
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ATIVIDADE DO MICRONUTRIENTE SELÊNIO NA CINÉTICA DE
PROLIFERAÇÃO CELULAR, CITOTOXICIDADE, INDUÇÃO DE
APOPTOSE E EXPRESSÃO DOS GENES *CASP9*, *BCL-XL* E *APC*
EM CÉLULAS HT29**

Mestranda: Mariana de Oliveira Mauro

Orientadora: Prof^a Dr^a Lucia Regina Ribeiro - UNESP, Rio Claro - SP

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani – UEL, Londrina -PR

Fevereiro-2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Mariana de Oliveira Mauro

ATIVIDADE DO MICRONUTRIENTE SELÊNIO NA CINÉTICA DE
PROLIFERAÇÃO CELULAR, CITOTOXICIDADE, INDUÇÃO DE
APOPTOSE E EXPRESSÃO DOS GENES *CASP9*, *BCL-XL* E *APC*
EM CÉLULAS HT29.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular), da
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lúcia Regina Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Fevereiro-2011

MARIANA DE OLIVEIRA MAURO

ATIVIDADE DO MICRONUTRIENTE SELÊNIO NA CINÉTICA DE
PROLIFERAÇÃO CELULAR, CITOTOXICIDADE, INDUÇÃO DE
APOPTOSE E EXPRESSÃO DOS GENES *CASP9*, *BCL-XL* E *APC*
EM CÉLULAS HT29.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular), da
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Lúcia Regina Ribeiro.
Universidade Estadual Paulista.

Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro
Universidade Federal de São Paulo

Prof^a Dr^a Maria Izabel Camargo Mathias
Universidade Estadual Paulista

Fevereiro- 2011

Dedicatória

Senhor Jesus, é a Ti, primeiramente a Ti, que dedico este trabalho. O Senhor da providência, o Deus de amor, que com sua infinita misericórdia permitiu que eu chegasse ao fim de mais uma batalha. Sei que em Ti posso confiar e que nunca me faltará.

Aos meus amados pais, Ana Maria e Osvaldo,

Dedico a vocês esta dissertação... A muito me lembro, quando eu era pequena das coisas que vocês me falavam, mas as lembranças mais vivas são das coisas que faziam. Sempre achei importante ler, e raramente consigo dormir sem folhear um livro ou uma revista, costume esse que adquiri vendo minha mãe antes de dormir lendo sempre algum livro. Eu achava que isso era coisa de “gente grande” e como toda criança a imitava, e assim aprendi que um bom livro pode ser uma ótima companhia e nos dar muito prazer. Já meu pai, com sua “biblioteca” me mostrou como é bonito amar o saber. Sempre envolto por livros (lendo às vezes três ao mesmo tempo) e sempre sabendo conversar sobre tudo e com todos, me ensinou que saber nunca é demais e que nunca saberemos o suficiente. E é essa busca eterna que nos faz crescer e perceber quão grande é o mundo que vivemos, e assim aprendemos a ser cada vez mais simples e humildes. E desta forma aprendi com vocês, meus queridos, que a maior e mais bela herança que construíram para mim foi a de amar a busca pelo saber, pois haja o que houver, isso ninguém pode tirar de mim.

Amo vocês dois, imensamente, cada um do seu jeitinho...

Ao meu esposo, Rodrigo,

Às vezes acho que casamos não só por amor, mas porque amamos. Digo isso, pois temos as mesmas paixões... A primeira delas é a dança, e como amamos dançar! E como é bom dançar com você! Fechar os olhos e sentir sua mão me guiar. Nas nuvens, lá é meu destino. Mas a segunda paixão é menos romântica, e muito mais presente em nosso cotidiano. E ela é a pesquisa. Foi com você que aprendi que pesquisar, antes de tudo, exige paixão. Na verdade foi você quem me incentivou e mostrou que é possível, que eu era capaz de seguir esse caminho. Acho lindo e impressionante sua força de vontade, a sua busca pelo crescimento. E quando tudo parece tranquilo, em ordem, lembro de você falando que para crescer é necessário lutar. E por isso não devo ficar tranquila, em ordem e sim correndo atrás de meus sonhos.

E somos assim, apaixonados pela vida. E nos encontramos, nos apaixonamos, nos amamos e no meio de tanto sentimento bom, vimos que juntos poderíamos unir paixões, corações e a vida. Te amo.

Agradecimientos

A minha orientadora, Prof. Dr. Lúcia Regina Ribeiro,

Muito obrigada. Estas são as duas palavras mais simples e honestas que posso lhe oferecer. Muito obrigada por acreditar em mim, e sei como acreditou! Ter a Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro como orientadora é um desafio, pois exercitamos todo tempo nossa capacidade de superação. Mas acredito que é assim que todo o orientador deve ser. A Dra. Lúcia é exigente com o trabalho feito, é profissional e por isso exige que sejamos profissionais e assim aprendi a ser. Já trabalhar com a Lúcia (não mais a Dra.), a pessoa Lúcia, é uma delícia! Sua energia e vibração são contagiantes, estar ao seu lado nos faz perceber que sempre podemos fazer mais e melhor, pois ela sempre faz mais e melhor! E acima de tudo, com alegria. Ter a Profa. Dra./pessoa Lúcia como orientadora é uma oportunidade que agradeço sempre. Obrigada por aceitar a enfrentar esta jornada comigo.

