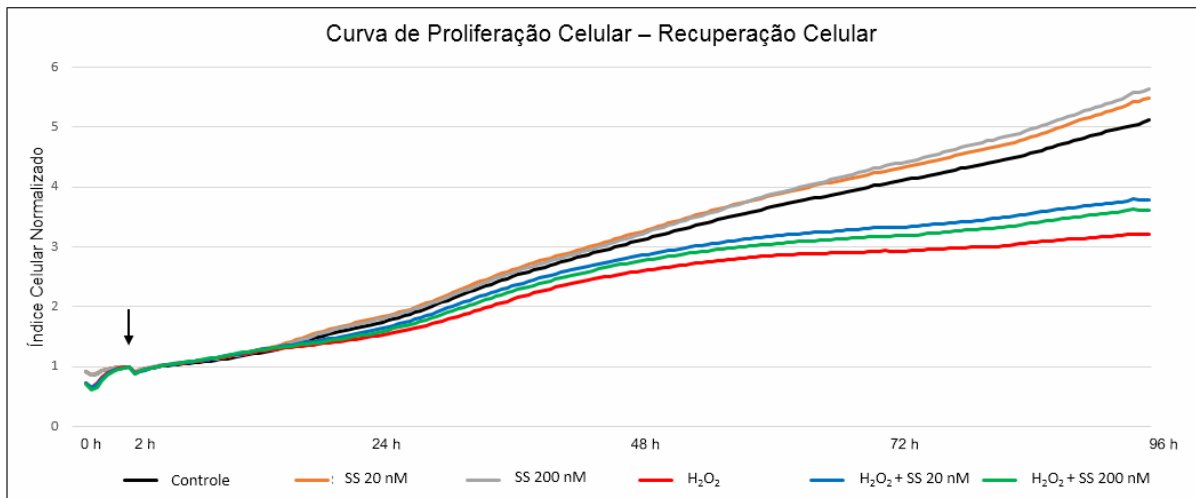


Figura 3. Curva de Proliferação Celular da linhagem HepG2/C3A, após tratamento com H₂O₂ e/ou SS. A seta no gráfico refere-se à normalização dos dados após o tratamento com H₂O₂.

5.3.3 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

Na análise de ciclo celular, observou-se que os tratamentos somente com SS mantiveram a distribuição normal do ciclo celular, pois não diferiram do controle. Entretanto, foi observado uma redução significativa na fase G1 e um aumento na fase G2/M em todos os tratamentos com o H₂O₂, independente do pré-tratamento com o SS (**Figura 4**).

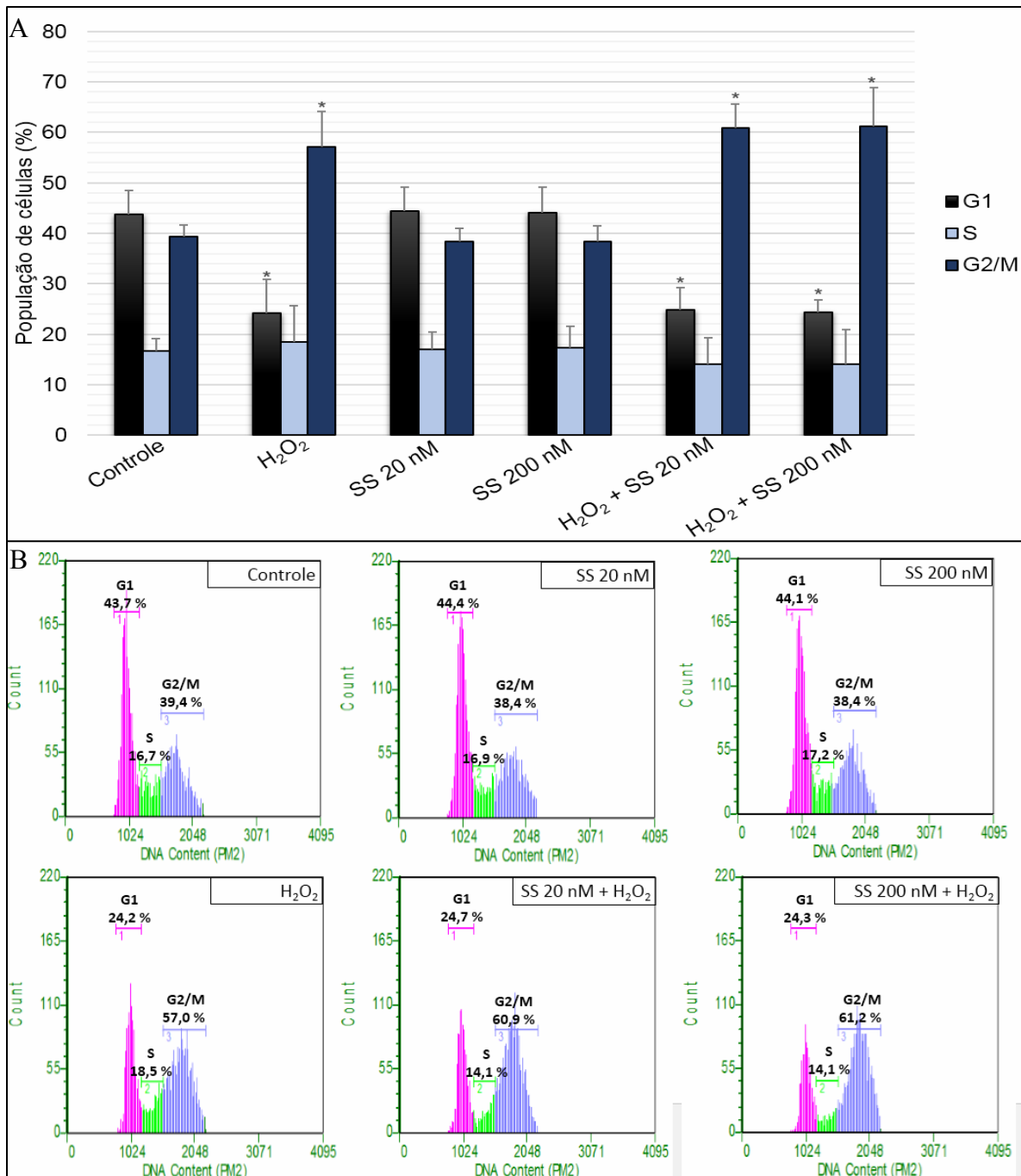


Figura 4. Análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (PI). A) Distribuição da população de células HepG2/C3A nas fases do ciclo (G1, S e G2/M) tratadas com SS e H₂O₂; (*) p<0,05, comparado ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett. B) Representação dos histogramas apresentado pelo programa *GuavaSoft 2.7*. Na imagem evidencia-se as populações G1 (rosa), S (verde) e G2/M (azul). Gráficos representativos de uma repetição cujo resultado foi similar com os demais.

5.3.4 Ensaio do Cometa

A **Figura 5** apresenta os resultados da avaliação dos cometas após os tratamentos com SS e/ou H₂O₂ através os parâmetros do *Comet Length* (a) e *Tail Moment* (b), ambos analisados pelo programa CometScore[®]. Observou-se que em ambos parâmetros analisados, o tratamento com SS não induziu a formação de cometas quando comparado com o controle. Um aumento significativo desses parâmetros foi evidenciado no tratamento com H₂O₂. Entretanto uma diminuição destes parâmetros foi observada nos tratamentos associados (H₂O₂+SS) quando comparado com o tratamento somente com H₂O₂ demonstrando assim, um efeito antigenotóxico.

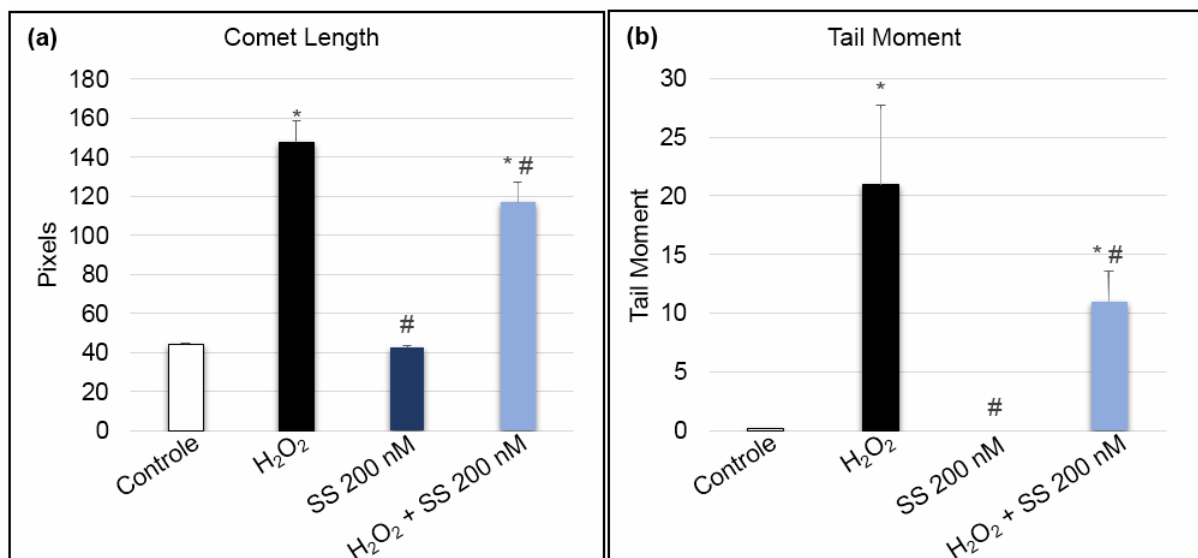


Figura 5. Valores médios de *Comet Length* (a) e *Tail Moment* (b) em células HepG2/C3A tratadas com H₂O₂ e/ou SS. (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle, $p < 0,05$; (#) Estatisticamente significativo em relação ao H₂O₂, $p < 0,05$.

5.3.5 Expressão Gênica

A **Figura 6** apresentam os resultados da expressão relativa por RT-qPCR para os genes de sistema de defesa antioxidante (*CAT* e *GPX1*), ciclo celular (*CCNB2*, *CDKN1A*, *CDKN1C* e *CDKN2B*) e de danos de DNA (*GADD45A*). Analisando os valores relativos de expressão normalizados com o gene de referência *ACTB*, observou-se que o gene *GPX1* teve sua expressão aumentada de forma significativa nos grupos tratados com SS+H₂O₂ (2,7 X). Diferente resposta foi observada para a expressão relativa do gene *CAT*, onde observou

diminuiu significativa no tratamento com H_2O_2 (-2,0 X). Por outro lado, a diminuição da expressão deste gene não foi significativa nos tratamentos associados.

Efeito semelhante foi encontrado na expressão do gene de ciclo celular *CCNB2*, onde verificou-se diminuição significativa dos transcritos no tratamento com H_2O_2 (-2,2 X) entretanto, essa diminuição não foi evidenciada no tratamento de forma associada também.

Observou-se que o tratamento com H_2O_2 aumentou de forma significativa a expressão dos genes de ciclo celular *CDKN1A* (6,0 X), *CDKN1C* (2,3 X) e *CDKN2B* (2,0 X) e danos de DNA *GADD45A* (4,0 X). Entretanto, o tratamento associado não alterou de maneira significativa a expressão relativa desses genes (*CDKN1A* (7,9 X), *CDKN1C* (2,1 X), *CDKN2B* (2,4 X) e *GADD45A* (3,1 X)).

Observou-se também que o tratamento com o SS diminuiu a expressão dos genes *CDKN1C* (-4,2 X) e *CDKN2B* (-2,0 X) de forma significativa quando comparado com o controle.

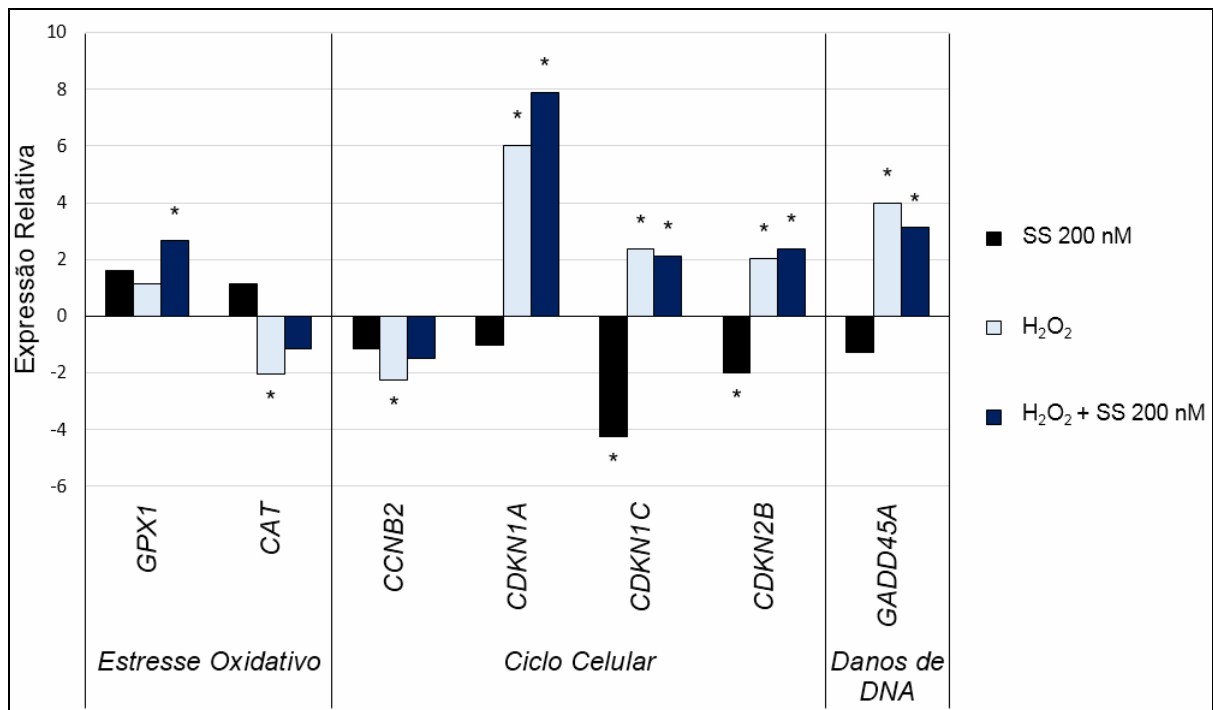


Figura 6. Expressão relativa dos genes de estresse oxidativo (*GPX1* e *CAT*), ciclo celular (*CCNB2*, *CDKN1A*, *CDKN1C* e *CDKN2B*) e danos de DNA (*GADD45A*) em células HepG2/C3A tratadas com SS e/ou H_2O_2 . (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle, $p < 0,05$.

5.3.6 *Análise de proteína*

A **figura 7** representa os níveis de expressão das proteínas catalase, SOD1, SOD2, TRX1 e PRX2 através dos valores de intensidade de fluorescência. Os dados obtidos mostraram que não houve alteração significativas nos níveis das proteínas SOD2, TRX1 e catalase em todos os tempos analisados. Observou-se que os níveis da proteína SOD1 no tratamento somente com o H₂O₂ na análise de 24 horas foram significativamente baixas em relação ao controle. Entretanto, o tratamento associado (SS+H₂O₂) obteve níveis significativamente maiores do que o tratamento com H₂O₂.

Os níveis de proteína PRX2 foi significativamente menor nos tratamentos somente com o H₂O₂ em todos os tempos analisados. Entretanto, a diminuição dos níveis desta proteína não foi significativa no tratamento associado (SS+H₂O₂) na análise de 6 horas de recuperação celular. Nos tratamentos associados nas análises de 12 e 24 horas os valores de intensidade de fluorescência ficaram próximo ao do tratamento com H₂O₂.

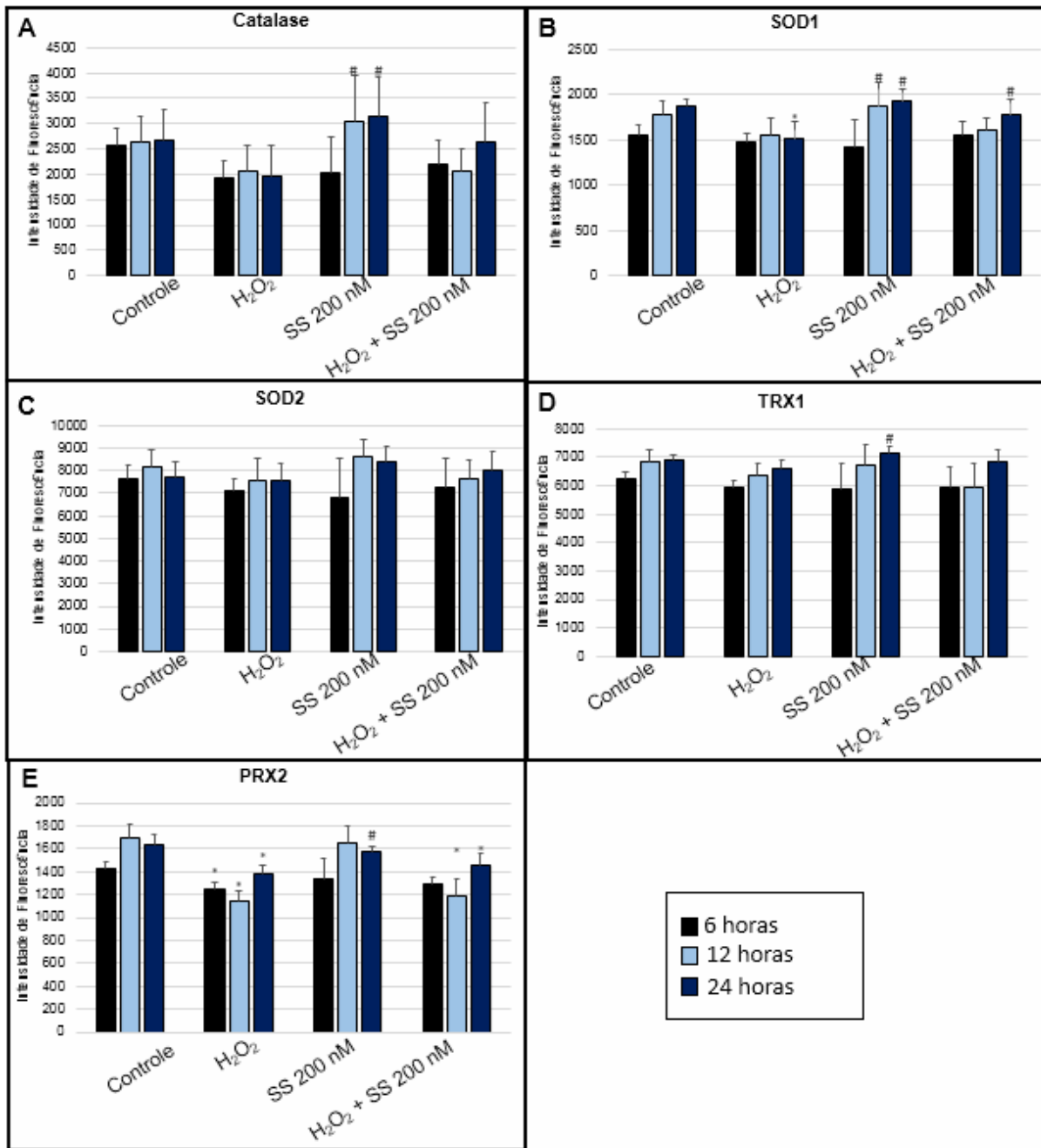


Figura 7. Expressão de proteína do sistema de defesa antioxidante em células HepG2/C3A tratada com SS e/ou H₂O₂ nos tempos de 6, 12 e 24 horas de recuperação celular. (SOD 1 (Superoxido dismutase 1 - Cu/Zn-SOD1), SOD2 (Superoxido dismutase 2 – MnSOD), PRX2 (Peroxirredoxina 2), TRX1 (Tioredoxina 1), PRX2 (Peroxirredoxina 2) e catalase). (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle, p<0,05; (#) Estatisticamente significativo em relação ao H₂O₂, p<0,05.

5.4 Discussão

A compreensão do papel de micronutrientes relacionado a saúde humana, prevenção e tratamentos de doenças vem crescendo constantemente. Destaca-se nestes estudos, a

atividade antioxidante que esses elementos-traço podem exercer no organismo (SHENKIN, 2006). A atividade antioxidante do selênio, por exemplo, aparenta ser responsável pela minimização do surgimento e progressão de doenças que possuem estresse oxidativo como processo central do seu desenvolvimento (LEITE et al., 2015; LAKSHMI; SUDHAKAR; PRAKASH, 2015; YANG et al., 2009).

Nós verificamos a ação do selenito de sódio (SS) em modelo experimental de indução de estresse oxidativo por H_2O_2 em células de carcinoma hepatocelular, correlacionando ciclo celular e expressão gênica e proteica na busca de pontos-chaves que ajudem a entender o papel protetor do selênio em células humanas. Observamos que apesar do SS exercer um papel citoprotetor e antígeno-tóxico, possivelmente por modular o sistema de defesa antioxidante, o mesmo não foi capaz de recuperar todos os danos causados pelo estresse oxidativo, evidenciado pela cinética de proliferação celular, ciclo celular e sinalização de genes controladores de ciclo e danos de DNA.