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani,

Tenho tanto a agradecer. O desenvolvimento da prática em seu laboratório foi importantíssimo para o meu crescimento. Ter a oportunidade de discutir os passos a serem dados e os resultados obtidos com uma pessoa de tamanho conhecimento me fez perceber as inúmeras nuances que uma pesquisa possui. Obrigada por ser tão acessível, amigável e indiscutivelmente tão profissional.

Aos Professores presentes na banca de qualificação e na banca de defesa da dissertação: Prof. Dr. Maria Izabel, Prof. Dr. Carmen e Prof. Dr. Daniel,

Obrigada pelo auxílio e colaboração no trabalho realizado. Agradeço também a disponibilidade de ajudar-me no fim desta jornada.

Rachel, minha irmã,

Minha flor... Amo tanto. Amo tanto sua presença em minha vida. Quando paro e penso no que já vivi sempre vejo você ao meu lado, ou melhor, de mãos dadas comigo. Tem sido tão difícil chegar em casa e não ouvir sua voz... Tem horas que quero tanto sua presença... Mas o amor que nos une é imensamente maior que a

distância que agora nos separa. Obrigada, por mais uma vez estar comigo. Te amo!

Minhas princesas, Marina e Maria Júlia;

É bem assim que as vejo, princesas. Sabe aquelas princesas de filme? Meio rebelde que luta por um ideal? Assim são vocês, uma mistura de delicadeza com valentia. Minhas valentes! E com vocês aprendi que ser persistente faz parte do nosso crescer. Obrigada por me mostrarem isso. Persistam sempre! Amo vocês!

A "tia" Iris;

Agradeço pelo seu carinho e cuidado. Sempre atenciosa faz com que sempre nos sintamos especiais, mas especial mesmo é você. Obrigada por sempre me apoiar, por sempre torcer por mim e por cuidar com tanto amor do meu pai e de minhas irmãs. Obrigada por fazer parte do que sou.

Ao Braga;

Braga, às vezes penso no quanto sua vida mudou, como você é próspero. São incontestáveis as bênçãos de Deus em tudo isso. Mas sei que sem sua força de vontade, sem sua visão e persistência, nada teria acontecido. E muitas vezes olho para tudo isso e percebo que é assim que deve ser. Nossa vida tem que ser batalhada. Obrigada pelo exemplo!

A minha família mineira;

Queridos, obrigada por me receberem de braços abertos. Sinto sempre o carinho e o cuidado que vocês têm comigo e com o Rodrigo. Em especial, agradeço a D. Sônia, com seu coração do tamanho do mundo, pensa sempre em tudo nos mais simples detalhes. Obrigada por sempre serem gentis e alegres.

À Sakurá (Priscila Lumi Ishii),

Se há uma pessoa que lutou nesse mestrado comigo, foi você! E como demos risadas, e como choramos, e como você me ouviu, e como comemos! Muito mais que isso, como nos conhecemos. E assim nasceu uma amizade sincera e eterna. Obrigada “Sakurá” por perfumar meus dias!

Aos meus queridos colegas de laboratório: Daniele, Simone, Elisia, Marcela, Natália, Diogo, Juliana, Andressa e Sandra,

Obrigada por me acolherem no laboratório, por me ajudarem com as técnicas *in vitro*, que antes eram para mim desconhecidas. Obrigada pelo carinho, pela alegria, pela solidariedade e amizade. Muito obrigada!

A querida Eliane,

Li, ter você por perto no mestrado me fez amadurecer muito. Sempre disposta a ajudar me aconselhou em diversos momentos. Mas, além disso, perceber a sua fé, a sua paz e seu profissionalismo, me fez acreditar ainda mais nas pessoas. Sua bondade e amor me mostraram que ainda há muito mais a ser feito pelo mundo e por quem amamos. Obrigada.

A querida Amiga Patty Oliveira,

Vinícius de Moraes já dizia que “a vida é a arte do encontro”, e encontrar você foi tão belo quanto à arte! Ter sua amizade é a prova que o carinho entre duas pessoas surge de pequenas coisas. Obrigada por todo seu cuidado e atenção, obrigada por sempre ser tão receptiva e disposta a ajudar.

Ao técnico Vário Paschoal,

Obrigada pela atenção e disposição em ajudar. Seu trabalho é fundamental para o desenvolvimento do nosso. Sempre nos incentivando, suas palavras nos ajudam a vencer.

A querida Profª Msc. Elaine de Moraes

Muito obrigada por me ajudar com as correções de português. Seu carinho e atenção com meu trabalho foram especiais. Saiba que serei eternamente grata!

A Rosemary D. Oliveira S. Cardoso;

Obrigada por sempre ser tão prestativa e solícita. Com certeza seu trabalho é essencial para a nossa formação.

Ao CNPq e à CAPES

Pela bolsa de Mestrado que me foi concedida pela CAPES e por todo o auxílio financeiro destes dois órgãos de fomento.

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las.
Que tristes os caminhos, se não
fora a mágica presença das
estrelas!”