O presente estudo mostrou que o SS nas concentrações testadas (20 e 200 nM) não foi citotóxico. Já as células que foram induzidas ao estresse oxidativo pelo H_2O_2 apresentaram uma diminuição da viabilidade celular. O pré-tratamento com SS antes da indução de estresse oxidativo pelo H_2O_2 apresentou uma viabilidade celular maior que o tratamento somente com H_2O_2 sugerindo um efeito protetor do SS.

Esses resultados assemelham-se aos encontrados na literatura, onde trabalhos demonstraram o efeito protetor de diversas formas de selênio contra a citotoxicidade de diferentes agentes. Wang et al (2015), mostraram o efeito protetor do selenito de sódio na concentração de 1000 nM contra a citotoxicidade induzida pelo arsenito de sódio (1 e 2 μ M) por 48 horas em células NB4 e APL através do ensaio colorimétrico WST-1, entretanto 4000 nM de SS apresentou citotoxicidade e efeito sinérgico quando associado com arsenito de sódio. Zanelatto et al (2013) também observaram o efeito protetor da L-(+)-selenometionina (255, 510, 1275, 2550 nM) tratadas por 24 horas contra a citotoxicidade induzida pelo H_2O_2 (1 hora) em células HepG2 através do ensaio MTT. Neste trabalho, observou-se também que concentrações maiores (5100 e 10200 nM) exerceram atividade citotóxica e não protetoras. O efeito protetor do ácido 3,3' – diseleno-dipropionico (DSePA) de 3290 e 32990 nM tratados por 2 horas contra a citotoxicidade da radiação γ (4 Gy) também foi observado em células CHO através do ensaio MTT (CHAURASIA et al., 2014). O selenito de sódio (30 nM) e selenometionina (10000 nM) expostos por 72 horas exerceram efeito protetor contra a citotoxicidade dos agentes H_2O_2 e radiação UVA em células LNCaP no ensaio MTT. Outros

agentes indutores também foram avaliados neste estudo, entretanto somente os que possuem como mecanismo de ação a geração de EROs, mostrou inibição pelas formas de selênio (ROSA et al., 2012). Com isso, observamos que, o selenito de sódio exerce atividade citoprotetora em concentrações menores em relação a outras formas de selênio.

A sua atividade citoprotetora se deve em parte, a sua atividade antioxidante. Todas as formas de selênio, quando ingeridas, são metabolizadas em Seleneto de Hidrogênio, um importante metabólito que auxilia na inserção da SeCys em selenoproteínas que compõem enzimas do sistema de defesa antioxidante como a glutathiona peroxidase, tioredoxina redutase e algumas selenoproteínas (LIU; ROZOVSKY, 2015; COMINETTI; COZZOLINO, 2009; KOHÁRYOVÁ; KOLLÁROVÁ, 2008; PAPP; HOLMGREN; KHANNA, 2007). Tsuji et al (2015) mostraram que expressão de alguns mRNA que codificam selenoproteínas (*GPXI*, *SEPWI*, *SELH* e *SELK* e do sistema imunológico) estão relacionados com os níveis de selênio no organismo assim como a eficiência de incorporação do SeCys pelos ribossomos na cadeia polipeptídica. Assim, a suplementação adequada desse micronutriente é importante para a expressão e tradução destes importantes genes de defesa antioxidante e do sistema imunológico.

Diferente resposta foi observado na cinética de proliferação celular, no qual o SS não influenciou na ação do H_2O_2 , pois, os tratamentos associados apresentaram valores de IC similares ao do tratamento somente com o H_2O_2 . O perfil da curva obtida pelo RTCA no tempo de recuperação celular após os tratamentos com o H_2O_2 (independente de pré-tratamento com SS) é similar ao apresentado por compostos que interferem no ciclo celular (ABASSI et al., 2009) onde após 48 horas de recuperação celular, as curvas mantiveram os valores do IC basicamente igual até o final do experimento. A curva de crescimento nestes tratamentos sugere homeostase do sistema proliferativo, podendo representar equilíbrio entre morte e crescimento celular ou um efeito citostático do tratamento, evidenciando parada de ciclo celular. EROs causam disfunção celular por interagir com DNA, RNA e proteínas podendo causar alterações no perfil das fases do ciclo (BERRA; MENCK et al., 2006).

Por isso a análise de ciclo celular por citometria de fluxo foi realizada, onde mostrou que a exposição das células HepG2/C3A a H_2O_2 causou acúmulo de células na fase G2/M e que o pré-tratamento com SS não influenciou neste efeito, corroborando com observado na cinética de proliferação celular. A retenção do ciclo celular em G2/M causada pelo H_2O_2 foi observada em osteoblastos derivados de ratos (MC3T3-E1) (LI et al., 2009), osteosarcoma humana 143B (LEE et al., 2005) e epitélio de córnea humana (HLE B-3), entretanto, nesta

última linhagem também foi notado que o H_2O_2 levou a parada do ciclo celular sem induzir a morte celular por apoptose (SEOMUN et al., 2005). Este efeito, pode ser correlacionado também com o perfil de curva de proliferação celular observado no RTCA, que não apresentou queda de IC, evidenciando morte celular. Com isso, observamos que apesar de apresentar uma citoproteção no ensaio MTT, o SS não foi capaz de promover a recuperação total da proliferação celular, evidenciada na cinética de proliferação celular e análise de fases de ciclo celular.

A parada em G2 ocorre quando é detectado defeitos no DNA (STARK; TAYLOR, 2006), inibição da fragmentação do Complexo de Golgi (CORDA et al., 2012) ou por estresse de Retículo Endoplasmático (BOUROUGAA et al., 2010), já a parada em M está relacionada com problemas no fuso mitótico (NOVAK; SIBLE; TYSON, 2002). Por conta disso, o ensaio do cometa foi realizado para avaliar a possível atividade antigenotóxica do SS contra os danos ocasionados pelo H_2O_2 , visto que esse seria um mecanismo de indução de parada de ciclo celular em G2/M. O *Comet Length* e *Tail Moment* apresentaram valores altos no tratamento com H_2O_2 demonstrando seu efeito genotóxico. Sabe-se que EROs causa modificações no DNA, como oxidação direta dos ácidos nucleicos ou formação de quebras simples ou dupla da cadeia de DNA (BERRA; MENCK, 2006). Já nos grupos tratados de forma associada, observou-se redução da genotoxicidade do H_2O_2 , demonstrando proteção contra os danos de DNA induzido pelo H_2O_2 .

Esses resultados corroboram com demais trabalhos que já demonstraram a ação antigenotóxica e antimutagênica do selênio contra outros indutores (CHAURASIA et al., 2014; ZANELATTO, et al., 2013; SHOKRZADEH et al., 2013). Além da atividade antioxidante como um possível mecanismo de antigenotoxicidade, o selênio também pode influenciar no sistema enzimático reparação de danos ao DNA (BERA et al., 2013). Rosa et al (2012), além de observar a antigenotoxicidade do selenito de sódio e selenometionina por agentes que induzem danos oxidativos (radiação UV e H_2O_2), também evidenciou aumento da capacidade de reparo de DNA (reparação de 8-oxoG) pela suplementação de ambas formas de selênio, indicando outro mecanismo de ação desse micronutriente.

Por tanto, a análise molecular de mRNAs e proteínas voltados ao sistema de defesa antioxidante foi realizado a fim de verificar por quais mecanismos o SS influenciou na citoproteção, mas não na propagação do ciclo celular. A expressão das proteínas SOD1 e SOD2, que convertem $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 , e os níveis de mRNA de *GPXI* e *CAT*, que por vez

decompõe o H_2O_2 em H_2O e O_2 foram analisados. Além disso, a expressão das proteínas TRX1 e PRX2 foram analisados também.

O gene *GPXI* não foi alterada no tratamento com H_2O_2 , entretanto observou-se um aumento da expressão desse gene nos grupos tratados de forma associada (SS+ H_2O_2), indicando uma resposta celular antioxidante induzida pelo tratamento com SS. Este gene, codifica uma importante selenoproteína do sistema de defesa antioxidante localizada principalmente na mitocôndria e citosol em células de mamíferos (ESWORTHY; HO; CHU, 1997) e muitos trabalhos têm demonstrado que sua expressão gênica, proteica e aumento da atividade enzimática é dependente da suplementação de selênio visto que está enzima é tetramérica e contem em cada uma de suas subunidades um resíduo de SeCys (**Figura 8**) (TSUJI et al., 2015, ROSA et al., 2012; BALIGA et al., 2007; BRONZETTI et al., 2003).

Diferente resposta foi observado para a expressão da catalase, proteína localizada principalmente do peroxissomo. Foi observado diminuição do mRNAs catalase no tratamento com H_2O_2 . Entretanto, não houve alteração da expressão desses mRNAs no tratamento associado, expressando níveis comparados ao do controle. Jaspers et al (2007) observaram que o selênio não influenciou na transcrição do gene *CAT* em células epiteliais de brônquios humanos, visto que esse gene não é dependente de selênio como o *GPXI*. Níveis normais nos tratamentos SS+ H_2O_2 podem ser associados ao aumento da expressão do gene *GPXI* (expressão dependente de suplementação de selênio). Venkatesan et al (2007) mostraram que o H_2O_2 pode modular fatores de transcrição (FoxO I) e reprimir a expressão do gene *CAT*, efeito este observado no tratamento somente com o H_2O_2 . Entretanto, o aumento de *GPXI* pela suplementação de SS podem diminuir os níveis de H_2O_2 na célula, minimizando os efeitos destas na célula, como a repressão da expressão do mRNA *CAT* (**Figura 8**).

Também observou-se a diminuição da expressão da proteína Cu/Zn-SOD1 (superóxido dismutase) no tratamento com o H_2O_2 e um aumento desta proteína no tratamento com SS+ H_2O_2 quando comparado com o H_2O_2 . Cho et al (1997) mostraram que composto cujo mecanismo de ação é a geração de EROs ocasiona a repressão transcricional do gene *SOD1* mediada pela repressão do supressor tumoral p53. A diminuição dos níveis dessa proteína, está relacionado a repressão da transcrição desse gene, que por vez também foi minimizado no tratamento associado possivelmente pelo aumento de *GPXI* (**Figura 8**).