Mário Quintana

RESUMO

Cânceres intestinais são correlacionados com a dieta. Assim, a determinação e compreensão das interações nutriente-genoma é importante. O presente trabalho avaliou a ação do selênio oligoelemento na citotoxicidade de proliferação celular, e na indução de apoptose *in situ* e na expressão dos genes *CASP9*, *BCL-XL* e *APC* em células de adenocarcinoma intestinal (HT29). Células HT29 foram cultivadas e tratadas com selênio nas concentrações de 5, 50 e 500 ng/mL, com ou sem o agente indutor de danos doxorrubicina. Essas células foram então avaliadas por meio do ensaio de citotoxicidade (MTT), proliferação celular e na indução de apoptose *in situ*. Para avaliar a expressão gênica, apenas as células tratadas com 500 ng/mL de selênio foram utilizadas. O RNA foi extraído a partir dessas células, e as expressões de *CASP9*, *BCL-XL* e *APC* foram analisadas pelo método de RT-PCR. O gene *GAPDH* foi utilizado como gene de referência. O MTT mostrou que o selênio não foi tóxico em qualquer uma das concentrações testadas. O ensaio de proliferação celular mostrou que o selênio não interfere com a proliferação celular nas três concentrações testadas. Em contraste, quando as três concentrações foram combinadas com a doxorrubicina, uma diminuição significativa na taxa de proliferação celular foi observada. A taxa de apoptose foi significativamente maior no selênio (500 ng/mL) e doxorrubicina. A expressão *CASP9* foi aumentada e expressão *BCL-XL* diminuiu no selênio (500 ng/mL) e o grupo de doxorrubicina. A expressão do gene *APC* foi significativamente maior no grupo selênio sozinho. Estes resultados mostram que a apoptose selênio aumenta, especialmente quando está associado com um agente de indução de danos. Além disso, o selênio tem um papel importante na expressão do gene *APC*, que está relacionada com a regulação do ciclo celular.

Palavras-chave: Selênio, *CASP9*, *APC*, *BCL-XL*, proliferação, apoptose.

ABSTRACT

Intestinal cancers are correlated with diet. Thus, determining and understanding nutrient-genome interactions is important. The present work assessed the action of the oligoelement selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and *in situ* apoptosis induction and on the expression *CASP9*, *BCL-XL* and *APC* genes in intestinal adenocarcinoma cells (HT29). HT29 cells were cultured and treated with selenium at concentrations of 5, 50 and 500 ng/mL with or without the damage-inducing agent doxorubicin. These cells were then evaluated for cytotoxicity (MTT), cell proliferation and *in situ* apoptosis induction. To evaluate gene expression, only the cells treated with 500 ng/mL of selenium were used. RNA was extracted from these cells, and the expressions of *CASP9*, *BCL-XL* and *APC* were analyzed by the RT-PCR method. The GAPDH gene was used as a reference gene. The MTT assay showed that selenium was not cytotoxic at any of the concentrations tested. The cell proliferation assay showed that selenium did not interfere with cell proliferation at the three concentrations tested. In contrast, when the three concentrations were combined with doxorubicin, a significant decrease in the proliferation rate was observed. The apoptosis rate was significantly increased in the selenium (500 ng/mL) and doxorubicin group. *CASP9* expression was increased and *BCL-XL* expression decreased in the selenium (500 ng/mL) and doxorubicin group. *APC* was significantly increased in the selenium group alone. These results show that selenium increases apoptosis, especially when it is associated with a damage-inducing agent. Also, selenium has an important role in the expression of the *APC* gene, which is related to cell cycle regulation.

Key words: Selenium; oligoelement; gene expression; RNA.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Considerações iniciais.....	19
1.2 Nutrigenômica.....	20
1.3 Adenocarcinoma intestinal.....	21
1.4 Selênio.....	23
1.5 O selênio e sua ação antitumoral.....	26
1.6 Proliferação celular.....	27
1.6.1 Gene APC	28
1.7 Apoptose.....	29
1.7.1 Gene CASP 9.....	33
1.7.2 Gene BCL-XL.....	34
1.8 Ensaio biológicos.....	35
1.8.1 Ensaio de citotoxicidade.....	35
1.8.2 Cinética de proliferação celular e ensaio de viabilidade celular.....	36
1.8.3 Detecção de apoptose in situ.....	37
1.8.4 PCR em tempo real.....	38
1.9 Referências.....	40
II. OBJETIVOS.....	51
2.1 Objetivo geral.....	51
2.2 Objetivos específicos.....	51
III. RESULTADOS.....	53
1. Introduction.....	54
2. Material and Methods.....	55
2.1 Cell line and culture conditions.....	55
2.2 Chemical agents.....	56
2.3 Cytotoxicity assay.....	56
2.4 Cell proliferation assay	56
2.5 Cell viability assay.....	57

2.6 <i>In situ</i> apoptosis detection assay.....	57
2.7 Real time PCR (RT-PCR).....	58
2.8 Statistical analysis.....	59
3. Results.....	59
3.1 Cytotoxicity assay.....	59
3.2 Cell proliferation analysis.....	59
3.3 Cell viability.....	60
3.5 <i>In situ</i> apoptosis assay.....	60
3.5.1 <i>CASP 9</i> gene expression.....	60
3.5.2 <i>BCL-XL</i> gene expression.....	61
3.5.3 <i>APC</i> gene expression.....	61
4. Discussion.....	61
5. References.....	65
VI. CONCLUSÕES.....	80
V. ANEXO.....	82

INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

O século XX foi marcado por um aumento da expectativa de vida da população, uma vez que, com o advento de medicamentos contra patógenos infecciosos, o número de mortes por doenças agudas diminuiu significativamente. Em contrapartida, cada vez mais as doenças crônicas degenerativas, tais como doenças cardiovasculares, doenças cerebrovasculares e cânceres têm aumentado sua incidência. Diferentemente das doenças agudas, as doenças crônicas têm origens multifatoriais, e são cada vez mais agravadas com a evolução da sociedade (FERGUSON, 1994).