Alterações na concentração da proteína PRX2 (peroxirredoxina 2) também foi evidenciado. Observou-se diminuição da concentração desta proteína em todos os tempos analisados no tratamento com H_2O_2 . Entretanto, essa diminuição não foi tão significativa no

tempo mais curto avaliado (6 h). As peroxirredoxinas 2 são tiols cuja a função é remover H_2O_2 através do sistema de TRx para proteger outras proteínas contra oxidação. A diminuição da concentração desta proteína em células tratadas com H_2O_2 já foi evidenciada por Low et al (2007) por conta da oxidação da mesma pelo H_2O_2 . Eles também mostraram que PRX2 é capaz de exercer a mesma função que a catalase, quando esta se encontra inibida na célula. Mostrando que esses seria mais um integrante do sistema de defesa antioxidante modulado nas células tratadas com SS (**Figura 8**).

Contudo observamos que o tratamento com SS pode influenciar no sistema de defesa antioxidante mediado principalmente pelo aumento da expressão de *GPX1*, que codifica uma importante selenoproteína, sugerindo que este seria o mecanismo pelo qual o selênio exerceu o efeito citoprotetor e antígeno tóxico. Entretanto, não foi observado proteção por parte do selênio na progressão do ciclo celular, como observado na cinética de proliferação celular e pela citometria de fluxo. Nossos estudos demonstraram que o tratamento com H_2O_2 regulou um conjunto de genes para promover a parada do ciclo celular G2/M.

O gene ciclina B2 (*CCNB2*) teve sua expressão reprimida no tratamento com H_2O_2 , enquanto que no tratamento associado, mostrou níveis de expressão relativa normais. A ciclina B2 está localizada no Complexo de Golgi no qual regula a fragmentação do Golgi na divisão celular. Este gene é responsável em regular a transição de G2 para M pela formação do complexo ciclina B2/CDK1 (GONG; FERRELL, 2010). Com isso, observamos que o SS pode modular a transcrição desse gene, não sendo ele, a influenciar a retenção das células em G2/M no tratamento associado. Sugerindo também que a inibição da fragmentação do Complexo de Golgi não seria o mecanismo pelo qual as células permanecessem retidas em G2/M (**Figura 8**).

Além desse efeito, o selênio exerce proteção contra outros fatores que bloqueiam a célula em G2/M. Zanelatto et al (2013) observaram que o H_2O_2 induz a expressão dos genes *ERN1* e *TRAF2* que por vez traduzem os sinais a partir do citosol para o retículo endoplasmático durante o estresse de retículo. O tratamento associado com a SeMet mostrou uma diminuição da expressão desses genes quando comparado com o H_2O_2 , mostrando que este micronutriente pode minimizar o efeito de estresse de retículo ocasionado pelo H_2O_2 .

Alguns mRNAs de inibidores de quinase dependentes de ciclina pertencente à família CIP/KIP (*CDKN1A*^{p21/WAF1/CIP1} e *CDKN1C*^{p57/KIP2}) e INK4 (*CDKN2B*^{p15/INK4b}) tiveram sua expressão aumentada nos tratamentos com H_2O_2 independente do pré-tratamento com o SS, mostrando que este micronutriente não influenciou na expressão desses genes. Esses

genes são regulados positivamente em resposta a danos nas células onde os inibidores da família CIP/KIP podem inibir todos os complexos ciclina/CDK formados no ciclo celular, como os complexos entre a transição de G2/M. Seomun et al (2005) e Xie et al (2000) observaram o aumento da expressão da proteína p21 em células tratadas com H₂O₂. Este aumento também é influenciado por danos no DNA, no qual é confirmado pela expressão do mRNA *GADD45A*, gene altamente expresso em resposta a danos no DNA e que teve sua expressão aumentada nos grupos tratados com H₂O₂ independente do pré tratamento com SS também. Para este gene, entretanto, o tratamento associado obteve uma expressão de mRNAs relativa menor, que por vez podemos correlacionar com os resultados encontrados no ensaio do cometa, onde se observou danos no DNA nos grupos tratados com H₂O₂ e uma diminuição desses efeitos nos grupos associados. Contudo, observamos tanto no ensaio cometa como na expressão do gene *GADD45A*, que o SS não minimizou totalmente o efeito do H₂O₂, sugerindo que esse também seria um mecanismo pelo qual o SS não modulou os efeitos do H₂O₂ na progressão do ciclo celular. A proteína GADD45 α é estimulada em resposta a danos no DNA, onde ela se liga à CDK1 deixando-a inativa contribuindo para a prisão da célula em G2 também (**Figura 8**) (SALVADOR; BROWN-CLAY; FORNACE, 2013).

O gene *CDKN1C*^{p57/KIP2} codifica um inibidor específico do complexo CDK4,6/ciclina D que por vez atua em G1. Não foi observado a retenção das células nesta fase do ciclo na análise por citometria neste trabalho, porém outros trabalhos evidenciaram que o H₂O₂ também podem induzir a parada celular em G1 (**Figura 8**) (BARNOUIN et al., 2002; DESHPANDE et al., 2002; ANUSZEWSKA; WOZNIAK; SKIERSKI, 2000).

Nos tratamentos somente com SS observou-se a diminuição da expressão dos genes *CDKN1C* e *CDKN2B*. Sendo esses genes codificadores de inibidores de complexo CDK/ciclina, estudos têm demonstrado que a diminuição da expressão do gene *CDKN1C* e sua proteína está relacionada com a aceleração do crescimento celular em carcinomas hepatocelular (GUO et al., 2011). Este efeito na expressão gênica dos inibidores de quinases dependente de ciclina está relacionado ao aumento da proliferação celular nos grupos tratados com SS quando comparado com o controle no ensaio RTCA sugerindo uma melhor performance proliferativa nos grupos tratados com SS.

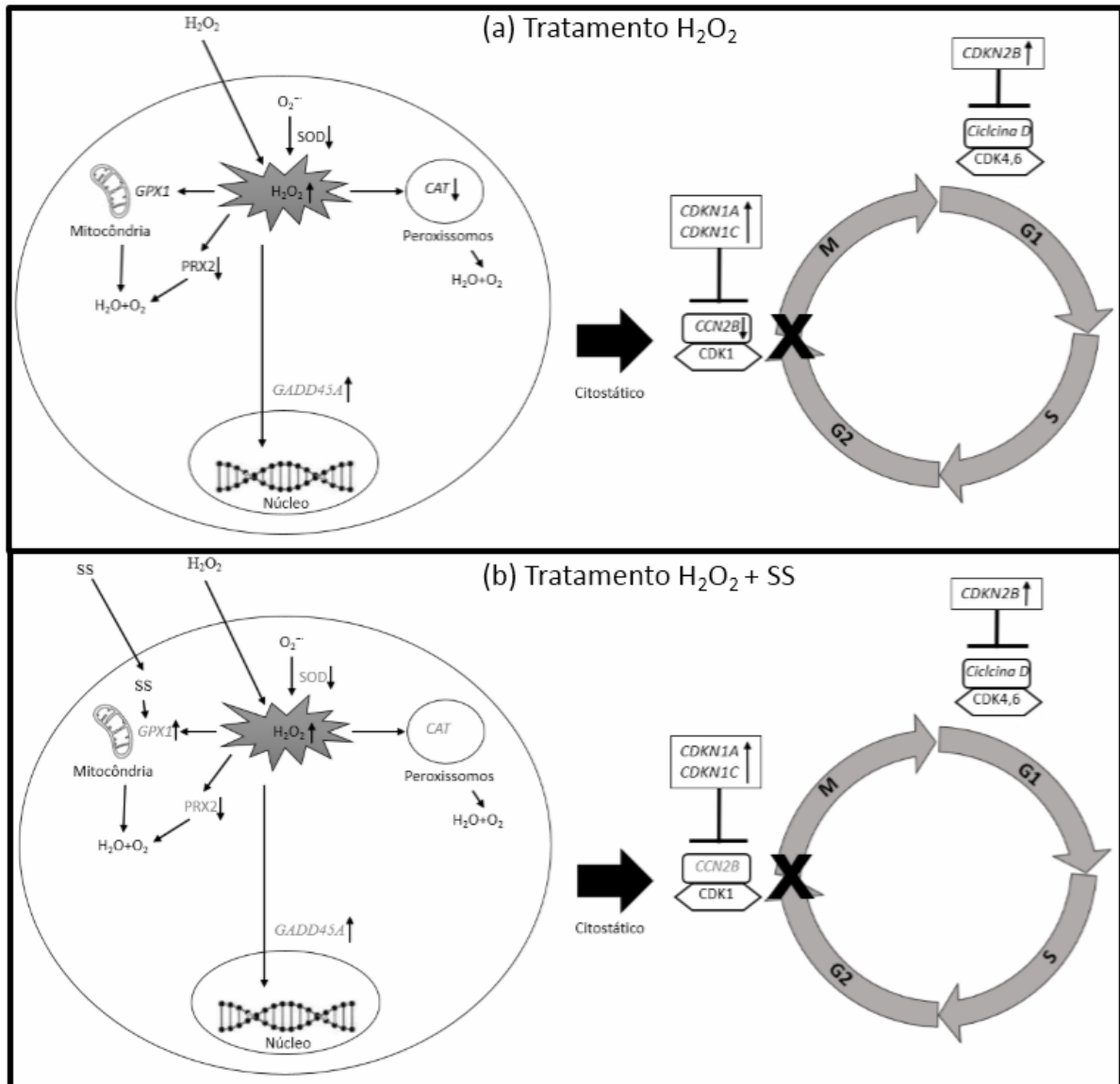


Figura 8. Esquema representativo das alterações ocorridas nas células conforme o tratamento. No tratamento com H_2O_2 (a), observou-se alterações nos mRNAs e proteínas do sistema de defesa antioxidante, assim como o mRNAs relacionado ao ciclo celular e danos de DNA, ocasionando a retenção das células em G2/M. No tratamento H_2O_2+SS (b) observou alteração do sistema de defesa antioxidante, mRNAs de ciclo celular e danos de DNA (representado de cinza) pelo SS. Entretanto, nem todos os mRNAs foram normalizando, ocasionando a retenção das células em G2/M também.

5.1 Conclusão

Dessa maneira, nossos resultados sugerem que o SS pode atuar como um composto protetor adquirido pela alimentação contra o estresse oxidativo principalmente através da modulação de *GPX1*, que por vez pode ser influenciado principalmente pela condição de vida do ser humano. Porém, é necessário investigar até que ponto, este micronutriente, exerce uma

proteção eficaz, visto que, foi o mesmo não influenciou no bloqueio do ciclo celular ocasionado pelo H₂O₂. Sugerindo que defeitos oxidativo nas células, não foram totalmente reparados por esse micronutriente.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado por CNPq, CAPES e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

ABASSI, Y. A.; XI, B.; ZHANG, W.; YE, P.; KIRSTEIN, S. L.; GAYLORD, M. R.; FEINSTEIN, S. C.; WANG, X, XU, X. Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. **Chemistry & Biology**, v. 16, p. 712 – 723, 2009.