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

Dentre os agentes que vêm sendo analisados quanto ao potencial quimioprotetor para o câncer, os componentes da dieta têm sido os mais bem avaliados, visto que o consumo adequado de determinados alimentos tem a propriedade de proteger o DNA e, conseqüentemente, evitar o desenvolvimento de diversos cânceres (POOL-ZOBEL, 2002). Nesse sentido, estudos epidemiológicos têm demonstrado associações estatisticamente significativas entre dieta e estilo de vida, com aumento da incidência e severidade de doenças crônicas (KOLONEL et al., 2004). Tais estudos apresentam evidências de que os alimentos fornecem nutrientes e substâncias bioativas que podem alterar a expressão gênica (KAPUT et al., 2007a).

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

Atualmente, está claro que a deficiência de certos nutrientes aumenta o risco de doenças, e, por outro lado, a níveis altos de ingestão, muitos nutrientes podem não mais ser benéficos, e o risco de doenças pode aumentar. Além disso, a resposta a um determinado nutriente não é a mesma para todos os indivíduos (KAPUT, 2007b). Por razões metabólicas, ambientais ou genéticas, os indivíduos apresentam diferentes respostas a nutrientes e alimentos, e isso se reflete em diferentes níveis de benefícios e riscos à ingestão de um mesmo nutriente. Assim, a ingestão particular de um nutriente pode oferecer risco a alguns indivíduos, mas não a outros, ou um benefício a alguns indivíduos e não a outros (KAPUT, 2007b). Dessa forma, entende-se a necessidade de se avaliar diversos micronutrientes e a sua interação com o genoma celular.

A atividade antioxidante do selênio, por exemplo, parece ser responsável pela sua eficácia no tratamento de doenças que têm como processo central do seu desenvolvimento o estresse oxidativo. Além da atividade antioxidante, determinados compostos de selênio apresentam atividades neuroprotetoras, antiinflamatórias, hepatoprotetoras, apoptóticas e, em especial, anticarcinogênicas (EL-BAYOUMY, 1991a; STAPLETON et al., 2000, ROSSATO et al., 2002; PORCIÚNCULA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2003; BURGUER et al., 2005; ZASSO et al., 2005; BORGES et al., 2006). Devido a tais aspectos citados anteriormente, na última década, têm crescido o interesse pela investigação dos papéis de diferentes compostos de selênio como agente terapêutico em diversas doenças crônicas degenerativas, tais como os cânceres.

O câncer colorretal é o segundo tipo de câncer mais diagnosticado em países desenvolvidos, sendo também o segundo maior em mortalidade (STEVENS et al., 2006). Sendo esta uma patologia intimamente relacionada ao

estresse oxidativo, a eventos apoptóticos, e em especial à dieta, (PIENTA et al., 1989; BOS e KREIJL, 1992; PITOT, 1993; KERR et al., 1994; POOL-ZOBEL, 2002; BUDDINGTON et al., 2007), células de adenocarcinoma intestinal (HT29) tornam-se uma boa ferramenta de estudo da atividade do selênio.

No presente estudo o micronutriente selênio foi avaliado de acordo com sua ação na cinética de proliferação celular, citotoxicidade, indução de apoptose e conforme a expressão gênica em células de adenocarcinoma intestinal.

1.2 Nutrigenômica

A genômica nutricional está baseada nos conceitos e dados de disciplinas que historicamente têm sido consideradas campos diferenciados da pesquisa (KAPUT e RODRIGUES, 2004). O aspecto mais distinto da nutrigenômica é o estudo da associação gene-dieta, a qual utiliza métodos de genética molecular, epidemiologia e bioinformática para encontrar associações estatísticas entre genes, alimentos e aspectos biológicos (KAPUT et al., 2007a).

Essa associação é baseada na ocorrência natural dos componentes alimentares e na incidência de doenças crônicas na população. Os resultados desses estudos garantem informação e conhecimento das influências ambientais no desenvolvimento da saúde e da doença, e de como os alimentos podem alterar a expressão molecular da informação genética em cada indivíduo (KAPUT et al., 2007b; FOGG-JONHSON e KAPUT, 2003).

Pesquisadores há muito suspeitam que diferenças genéticas entre indivíduos sejam responsáveis pelas variadas respostas ao ambiente, em particular a dieta, a qual é um dos maiores e mais constantes fatores a que os genes estão expostos durante a vida (FOGG-JONHSON e KAPUT, 2003). Tais variações são a razão pela qual alguns indivíduos consomem dietas inadequadas e passíveis de favorecerem o desenvolvimento de uma doença crônica, mas não a desenvolvem. Em contrapartida, muitas pessoas que consomem uma dieta similar

podem apresentar doenças crônicas extremamente agressivas (FOGG-JONHSON e KAPUT, 2003).

Isso é possível uma vez que a ocorrência de doenças crônicas se dá por uma combinação de fatores, que atuam ao mesmo tempo. Tais fatores podem incluir variantes genéticas comuns (por exemplo: polimorfismos de um único nucleotídeo – SNP, haplótipos e números de genes) e sua relação com o meio ambiente (KAPUT, 2004). Aliás, os fatores genéticos não só contribuem para a complexidade da doença como também são difíceis de detectar, pois eles inserem pequenos efeitos na patologia por longos períodos. No entanto esses genes e as alterações ambientais tais como estilo de vida e dieta podem modificar a magnitude da doença (HESKETH, 2009).

Assim sendo, o objetivo da nutrigenômica é personalizar a dieta e contribuir na prevenção de doenças, ampliando esse conhecimento molecular para o mercado consumidor. Através da análise da expressão genética, SNP, haplótipos, resultados bioquímicos e fisiológicos, pesquisadores têm alcançado essa meta, verificando respostas individuais e de grupos que atendem de forma muito particular a diferentes dietas (FOGG-JONHSON e KAPUT, 2003).

Dessa forma, entende-se que a nutrigenômica está trazendo uma nova era para a pesquisa genética, na qual cada alteração interindividual é utilizada para investigar seus mecanismos nutricionais. Para tanto, essa nova área da pesquisa utiliza ferramentas moleculares, tais como transcriptômica, proteômica e metabolômica, para entender e distinguir quais alterações afetam uma gama de vias bioquímicas que alteram a expressão gênica e a função celular (HESKETH, 2009)

1.3 Adenocarcinoma intestinal

Câncer é o termo genérico para designar neoplasias malignas - um grupo de variadas doenças crônicas de causas múltiplas. A característica básica de um câncer é a transmissão de anormalidades celulares, manifestada por alterações moleculares e morfológicas. Tais alterações ocorrem devido a

modificações na expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais, que controlam atividades celulares essenciais, como proliferação, diferenciação e apoptose (PIENTA et al., 1989; BOS e KREIJL, 1992; PITOT, 1993; KERR et al., 1994; POOL-ZOBEL et al., 2002).

Sabe-se que a grande expansão dessa doença na sociedade moderna tem levado à preocupação social, política e científica, sendo este, então, um problema de saúde pública (INCA, 2010), o que justifica grande parte da preocupação atual com resíduos industriais, urbanos, domésticos e agrônômicos, que são decorrentes de ações antropogênicas (OLIVEIRA, 2006). Tais resíduos contaminam o ambiente e, conseqüentemente, afetam os seres humanos de variadas formas. Assim, percebe-se que uma multiplicidade de fatores podem causar doenças crônicas como o câncer.

Etiologicamente o aparecimento de cânceres, em especial o câncer colorretal, se dá por inúmeros fatores, como a dieta, a relação com o meio ambiente e até fatores propriamente genéticos, mas há consideráveis evidências de que a flora bacteriana do intestino está envolvida no desenvolvimento de câncer de cólon/reto. Tal fato aumentou o interesse em dietas que contenham agentes que possam modificar a microflora e diminuir o potencial de risco de câncer colorretal (McBAIN e McFARLANE, 2001; BURNS, 2004).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2010), a estimativa de números novos deste tipo de câncer, no Brasil, no ano de 2010, foi de 11.390 casos em homens e 13.970 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 12 novos casos a cada 100.000 homens, e 15 novos casos a cada 100.000 mulheres. A alta incidência do câncer colorretal em países desenvolvidos ou em desenvolvimento (tal como o Brasil) indica a necessidade de pesquisas que avaliem e previnam esse tipo de câncer.

Dentre os fatores que levam ao desenvolvimento dessa neoplasia específica, as mudanças genéticas que induzem transformações da mucosa intestinal podem levar a tumores malignos. Alterações como deleções, rearranjos e mutações podem levar à inativação ou à ativação de genes específicos. Em consequência dessas alterações genéticas, detecções precoces das mudanças

citadas são possíveis devido à presença de biomarcadores, em especial biomarcadores genéticos (CHENG e LAI, 2003). As alterações genéticas mais importantes, no desenvolvimento de cânceres colorretal, ocorrem no *K-ras*, *APC* e mutações no *TP53*, além do aumento da expressão imunohistoquímica de antígenos carcinoembrionários e β -catenina (CHENG e LAI, 2003).

A multiplicidade de fatores que ocasionam a formação dessa neoplasia permite verificar, portanto, que fatores genéticos aliados a uma dieta rica em gordura e carnes vermelhas, e a baixa ingestão de frutas, verduras e cereais desencadeiam o desenvolvimento de tumores colorretais (STEVENS, 2006; INCA, 2010).

Devido a ligação íntima entre este tipo de tumor e a alimentação, células de tumores colorretais, tais como as células HT29, utilizadas no estudo aqui descrito, são importantes para a avaliação da interação de compostos da dieta e de genes relacionados a tumorigênese.

1.4 Selênio

O químico sueco J.J. Berzelius foi o primeiro a descrever o selênio (Se) no ano de 1817, elemento localizado no grupo VI da tabela periódica, podendo ser encontrado em quatro diferentes estados de oxidação: Se^0 , Se^{+4} , Se^{+6} , Se^{-2} . O Se compartilha propriedades físicas e químicas com o enxofre (S). Tal similaridade permite uma substituição do enxofre (S) por selênio (Se) em diversas reações químicas que ocorrem nos sistemas biológicos. Por outro lado, as diferenças nas propriedades físicas e químicas entre esses elementos constituem a base específica de seus respectivos papéis biológicos (BARBOSA, 2006).

A bioquímica do Se sugere que ele se encontra, nos sistemas biológicos, sob a forma de selenol (R-SeH). Selenóis são compostos correspondentes a forma de tióis (R-SH), em que o átomo de Se é substituído pelo átomo de enxofre. A principal diferença química entre selenóis e tióis está relacionada a suas respectivas constantes de dissociação e seus caracteres

nucleofílicos (BECK et al., 1998; BECK et al., 2003)). Devido ao maior caráter nucleofílico, os selenóis são capazes de reduzir dissulfetos e sulfóxidos, sendo esta uma importante característica biológica, já que estes compostos atuam diretamente na atividade de enzimas de detoxificação.