ABDULLAEV, F.; RIVERÓN-NEGRETE, L.; PÉREZ-LÓPEZ, I.; CAMACHO-CARRANZA,; ESPINOSA-AGRIRRE, J. J. Cytotoxic and Antimutagenic effects of sodium selenite. **Revista internacional de contaminación ambiental**, v. 21, s. 1, p. 85 – 89, 2005.

ANUSZEWSKA, E. L.; WOZNIAK, G.; SKIERSKI, J. The influence of low H₂O₂ concentrations on DNA content distribution in cell cycle and expression of cyclins in human cells. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v. 57, n. 2, p. 113 – 117, 2000.

BALIGA, M. S.; WANG, H.; ZHUO, P.; SCHWARTZ, J. L.; DIAMOND, A. M. Selenium and GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage. **Biological Trace Element Research**, v. 115, p. 227 – 241, 2007.

BARNOUIN, K.; BUDUISSON, M. L.; CHILD, E. S.; MATTOS, S. F.; GLASSFORD, J.; MEDEMA, R. H.; MANN, D. J.; LAM, E. W. H₂O₂ induced a transiente multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin B and p21^{Cip1} Expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13761 – 13770, 2002.

BERA, S.; ROSA, V.; RACHIDI, W.; DIAMOND, M. Does a role for selenium in DNA damage repair explain apparent controversies in its use in chemoprevention? **Mutagenesis**, v. 28, n. 2, p. 127 – 134, 2013.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340 – 1344, 2006.

BISWAS, S.; TALUKDER, G.; SHARMA, A. Prevention of cytotoxic effects of arsenic by short-term dietary supplementation with selenium in mice *in vivo*. **Mutation Research**, v. 441, p. 155 – 160, 1999.

BOUROUGAA, K.; NASKI, N.; BOULARAN, C.; MLYNARCZYK, C.; CANDEEIAS, M. M.; MARULLO, S.; FAHRAEUS, R. Endoplasmic Reticulum Stress Induces G2 Cell-Cycle Arrest via mRNA Translation of the p53 Isoform p53/47. **Molecular Cell**, v.38, p.78-88, 2010.

BRONZETTI, G.; CINI, M.; CALTAVUTURO, L.; FIORIO, R.; CROCE, C. D. Antimutagenicity of sodium selenite in Chinese hamster V79 cell exposed to azoxymethane, methylmethansulphonate and hydrogen peroxide. **Mutation Research**, v. 523 – 524, p. 21 – 31, 2003.

CHAURASIA, R, K.; BALAKRISHNAN, S.; KUNWAR, A.; YADAV, U.; BHAT, N.; ANJARIA, K.; NAIRY, R.; SAPRA, B. K.; JAIN, V. K.; PRIYADARSINI, K. I. Cyto-genotoxicity assessment of potential radioprotector, 3,3'-diselenodipropionic acid (DSePA) in Chinese Hamster ovary (CHO) cells and human peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 774, p. 8 – 16, 2014

CHEN, C.; KOCH, L. H.; DICE, J. E.; DEMPSEY, K. K.; MOSKOWITZ, A. B.; BARNES-ELEY, M. L.; HUBBARD, T. W.; WILLIAMS, J. V. A randomized, double-blind study comparing the efficacy of selenium sulfide shampoo 1% and ciclopirox shampoo 1% as adjunctive treatments for tinea capitis in children. **Pediatric Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 459 – 462, 2010.

CHO, G.; KANG, S.; SEO, S. J.; KIM, Y.; JUNG, G. The transcriptional repression of the human Cu/Zn superoxide dismutase(sod1) gene by the anticancer drug, mitomycin C(MMC). **Biochemistry and molecular biology international**, v. 42, n. 5, p. 949 – 956, 1997.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-51, 2008.

COMINETTI, C.; COZZOLINO, S. M. F. **Funções plenamente reconhecidas de nutriente: Selênio**. São Paulo: ILSI Brasil, 2009. 20 p.

CORDA, D.; BARRETTA, M. L.; CERVIGNI, R. I.; COLANZI, A. Golgi complex fragmentatio in G2/M transition: an organelle-based cell-cycle *Checkpoint*. **Life**, v. 64, n. 8, p. 661 – 670, 2012.

CUELLO, S.; RAMOS, S.; MATEOS, R.; MARTÍN, M. A.; MADRID, Y.; CÁMARA, C.; BRAVO, L.; GOYA, L. Selenium methylselenocysteine protects human hepatoma HepG2 cells against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 389, n. 7-8, p. 2167 – 2178, 2007.

DESHPANDE, N. N.; SORESCU, D.; SESHIAH, P.; USHIO-FUCAI, M.; AKERS, M.; YIN, Q.; GRIENDLING, K. K. Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. **Antioxid Redox Signal**, v. 4, n. 5, p. 845 – 854, 2002.

ELESPURU, R. K.; AGARWAL, R.; ATRAKCHI, A. H.; BIGGER, A. H.; HEFLICH, R. H.; JAGANNATH, D. R.; LEVY, D. D.; MOORE, M. M.; OUYANG, Y.; ROBISON, T. W.; SOTOMAYOR, R. E.; CIMINO, M. C.; DEARFIELD, K. L. Current and Future Application of Genetic Toxicity Assays: The Role and Value of In Vitro Mammalian Assays. **Toxicological Sciences**. v. 109, n. 2, p. 172 – 179, 2009.

ERKEKOGLU, P.; GIRAY, B. K.; KIZILGÜN, M.; RACHIDI, W.; HININGER-FAVIER, I.; ROUSSEL, A. M.; FAVIER, A.; HINCAL, F. Di(2-ethylhexyl)phthalate-induced renal oxidative stress in rats and protective effect of selenium. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 22, n. 6, p. 415 – 423, 2012.

ESWORTHY, R. S.; HO, Y. S.; CHU, F. F. The *Gpx1* Gene Encodes Mitochondrial Glutathione Peroxidase in the Mouse Liver, **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 340, n. 1, p. 59 – 63, 1997.

GEYIKOGLU, F.; TÜRKEZ, H. Protective Effect of Sodium Selenite on Genotoxicity to Human Whole Blood Cultures Induced by Aflatoxin B1. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 905 – 910, 2005.

GONG, D.; FERRELL, J. E. Jr. The Roles of Cyclin A2, B1, and B2 in Early and Late Mitotic Events, **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n. 18, p. 3149 – 3161, 2010.

GUO, H.; LV, Y.; TIAN, T.; HU, T. H.; WANG, W. J.; SUI, X.; JIANG, L. RUAN, Z. P.; NAN, K. J. Downregulation of p57 accelerates the growth and invasion of hepatocellular carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 12, p. 1897 – 1904, 2011.

HELD, P. **An introduction to reactive oxygen species: Measurement of ROS in cells**. Winooski: BioTek Instruments, 2015.

JASPERS, I.; ZHANG, W.; BRIGHTON, L. E.; CARSON, J. L.; STYBLO, M.; BECK, M. A. Selenium deficiency alters epithelial cell morphology and responses to influenza, **Free Radial Biology & Medicine**, v. 42, p. 1826 – 1837, 2007.

KELLY, J. H. Permanent human hepatocyte cell line and its use in a liver assist device (LAD). US Patent 5,290,684 1994

KOHÁRYOVÁ, M; KOLLÁROVÁ, M. Oxidative stress and thioredoxin system, **General Physiology and Biophysics**, v. 27, p. 71 - 84, 2008.

LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles. **Physiological reviews**. v. 94, n. 3, p. 739 – 777, 2014.

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.

LEE, C. F.; LIU, C. Y.; HSIEH, R. H.; WEI, Y. H. Oxidative stress-induced depolymerization of microtubules and alteration of mitochondrial mass in human cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1042, p. 248 – 254, 2005.

LEITE, M. R.; CEHELLA, J. L.; MANTOVANI, A. C.; DUARTE, M. M.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Swimming exercise and sphenyl diselenide-supplemented diet affect the serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines differently depending on the age of rats. **Cytokine**, v. 71, p. 119 – 123, 2015.

LI, M.; ZHAO, L.; LIU, J.; LIU, A.; ZENG, W. S.; LUO, S. Q.; BAI, X. C. Hydrogen peroxide induces G2 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in osteoblasts. **Anatomical record**, v. 292, n. 8, p. 1107 – 1113, 2009.

LIU, J.; ROZOVSKY, S. Membrane-Bound Selenoproteins. **Antioxidants & Redox signaling**, v, 00, n. 00, p. 1 – 19, 2015.

LOW, F. M.; HAMPTON, M. B.; PESKIN, A. V.; WINTERBOURN, C. C. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. **Blood**, v, 109, n. 6, p. 2611 – 2617, 2007.

MARTÍN, M. A.; RAMOS, S.; MATEOS, R.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; BRAVO, L.; GOYA, L. Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by the flavonoid epicatechin. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 4, p. 503 – 509, 2010.

MIGITA, N. A. **Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares**. 2012. 69f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.

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

NAVARRO-ALARCON, M. N.; VIQUE, C. C. Selenium in food and the human body: A review. **Science of the Total Environment**, v. 400, p. 115 – 141, 2008.

NOVAK, B.; SIBLE, J.C.; TYSON, J.J. *Checkpoints* in the Cell Cycle. Encyclopedia Of Life Sciences. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, 2002.

PAPP, L. V.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. From selenium to selenoproteins: Synthesis, identity and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 775 – 806, 2007.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

ROSA, V. et al. Low doses of selenium specifically stimulate the repair of oxidative DNA damage in LNCaP prostate cancer cells. **Free Radical Research**, v. 46, n. 2, p. 105 – 116, 2012.

SALVADOR, J. M.; BROWN-CLAY, J. D.; FORNACE, A. J. Jr. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis, **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 793, p. 1 – 19, 2013.

SANFILIPPO, A.; ENGLISH, J. C. An Overview of Medicated Shampoos Used in Dandruff Treatment. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 31, n. 7, p. 396 – 400, 2006.

SANTOS, R. A.; JORDÃO Jr, A. A.; VANNUCCHI, H.; TAKAHASHI, C. S. Protection of doxorubicin-induced DNA damage by sodium selenite and selenomethionine in Wistar rats. **Nutrition Research**, v. 27, p. 343 – 348, 2007.

SEOMUN, Y.; KIM, J. T.; KIM, H. S.; PARK, J. Y.; JOO, C. K. Induction of p21^{Cip1} – mediated G2/M arrest in H₂O₂/treated lens epithelial cells. **Molecular Vision**, v. 11, p. 764 – 774, 2005.