Na década de 70, o micronutriente Se foi relatado como essencial à saúde humana. Naquele período, estudos revelaram que uma cardiomiopatia endêmica na China (doença de Keshan) ocorria devido à combinação de uma severa deficiência de Se e uma infecção viral (BECK et al., 1998; BECK et al., 2003).

A partir dessa constatação, sugeriu-se que o Se pode atuar em inúmeros processos fisiológicos e patológicos - o que o transformou este elemento em objeto de diversos estudos, que geraram resultados relevantes como o fato de o Se ser comprovadamente atuante em processos como função imune, supressão viral (BECK et al., 2003; BROOME et al., 2004; SHERIDAN et al., 2007), fertilidade masculina, função tireoidiana e ação antitumoral (RAYMAN, 2002; WHANGER, 2004).

O Se é principalmente encontrado em oleaginosas como a castanha-do-brasil (*Bertholletia exelsa* L.), cereais integrais, ostras e crustáceos, carne suína, aves, carne bovina e de peixes, sendo que o consumo recomendado de Se é de 75µg/dia para homens e 60µg/dia para mulheres (CLARCK et al., 1996). Na Tabela 1, apresentam-se os alimentos que são fontes de selênio, e a quantidade presente em cada um deles, em µg, por meio de medida utilizada pela população, segundo Ferreira e colaboradores (2006).

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

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

Fonte: Ferreira (2002).

As funções fisiológicas do Se são resultado da existência de selenoproteínas, nas quais estão presentes o aminoácido selenocisteína. Tradicionalmente, pensava-se que havia cerca de 20 aminoácidos. No entanto, a descoberta de selenoproteínas levou à definição de 21 aminoácidos, incluindo a selenocisteína (Sec). Este aminoácido é muito semelhante à cisteína, mas

incorpora selênio em vez de enxofre. O Se foi primeiramente demonstrado como o componente essencial da glutathione peroxidase e, conseqüentemente, foi encontrado em 25 diferentes proteínas de mamíferos (STADTMAN, 1996; HATFIELD e GALDYSHEV, 2002; KRYUKOV et al., 2003). O aminoácido selenocisteína é incorporado à sequência de aminoácidos das selenoproteínas durante a tradução, sendo reconhecido por meio do códon UGA na região codificadora do RNA mensageiro (RNAm) (HATFIELD e GALDYSHEV, 2002). A incorporação do Se requer estruturas específicas na região 3', não traduzida nos RNAm das selenoproteínas. Dessa forma, a expressão de selenoproteínas depende de dois importantes fatores: o consumo alimentar de selênio e fatores genéticos (BERRY, 2005).

Na maioria dos casos estudados até agora, a selenocisteína está presente no sítio ativo de enzimas com atividades óxido-redutoras, sendo estas as selenoproteínas melhor caracterizadas: I) Glutathione peroxidases; II) Glutathione S-transferase; III) Thioredoxin reductases; IV) Deiodinases; V) Selenoproteína P (HESKETH, 2009). Estas enzimas contribuem para a atividade antioxidante, além de atuarem no armazenamento de Se, metabolismo e transporte de outra enzima atuante na oxiredução, a metionina óxido redutase, além do funcionamento do retículo endoplasmático (PAPP et al., 2007).

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

1.5 O Selênio e sua atuação antitumoral.

A atividade anticarcinogênica do selênio foi relatada apenas 12 anos após sua descoberta como elemento traço essencial, período em que se relacionou a deficiência do Se com o aumento no desenvolvimento de diversos

cânceres (BECK et al., 1998; BECK et al., 2003)). A partir desse momento, inúmeros estudos demonstraram que a suplementação com Se era capaz de prevenir, reduzir ou inibir o processo de carcinogênese experimental em diferentes tipos de cânceres (NAYINI et al., 1991; EL-BAYOUMY et al., 1991b; COMBS e GRAY, 1998, UNNI et al., 2004; BERMANO et al., 2007; ZENG et al., 2008; REAGEN-SHAW et al., 2008).

As atividades quimioprotetoras do Se contra diferentes neoplasias parecem ser oriundas de variados mecanismos. Em doses farmacológicas, tais efeitos parecem estar associados ao fato de o Se ser componente de enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase e a S-transferase (BARBOSA, 2006).

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

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

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

Dessa forma, torna-se importante entender os mecanismos proliferativos e apoptóticos de células quando estas estão submetidas a tratamentos com selênio para que seja possível compreender a atuação desse micronutriente em células de tumores colorretais.

1.6 Proliferação celular

A proliferação celular normal é controlada por reguladores extracelulares, intracelulares e fatores peptídicos de crescimento, sendo este evento importante na manutenção da população celular. Dois tipos principais de produtos gênicos participam da resposta celular a estes reguladores extracelulares - os produtos de proto-oncogenes e de genes supressores de tumor. Alterações de tais produtos podem levar ao aparecimento de tumores (GUEMBAROVSKI e CÓLUS, 2008).

Os proto-oncogenes são genes celulares reguladores fisiológicos que atuam no controle positivo, ou seja, estimulam o crescimento e a diferenciação celular (IRISH & BERNSTEIN, 1993). São genes capazes de induzir ou de manter a transformação celular em animais experimentais ou em culturas de células. Podem tornar-se oncogenes por meio de mutações resultantes da exposição aos agentes carcinogênicos físicos, químicos ou biológicos. Como exemplos, têm-se os genes *RAS*, *ABL/BCR*, *MYC*, *BCL-2*, *MET*, *RET*, dentre outros (SILVA, 2004; GUEMBAROVSKI e CÓLUS, 2008).