SHENKIN, A. Micronutrients in health and disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p. 559 – 567, 2006.

SHOKRZADEH, M.; AHANGAR, N.; ABDOLLAHI, M.; SHADBOORESTAN, A.; OMIDI, M.; PAYAM, S. S. Potential chemoprotective effects on selenium on diazinon-induced DNA damage in rat peripheral blood lymphocyte. **Human and Experimental Toxicology**, v. 32, n. 7, p. 759 – 765, 2013.

STARK, G. R.; TAYLOR, W. R. Control of the G2/M transition. **Molecular Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 227 – 248, 2006.

TIWARI, A. K. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. **Current Science**, v. 81, n. 9, p. 1179 – 1187, 2001.
TSUJI, P. A.; CARLSON, B. A.; ANDERSON, C. B.; SEIFRIED, H. E.; HATFIELD, D. L.; HOWARD, M. T. Dietary Selenium Levels Affect Selenoprotein Expression and Support the Interferon- and IL-6 Immune Response Pathways in Mice. **Nutrients**. v. 7, p. 6529 – 6549, 2015.

VENKATESAN, B.; MAHIMAINATHAN, L.; DAS, F.; GHOSH-CHOUDHURY, N.; CHOSH-CHOUDHURY, G. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via PI 3 kinase/Akt signaling in mesangial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, n. 2, p. 457 – 467, 2007.

WANG, S.; GENG, Z.; SHI, N.; LI, X.; WANG, Z. Dose-dependent effects of selenite (Se⁴⁺) on arsenite (As³⁺)-induced apoptosis and differentiation in acute promyelocytic leukemia cells. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 1, e1596, 2015.

XIE, S.; WANG, Q.; WU, H.; COGSWELL, J.; LU, L.; JHANWAR-UJIYAL, M.; DAI, W. Reactive Oxygen Species-induced phosphorylation of p53 on serine 20 is mediated in part by polo-like kinase-3. **The journal of biological chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36194 – 36199, 2001.

YANG, Y.; HUANG, F.; REN, Y.; XING, L.; WU, Y.; LI, Z.; PAN, XU, C. 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.

ZANELATTO, L. C.; SARTORI, D.; LEPRI, S. R.; MANTOVANI, M. S. Chemoprotective action of L-(+)-selenomethionine on the modulation of genes involved in oxidative stress and in the UPR pathway. **European Food Research and Technology**, v. 65, n. 2, p. 213 – 222, 2013.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Nossos resultados demonstram que a suplementação do SS não exerce efeito citotóxico e genotóxico em células HepG2/C3A. Além disso, foi observado efeito protetor frente a citotoxicidade e genotoxicidade causado pelo H₂O₂ possivelmente pelo aumento da expressão do gene *GPXI* que codifica um importante selenoproteína do sistema de defesa antioxidante da célula. Entretanto, não houve total recuperação da proliferação celular nos grupos pré-tratados em relação ao tratamento com H₂O₂. Possivelmente este efeito está associado ao bloqueio das células nas fases G2/M que também foi sinalizado pelos genes controladores de ciclo impedindo a continuidade do crescimento celular, também relacionado aos danos no DNA.

Além disso, estudos futuros devem levar em consideração as consequências celulares da repressão de genes inibidores de quinases dependente de ciclina por SS e como esses efeitos podem ser benéficos ou prejudiciais aos seres humanos.

REFERÊNCIA

- ABDULLAEV, F.; RIVERÓN-NEGRETE, L.; PÉREZ-LÓPEZ, I.; CAMACHO-CARRANZA,.; ESPINOSA-AGRIRRE, J. J. Cytotoxic and Antimutagenic effects of sodium selenite. **Revista internacional de contaminación ambiental**, v. 21, s. 1, p. 85 – 89, 2005.
- AL-BADER, A.; ABUL, H.; HUSSAIN, T.; AL-MOOSAWI, M.; MATHEW, T. C.; DASHTI, H. Selenium and liver cirrhosis. **Molecular and cellular Biochemistry**, v. 185, p. 1 – 6, 1998.
- ALMONDES, K. G. S.; LEAL, G. V. S.; COZZOLINO, S. M. F.; PHILIPPI, S. T.; RONDÓ, P. H. O papel das selenoproteínas no câncer. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 4, p. 484 – 488, 2010.
- BALIGA, M. S.; WANG, H.; ZHUO, P.; SCHWARTZ, J. L.; DIAMOND, A. M. Selenium and GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage. **Biological Trace Element Research**, v. 115, p. 227 – 241, 2007.
- BARNOUIN, K. et al. H₂O₂ induced a transiente multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin B and p21^{Cip1} Expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13761 – 13770, 2002.
- BAUM, M. L.; CAMPA, A.; LAI, S.; SALES-MARTINEZ, S.; TSALAILE, L.; BURNS, P.; FARAHANI, M.; LI, Y.; VAN-WIDENFELT, E.; PAGE, J. B.; BUSSMANN, H.; FAWZI, W. W.; MOYO, S.; MAKHEMA, J.; THIOR, I.; ESSEX, M.; MARLINK, R. 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.
- BEHNE, D.; WEILER, H.; KYRIAKOPOULOS, A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. **Journal of Reproduction and Infertility**, v. 106, p. 291 – 197, 1996.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340 – 1344, 2006.
- BEUTH, J.; MOSS, R. W. **Complementary oncology: Adjunctive Methods in the treatment of cancer**. New York: Thieme Medical Publishers 2011, 303p.

BISWAS, S.; TALUKDER, G.; SHARMA, A. Prevention of cytotoxic effects of arsenic by short-term dietary supplementation with selenium in mice *in vivo*. **Mutation Research**, v. 441, p. 155 – 160, 1999.

BÖCK, A.; FORCHHAMMER, K.; HEIDER, J.; LEINFELDER, W.; SAWERS, G.; VEPREK, G.; ZINONI, F. Selenocysteine: the 21st amino acid. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 515 – 520, 1991.

BRONZETTI, G.; CINI, M.; CALTAVUTURO, L.; FIORIO, R.; CROCE, C. D. Antimutagenicity of sodium selenite in Chinese hamster V79 cell exposed to azoxymethane, methylmethansulphonate and hydrogen peroxide. **Mutation Research**, v. 523 – 524, p. 21 – 31, 2003.

BURK, R. F. Selenium, an antioxidant nutrient. **Nutrition in Clinical Care**, v. 5, n. 2, p. 75 – 79, 2002.

CHEN, C.; KOCH, L. H.; DICE, J. E.; DEMPSEY, K. K.; MOSKOWITZ, A. B.; BARNES-ELEY, M. L.; HUBBARD, T. W.; WILLIAMS, J. V. A randomized, double-blind study comparing the efficacy of selenium sulfide shampoo 1% and ciclopirox shampoo 1% as adjunctive treatments for tinea capitis in children. **Pediatric Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 459 – 462, 2010.

COMINETTI, C.; COZZOLINO, S. M. F. **Funções plenamente reconhecidas de nutriente: Selênio**. São Paulo: ILSI Brasil, 2009. 20 p.

CONNER, T. S.; RICHARDSON, A. C.; MILLER, J. C. Optimal serum selenium concentrations are associated with lower depressive symptoms and negative mood among young adults. **The Journal of Nutrition**, v. 145, p. 59 – 65, 2015.

DEPAMPHILIS, M. L.; RENTY, C. M.; ULLAH, Z.; LEE, C. Y. “The octet”: eight protein kinases that control mammalian DNA replication. **Frontiers in Physiology**, v. 368, n. 3, p. 1 – 20, 2012.

DESHPANDE, N. N.; SORESCU, D.; SESHIAH, P.; USHIO-FUCAI, M.; AKERS, M.; YIN, Q.; GRIENDLING, K. K. Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. **Antioxid Redox Signal**, v. 4, n. 5, p. 845 – 854, 2002.
DRAKE, E. N. Cancer chemoprevention: Selenium as a prooxidant, not an antioxidant. **Medical Hypotheses**, v. 67, n. 2, p. 318 – 322, 2006.

EVANS, P.; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **British Journal of Nutrition**, n. 85, s. 2, p. S67 – S74, 2001.

FLOHE, L.; GÜNZLER, W. A.; SCHOCK, H. H. Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. **Febs Letters**, v. 32, n. 1, p. 132 – 134, 1973.

FNB – Food and Nutrition Board. USA Institute of Medicine. **Dietary references Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids**. Washington: National Academy Press; 2000. 529 p.

GEYIKOGLU, F.; TÜRKEZ, H. Protective Effect of Sodium Selenite on Genotoxicity to Human Whole Blood Cultures Induced by Aflatoxin B1. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 905 – 910, 2005.

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, p. 309 – 318, 2005.

HAWKES, W. C.; TUREK, P. J. Effects of dietary selenium on sperm motility on healthy men. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 764 – 772, 2001.

HELD, P. **An introduction to reactive oxygen species: Measurement of ROS in cells**. Winooski: BioTek Instruments, 2015.

IWAOKA, M.; OOKA, R.; NAKAZATO, T.; OISHI, S. Synthesis of Selenocysteine and Selenomethionine Derivatives from Sulfur-Containing Amino Acids. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, p. 359 – 374, 2008.

JOHNSON, B. A.; NUNLEY, J. R. Treatment of seborrheic dermatitis. **American Family Physician**, v. 61, n. 9, p. 2703 – 2710, 2000.

KOHÁRYOVÁ, M.; KOLLÁROVÁ, M. Oxidative stress and thioredoxin system, **General Physiology and Biophysics**, v. 27, p. 71 - 84, 2008.

KRAUSE, K. et al.; WASNER, M.; REINHARD, W.; HAUGWITZ, U.; DOHNA, C. L.; MÖSSNER, J.; ENGELAND, K. The tumour suppressor protein p53 can repress transcription of cyclin B. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 22, p. 4410 – 4418, 2000.

KUMAR, B. S.; PRIYADARSINI, K. I. Selenium nutrition: How important is it? **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, p. 333 – 341, 2014.

LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles. **Physiological reviews**, v. 94, n. 3, p. 739 – 777, 2014.

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.

LEITE, M. R.; CEHELLA, J. L.; MANTOVANI, A. C.; DUARTE, M. M.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Swimming exercise and sphenyl diselenide-supplemented diet affect the serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines differently depending on the age of rats. **Cytokine**, v. 71, p. 119 – 123, 2015.

LI, M.; ZHAO, L.; LIU, J.; LIU, A.; ZENG, W. S.; LUO, S. Q.; BAI, X. C. Hydrogen peroxide induces G2 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in osteoblasts. **Anatomical record**, v. 292, n. 8, p. 1107 – 1113, 2009.