Uma segunda classe de genes, os supressores tumorais, atua como reguladores negativos, ou seja, funciona como freios da proliferação celular (VERMA e TRIANTAFILLOU, 1998). Existem aproximadamente 30 genes supressores tumorais identificados que codificam proteínas reguladoras dos *checkpoints* celulares e inibem a progressão do ciclo celular, caso o DNA esteja danificado. Muitos autores incluem, nesta classe, as proteínas que promovem apoptose e aquelas envolvidas no reparo a danos do DNA. Uma vez que esses genes controlam negativamente a proliferação e a sobrevivência celulares, mutações que levam à perda das funções por eles reguladas podem contribuir para o desenvolvimento de um tumor, como ocorre com os genes *TP53*, *RB1* e *APC* (WEINBERG, 1995).

1.6.1 Gene APC

Classificado como um gene supressor de tumor, o *APC* está localizado no cromossomo 5 (5q21-q22) e produz a proteína *apc*, que regula a quantidade de β -catenina livre no citoplasma. Em condições normais, quando a célula não precisa se multiplicar, a β -catenina se encontra ligada a um complexo E- caderina, inibindo a progressão do ciclo celular. Quando o gene *APC* encontrar-se mutado, produz uma proteína alterada, responsável pelo aumento da porção livre de β -catenina, que é transportada para o núcleo ativando a transcrição de genes de proliferação celular, inclusive o *MYC*. Mutações no gene *APC* provocam Polipose Intestinal Adenomatosa de caráter familiar ou esporádico e síndromes que envolvem câncer colorretal como a Síndrome de Gardner (RAO et al., 1998; SHENG et al., 2010).

1.7 Apoptose

A manutenção da homeostase tecidual nos organismos multicelulares é assegurada por diferentes mecanismos biológicos regulatórios, entre os quais figura a apoptose. O termo apoptose (do grego *apó* = separação, *ptôsis* = queda), adotado pela primeira vez por Kerr e colaboradores (1972), designa uma forma fisiológica de morte celular que ocorre segundo programa genético que desencadeia processo de autodigestão controlada, em consonância com a remoção de células lesadas, senescentes ou não funcionais, sem alteração do microambiente celular (PAROLIN e REASON, 2001).

Além de seu papel fisiológico que regula a população celular, controla os processos de desenvolvimento e morfogênese e limita as reações imunes, a apoptose representa importante mecanismo fisiopatológico de lesão tecidual (PAROLIN e REASON, 2001).

A morte celular programada, definida como a perda da estrutura e de funções vitais das células, é um processo ativo, no qual a marca registrada é o processo de autodigestão controlada por constituintes celulares, em especial por proteases. A ativação dessas proteases compromete a integridade do

citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular. Em resposta à contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma bolhas e há alteração do posicionamento de seus lipídios constituintes (THOMPSON, 1999; PAROLIN e REASON, 2001).

Durante o processo de apoptose, o lipídio fosfatidilserina se expõe no folheto externo da membrana. O novo posicionamento da fosfatidilserina serve como sinalizador para que células fagocíticas das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o processo de degradação (THOMPSON, 1999).

Durante a apoptose, ocorrem alterações características no núcleo celular graças à ativação de endonucleases que degradam o DNA. Como resultado, o núcleo torna-se picnótico e a cromatina se condensa nas porções adjacentes à membrana nuclear. Finalmente, o núcleo entra em colapso e se fragmenta. Simultaneamente, as bolhas que se formam no citoplasma separam a célula em fragmentos circundados por membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas (corpos apoptóticos). Por fim, os restos celulares são fagocitados pelos macrófagos teciduais ou células adjacentes (THOMPSON, 1999; PAROLIN e REASON, 2001).

A apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos através de receptores específicos na superfície celular, chamados receptores da morte, ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como lesão do DNA ou perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas. Essas diferentes vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases, que possuem papel fundamental no processo de morte celular. As proteases armazenadas nos lisossomos ou ativadas no citosol pelo cálcio, que têm espectro amplo de substratos inespecíficos, incluindo proteínas envolvidas no reparo de danos e na replicação do DNA, no ciclo celular, na sinalização de transdução e na manutenção da integridade da estrutura celular. O ataque a todos esses alvos impede o reparo quando se rompe toda a estrutura do citoesqueleto e do núcleo, levando à desestruturação da célula (KERR, 1972; THOMPSON, 1999; PAROLIN e REASON, 2001).

Um dos mecanismos pelos quais a apoptose pode ser deflagrada é através dos receptores de morte presentes na superfície celular, que são ligados em resposta ao acoplamento de ligantes específicos. A maioria identificada dos receptores de morte celular é caracterizada por apresentar porção extracelular rica em cisteína, em uma região citoplasmática denominada de “cadeia da morte” - essencial para a transdução intracelular do sinal de morte (PATEL, 2000; FAUBION et al., 1999).