LI, Z.; MENG, J.; XU, T. J.; QIN, X. Y.; ZHOU, X. D. Sodium selenite induces apoptosis in colon cancer cells via Bax-dependent mitochondrial pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, p. 2166 – 2171, 2013.

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.

MEHDI, Y.; HORNICK, J. L.; ISTASSE, L.; DUFRASNE, I. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. **Molecules**, v. 18, p. 3292 – 3311, 2013.

MIRANDA, J. X. **Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7**. 2012. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Alimento)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NAVARRO-ALARCON, M. N.; VIQUE, C. C. Selenium in food and the human body: A review. **Science of the Total Environment**, v. 400, p. 115 – 141, 2008.

NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **The Science of the total environment**, v. 249, n. 3, p. 347 – 371, 2000.

PAPP, L. V.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. From selenium to selenoproteins: Synthesis, identity and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 775 – 806, 2007.

QUAAS, M.; MÜLLER, G. A.; ENGELAND, K. p53 can repress transcription of cell cycle genes through a p21^{WAF1/CIP1}-dependent switch from MMB to DREAM protein complex binfing at CHR promotor elemens. **Cell Cycle**, v. 11, n. 24, p. 4661 – 4672, 2012.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**. v. 356, n. 9225, p. 233 – 241, 2000.

REDDI, A. S.; BOLLINENI, J. S. Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF – B1 in normal and diabetic rats. **Kidney International**, v. 59, p. 1342 – 1353, 2001.

ROSA, V. et al. Low doses of selenium specifically stimulate the repair of oxidative DNA damage in LNCaP prostate cancer cells. **Free Radical Research**, v. 46, n. 2, p. 105 – 116, 2012.

SANFILIPPO, A.; ENGLISH, J. C. An Overview of Medicated Shampoos Used in Dandruff Treatment. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 31, n. 7, p. 396 – 400, 2006.

SANTOS, R. A.; JORDÃO Jr, A. A.; VANNUCCHI, H.; TAKAHASHI, C. S. Protection of doxorubicin-induced DNA damage by sodium selenite and selenomethionine in Wistar rats. **Nutrition Research**, v. 27, p. 343 – 348, 2007.

SEOMUN, Y.; KIM, J. T.; KIM, H. S.; PARK, J. Y.; JOO, C. K. Induction of p21^{Cip1} – mediated G2/M arrest in H₂O₂/treated lens epithelial cells. **Molecular Vision**, v. 11, p. 764 – 774, 2005.

SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 453 – 462, 2009.

STOKEL, K. Selenium: What forms protect against cancer? **Life Extension Magazine** Winter Edition, 2013. Acesso em: <http://www.lef.org/magazine/mag2012/ss2012_Selenium-Protect-Against-Cancer_01.htm>. Disponível em: 20/07/2014.

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

TIWARI, A. K. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. **Current Science**, v. 81, n. 9, p. 1179 – 1187, 2001.

TRIRY, C.; RUTTENS, A.; PUSSEMIER, L.; SCHNEIDER, Y. J. As *in vitro* investigation of species-dependent intestinal transport of selenium and the impact of this process on selenium bioavailability. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 2126 – 2134, 2013.

TURANOV, A. A.; XU, X. M.; CARLSON, B. A.; YOO, M. H.; GLADYSHEV, V. N.; HATFIELD, D. L. Biosynthesis of Selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. **American Society for Nutrition. Advances in Nutrition**, v. 2, p. 122–128, 2011.

VERBON, E. H.; POST, J. A.; BOONSTRA, J. The influence on reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, v. 511, p. 1 – 6, 2012.

VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131 – 149, 2003.

WANG, S.; GENG, Z.; SHI, N.; LI, X.; WANG, Z. Dose-dependent effects of selenite (Se^{4+}) on arsenite (As^{3+})-induced apoptosis and differentiation in acute promyelocytic leukemia cells. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 1, e1596, 2015.

XIE, S.; WANG, Q.; WU, H.; COGSWELL, J.; LU, L.; JHANWAR-UJIYAL, M.; DAI, W. Reactive Oxygen Species-induced phosphorylation of p53 on serine 20 is mediated in part by polo-like kinase-3. **The journal of biological chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36194 – 36199, 2001.

YANG, Y.; HUANG, F.; REN, Y.; XING, L.; WU, Y.; LI, Z.; PAN, XU, C. 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.

ZENG, H.; COMBS Jr, G. F. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 1 – 7, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabelas

Tabela 1. Valores de absorvância em 540 nm (médias \pm desvio padrão) obtida no Ensaio de Citotoxicidade (MTT). Valores obtidos após 24 horas de tratamento com selenito de sódio, 2 horas com o peróxido de hidrogênio (300 μ M) e 22 horas de recuperação celular.

Tratamentos	Absorvância
	Média \pm desvio padrão
Controle	0,493611 \pm 0,046825
H ₂ O ₂	0,331055 \pm 0,02007 *
SS 20 nM	0,473444 \pm 0,36894 #
SS 200 nM	0,477556 \pm 0,029996 #
SS 20 nM + H ₂ O ₂	0,409167 \pm 0,024937 #
SS 200 nM + H ₂ O ₂	0,418389 \pm 0,045867 #

ANOVA seguida de Teste de Dunnet;

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$);

Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).

Tabela 2. Valores médios de IC obtidas no ensaio RTCA no período de recuperação celular em leituras a cada 24 horas. Após a adição de meio novo, o índice celular foi normalizado. (Leitura foi realizada a cada 30 minutos durante 96 horas).

	Controle	H ₂ O ₂	SS 20 nM	SS 200 nM	SS 20 nM + H ₂ O ₂	SS 200 nM + H ₂ O ₂
24 Horas	1,79 \pm 0,1	1,56 \pm 0,08*	1,87 \pm 0,06#	1,84 \pm 0,08#	1,68 \pm 0,03	1,63 \pm 0,11
48 Horas	3,16 \pm 0,21	2,61 \pm 0,18*	3,31 \pm 0,12#	3,27 \pm 0,26#	2,88 \pm 0,06	2,79 \pm 0,27
72 Horas	4,13 \pm 0,27	2,93 \pm 0,19*	4,35 \pm 0,12#	4,44 \pm 0,26#	3,33 \pm 0,09*	3,19 \pm 0,37*
96 Horas	5,25 \pm 0,37	3,23 \pm 0,26*	5,57 \pm 0,18#	5,76 \pm 0,28#	3,81 \pm 0,14*	3,64 \pm 0,58*

ANOVA seguida de Teste de Dunnet;

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$);

Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).

Tabela 3. Média das porcentagens da distribuição das células nas fases do ciclo celular (G1, S e G2/M). Valores obtidos após 24 horas de recuperação celular.

	G1 \pm DP (%)	S \pm DP (%)	G2/M \pm DP (%)
Controle	43,7 \pm 4,72	16,73 \pm 2,43	39,43 \pm 2,28
H ₂ O ₂	24,23 \pm 6,67*	18,53 \pm 7,1	57,06 \pm 7,07*
SS 20 nM	44,43 \pm 4,74	16,96 \pm 3,45	38,43 \pm 2,48
SS 200 nM	44,1 \pm 5,05	17,26 \pm 4,35	38,43 \pm 3,12
SS 20 nM + H ₂ O ₂	24,76 \pm 4,47*	14,13 \pm 5,15	60,9 \pm 4,7*
SS 200 nM + H ₂ O ₂	24,33 \pm 2,45*	14,13 \pm 6,76	61,26 \pm 7,65*

ANOVA seguida de Teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

* Diferença significativamente estatística em relação ao controle negativo ($p \leq 0,05$).

Tabela 4. Média e desvio padrão dos resultados encontrado no Ensaio do Cometa utilizando o programa CometScore[®]. Valores obtidos após 24 horas de tratamento com selenito de sódio e 2 horas com o peróxido de hidrogênio (300 µM).

	Comet Length (px) ±DP	Tail Moment ±DP
Controle	44,17 ± 0,93	0,004 ± 0,003
H ₂ O ₂	147,45 ± 11,00*	20,97 ± 6,80*
SS 200 nM	42,42 ± 1,04 #	0,000006 ± 0,000001 #
SS 200 nM + H ₂ O ₂	116,98 ± 10,11* #	10,99 ± 2,61* #

ANOVA seguida de Teste de Dunnet;

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (p < 0,05);

Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo (p < 0,05).

Tabela 5. Iniciadores utilizados na RT-qPCR.

Gene	Forward	Reverse
<i>ACTB</i>	F CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT 3'	5' AGG AAG GAA GGC TGG AAG AG 3'
<i>GPXI</i>	5' CAA CCA GTT TGG GCA TCA G 3'	5' CGA TGT CAA TGG TCT GGA AG3'
<i>CAT</i>	5' CAT CGC CAC ATG AAT TA 3'	5' CCA ACT GGG ATG AGA GGG TA 3'
<i>CCN2B</i>	5' ATT TTT ACA GGT TCA GCC AG 3'	5' ATC TCC TCA TAC TTG GAA GC 3'
<i>CDKN1A</i>	5' CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC3'	5' CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG3'
<i>CDKN1C</i>	5' CAA GTC TGT TAA AAT GGT TCC 3'	5' TTT TTG CAG CAT TTT TCG G 3'
<i>CDKN2B</i>	5' GAC TAG TGG AGA AGG TGC 3'	5' TCA TCA TGA CCT GGA TCG 3'
<i>GADD45</i>	5' TCA GCG CAC GAT CAC3 TGT C 3'	5' CCA GCA GGC ACA ACA CCA C 3'

A

Tabela 6. Expressão relativa normalizada com o gene de referência *ACTB* utilizando o programa REST. Os valores de *fold-change* representam quantas vezes o gene foi mais ou menos expresso em relação ao grupo controle.

Gene	Tratamento	Expressão	Std. Error	Fold-change
<i>GPXI</i>	SS 200 nM	1,597	0,824 – 3,706	1,597
	H ₂ O ₂	1,124	0,546 – 2,631	1,124
	SS 200 nM + H ₂ O ₂	2,661	1,107 – 4,922	2,661
<i>CAT</i>	SS 200 nM	1,133	0,884 – 1,390	1,133
	H ₂ O ₂	0,485	0,429 – 0,540	-2,06
	SS 200 nM + H ₂ O ₂	0,868	0,736 – 1,025	-1,15
<i>CCN2B</i>	SS 200 nM	0,856	0,406 – 1,901	-1,16
	H ₂ O ₂	0,446	0,196 – 0,868	-2,24
	SS 200 nM + H ₂ O ₂	0,673	0,293 – 1,539	-1,48
<i>CDKN1A</i>	SS 200 nM	0,969	0,657 – 1,506	-1,03
	H ₂ O ₂	6,013	3,821 – 8,903	6,013
	SS 200 nM + H ₂ O ₂	7,885	5,026 – 12,578	7,885
<i>CDKN1C</i>	SS 200 nM	0,236	0,141 – 0,401	-4,23
	H ₂ O ₂	2,351	1,413 – 4,204	2,251
	SS 200 nM + H ₂ O ₂	2,128	1,088 – 4,148	2,128
<i>CDKN2B</i>	SS 200 nM	0,494	0,329 – 0,734	-2,02
	H ₂ O ₂	2,048	1,569 – 2,855	2,048
	SS 200 nM + H ₂ O ₂	2,385	1,686 – 3,658	2,385
<i>GADD45A</i>	SS 200 nM	0,782	0,475 – 1,123	-1,27
	H ₂ O ₂	3,981	2,504 – 5,971	3,981

	SS 200 nM + H ₂ O ₂	3,119	1,951 – 5,091	3,119
--	---	-------	---------------	-------

Tabela 7. Valores de média em RT-qPCR em tempo real dos genes estudados em células HepG2/C3A após 6 horas de recuperação celular.

Controle x H₂O₂								
		Controle	H ₂ O ₂	Eficiência Média	Delta Ct	E ^{ACq}	Razão	
<i>GPXI</i>	Eficiência	2	2	2			1,429985	
	Ct	18,75	18,53		0,216667	1,162045587		
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2				
	Ct	14,525	14,824333		-0,299333	0,812627823		
Controle x SS 200 nM								
		Controle	SS 200 nM	Eficiência Média	Delta Ct	E ^{ACq}		Razão
<i>GPXI</i>	Eficiência	2	2	2			1,446266	
	Ct	18,75	18,023333		0,723333	1,650992233		
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2				
	Ct	14,525	14,334		0,191	1,141554707		
Controle x H₂O₂ + SS 200 nM								
		Controle	H ₂ O ₂ + SS	Eficiência Média	Delta Ct	E ^{ACq}		Razão
<i>GPXI</i>	Eficiência	2	2	2			2,310172	
	Ct	18,75	17,286667		1,46	2,751083636		
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2				
	Ct	14,525	14,273		0,252	1,190856849		
Controle x H₂O₂								
		Controle	H ₂ O ₂	Eficiência Média	Delta Ct	E ^{ACq}		Razão
<i>CAT</i>	Eficiência	2	2	2			0,616426	
	Ct	21,18	22,178		-0,997333	0,500925051		
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2				
	Ct	14,525	14,824333		-0,299333	0,812627823		
Controle x SS 200 nM								
		Controle	SS 200 nM	Eficiência Média	Delta Ct	E ^{ACq}		Razão
<i>CAT</i>	Eficiência	2	2	2			1,026215	
	Ct	21,18	20,952333		0,228333	1,171480819		
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2				
	Ct	14,525	14,334		0,191	1,141554707		
Controle x H₂O₂ + SS 200 nM								
		Controle	H ₂ O ₂ + SS	Eficiência Média	Delta Ct	E ^{ACq}		Razão
<i>CAT</i>	Eficiência	2	2	2			0,753145	
	Ct	21,18	21,337667		-0,157	0,89688816		
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2				
	Ct	14,525	14,273		0,252	1,190856849		

Controle x H₂O₂							
		Controle	H₂O₂	Eficiência Média	Delta Ct	E^{ACq}	Razão
<i>CCN2B</i>	Eficiência	2	2	2			0,56749
	Ct	22,79	23,903333		-1,116667	0,461158097	
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2			
	Ct	14,525	14,824333		-0,299333	0,812627823	

Controle x SS 200 nM							
		Controle	SS 200 nM	Eficiência Média	Delta Ct	E^{ACq}	Razão
<i>CCN2B</i>	Eficiência	2	2	2			0,775035
	Ct	22,79	22,963333		-0,176667	0,884744831	
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2			
	Ct	14,525	14,334		0,191	1,141554707	

Controle x H₂O₂ + SS 200 nM							
		Controle	H₂O₂ + SS	Eficiência Média	Delta Ct	E^{ACq}	Razão
<i>CCN2B</i>	Eficiência	2	2	2			0,58454
	Ct	22,79	23,31		-0,523333	0,695762422	
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2			
	Ct	14,525	14,273		0,252	1,190856849	

Controle x H₂O₂							
		Controle	H₂O₂	Eficiência Média	Delta Ct	E^{ACq}	Razão
<i>CDKN1A</i>	Eficiência	2	2	2			7,64933
	Ct	21,08	18,446667		2,636	6,21605815	
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2			
	Ct	14,525	14,824333		-0,299333	0,812627823	

Controle x SS 200 nM							
		Controle	SS 200 nM	Eficiência Média	Delta Ct	E^{ACq}	Razão
<i>CDKN1A</i>	Eficiência	2	2	2			0,877619
	Ct	21,08	21,08		0,002667	1,001850102	
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2			
	Ct	14,525	14,334		0,191	1,141554707	

Controle x H₂O₂ + SS 200 nM							
		Controle	H₂O₂ + SS	Eficiência Média	Delta Ct	E^{ACq}	Razão
<i>CDKN1A</i>	Eficiência	2	2	2			6,84476
	Ct	21,08	18,055667		3,027	8,151129573	
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2			
	Ct	14,525	14,273		0,252	1,190856849	

Controle x H₂O₂							
		Controle	H₂O₂	Eficiência Média	Delta Ct	E^{ACq}	Razão
<i>CDKN1C</i>	Eficiência	2	2	2			2,99108
	Ct	31,87	30,592		1,281333	2,430635115	
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2			
	Ct	14,525	14,824333		-0,299333	0,812627823	
Controle x SS 200 nM							
		Controle	SS 200 nM	Eficiência Média	Delta Ct	E^{ACq}	Razão
<i>CDKN1C</i>	Eficiência	2	2	2			0,213948
	Ct	31,87	33,907		-2,033667	0,244233556	
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2			
	Ct	14,525	14,334		0,191	1,141554707	
Controle x H₂O₂ + SS 200 nM							
		Controle	H₂O₂ + SS	Eficiência Média	Delta Ct	E^{ACq}	Razão
<i>CDKN1C</i>	Eficiência	2	2	2			1,847618
	Ct	31,87	30,735667		1,137667	2,200248795	
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2			
	Ct	14,525	14,273		0,252	1,190856849	

Controle x H₂O₂							
		Controle	H₂O₂	Eficiência Média	Delta Ct	E^{ACq}	Razão
<i>CDKN2B</i>	Eficiência	2	2	2			2,605391
	Ct	29,08	28,000333		1,082167	2,117213366	
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2			
	Ct	14,525	14,824333		-0,299333	0,812627823	
Controle x SS 200 nM							
		Controle	SS 200 nM	Eficiência Média	Delta Ct	E^{ACq}	Razão
<i>CDKN2B</i>	Eficiência	2	2	2			0,447151
	Ct	29,08	30,052667		-0,970167	0,51044709	
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2			
	Ct	14,525	14,334		0,191	1,141554707	
Controle x H₂O₂ + SS 200 nM							
		Controle	H₂O₂ + SS	Eficiência Média	Delta Ct	E^{ACq}	Razão
<i>CDKN2B</i>	Eficiência	2	2	2			2,070769
	Ct	29,08	27,780333		1,302167	2,465989517	
<i>ACTB</i>	Eficiência	2	2	2			
	Ct	14,525	14,273		0,252	1,190856849	

Controle x H ₂ O ₂								
		Controle	H ₂ O ₂	Eficiência Média	Delta Ct	E ^{ACq}	Razão	
GADD45A	Eficiência	2	2	2			5,064196	
	Ct	22,05	20,012		2,041	4,115306832		
ACTB	Eficiência	2	2	2				
	Ct	14,525	14,824333		-0,299333	0,812627823		
Controle x SS 200 nM								
		Controle	SS 200 nM	Eficiência Média	Delta Ct	E ^{ACq}		Razão
GADD45A	Eficiência	2	2	2			0,707761	
	Ct	22,05	22,360667		-0,307667	0,807947432		
ACTB	Eficiência	2	2	2				
	Ct	14,525	14,334		0,191	1,141554707		
Controle x H ₂ O ₂ + SS 200 nM								
		Controle	H ₂ O ₂ + SS	Eficiência Média	Delta Ct	E ^{ACq}		Razão
GADD45A	Eficiência	2	2	2			2,707573	
	Ct	22,05	20,364		1,689	3,224331326		
ACTB	Eficiência	2	2	2				
	Ct	14,525	14,273		0,252	1,190856849		

Tabela 8. Média da Intensidade de Fluorescência e desvio padrão obtidos na análise de proteína utilizando o aparelho MAGPIX® System. Valores obtidos após 24 horas de tratamento com selenito de sódio e 2 horas com o peróxido de hidrogênio e mais 4, 10 e 22 horas de recuperação celular.

Proteína	Recuperação celular	Controle±DP	H ₂ O ₂ ±DP	SS 200 nM±DP	SS 200 nM + H ₂ O ₂ ±DP
Catalase	6 horas	2577,2±337,3	1936,6±328,2	2040,9±690,5	2197,1±480,5
	12 horas	2649±510,1	2077,5±488,8	3028±920,5#	2057,8±436,4
	24 horas	2689,2±600,2	1962,3±596,5	3143,9±794,3#	2647,1±780,8
SOD1	6 horas	1560,6±98,7	1483,5±87,9	1428,7±289,1	1552,0±151,1
	12 horas	1778±143,6	1542,1±197,2	1874,0±253,6#	1602,2±144,6
	24 horas	1871,7±80,2	1512,6±184,6*	1928,9±134,8#	1775,8±179,1#
SOD2	6 horas	7672,5±601,1	7094,9±569,0	6836,6±1689,5	7291,5±1225,5
	12 horas	8183,5±720,3	75841,5±949,9	8655±726,6	7663,7±807,9
	24 horas	7719,8±693,8	7583,1±704,3	8357±737,2	8007,5±860,2
TRX1	6 horas	6266,8±227,5	5936,3±256,4	5870,9±888,5	5930,9±751,6
	12 horas	6842,5±451,6	6365,5±413,9	6728,0±695,4	5942,6±826,1
	24 horas	6920,7±183,2	6579,5±336,8	7130,0±236,4#	6866,0±409,0
PRX2	6 horas	1427±52,7	1249,5±60,7*	1339,1±171,1	1291,6±61,6
	12 horas	1699,9±114,7	1140,6±93,9*	1654,0±148,0#	1181,1±150,1*
	24 horas	1641,3±83,3	1383,5±75,6*	1576,5±46,9#	1454,1±102,6*

ANOVA seguida de Teste de Dunnet;

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$);

Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).