Além dos receptores de morte, a apoptose pode também ser ativada por sinais de estresse intracelular que resultam em disfunção mitocondrial, tais como lesões no DNA, alterações na via metabólica (aumento do cálcio intracelular, redução do pH e estresse oxidativo), drogas, toxinas e privação dos fatores de crescimento. Na presença de estresse intracelular, ocorrem a translocação de proteínas pró-apoptóticas do citosol para a mitocôndria e a diminuição da expressão de enzimas antiapoptóticas (em especial, da família de genes *BCL-2*). A translocação das enzimas pró-apoptóticas para a mitocôndria resulta na liberação para o citosol do citocromo-c, que ativa outro grupo de enzimas pró-apoptóticas: as caspases (em especial a caspase 9). Em tais circunstâncias, as células entram em apoptose (GALLE et al., 1995).

Estas duas diferentes formas de ativação da apoptose podem ser melhor verificadas na Figura1:

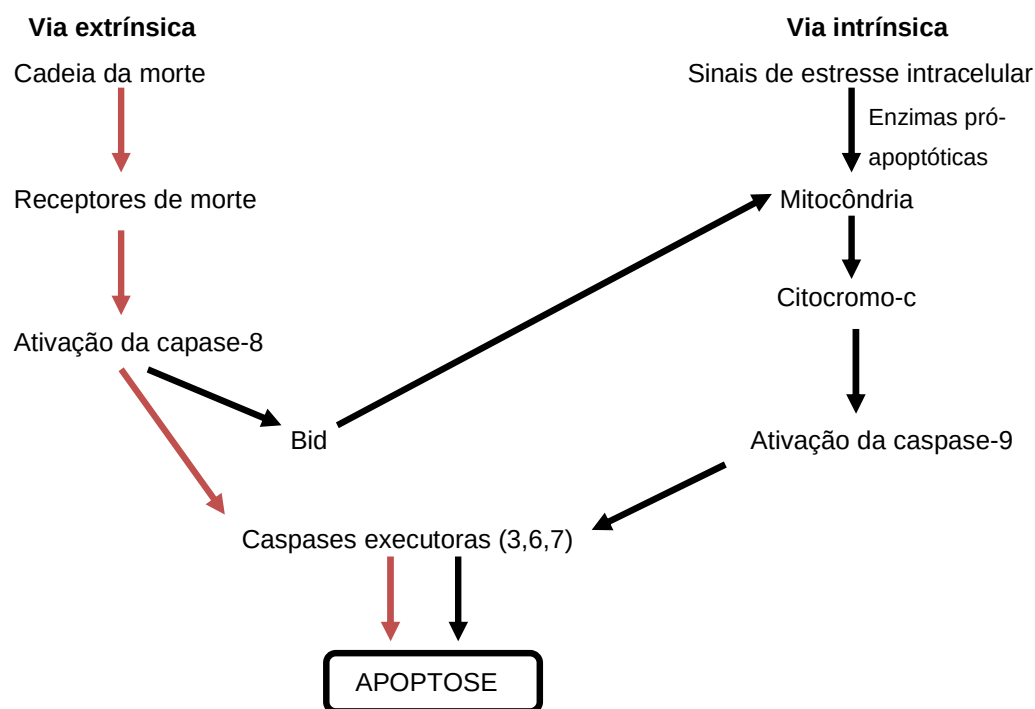


Figura 1. → Indução do apoptose pela “cadeia de morte”. → Indução do apoptose por disfunção mitocondrial. Adaptado por Kaplowitz (2000).

As enzimas óxido-redutoras, em especial as glutathionas peroxidases e s-transferase (nas quais o Se têm fundamental atuação em seu sítio ativo), possuem papel essencial no mecanismo de apoptose. Em condições normais, mais de 95% da glutathiona presente nas células está reduzida, portanto o ambiente intracelular é, normalmente, altamente redutor. Investigações sobre o papel da glutathiona na modulação da sinalização apoptótica sugerem que alterações redoxes no ambiente intracelular, induzidas por agentes citotóxicos, também são moduladas pela geração de espécies reativas do oxigênio e pela extrusão de glutathiona das células (GHIBELLI et al., 1995).

Com base no que foi escrito, Slater e colaboradores (1995) postularam que a perda de glutathiona citoplasmática seria um dos eventos característicos de morte celular por apoptose, através da influência na capacidade redox tamponante da célula, tornando-a intolerante à presença de agentes oxidantes. Quando há uma diminuição também nos níveis de glutathiona mitocondrial, a produção de energia é

afetada e a célula incha sofrendo apoptose tardia. Alguns mecanismos auxiliam nesse evento: o primeiro é desencadeado pela inativação de caspases devido à oxidação do grupo tiol de seus sítios ativos por agentes oxidantes ou S-nitrosilação. No segundo mecanismo, ocorre uma redução nos níveis de ATP na produção de energia, devido à diminuição de função mitocondrial causada pela ação de agentes oxidantes, levando à liberação de citocromo c e à alteração de permeabilidade de membrana mitocondrial (MCCONKEY, 1998; ORRENIUS, 2000).

Levando em consideração esses fatos, torna-se importante o estudo de genes que ativam o apoptose, quando este está relacionado ao estresse oxidativo, tais como o gene *CASP9* e *BCL-XL*.

1.7.1 Caspase 9

A apoptose é um processo essencial para qualquer organismo multicelular e tem vários papéis no organismo: desenvolvimento do tecido embrionário, manutenção constante do número celular e eliminação de células com danos severos no DNA. A regulação da apoptose é vital, já que déficit ou excesso de morte celular pode causar problemas como defeitos no desenvolvimento, neurodegeneração, doenças autoimune e câncer.

Quando uma célula entra em apoptose, as alterações morfológicas observadas são causadas pelas caspases. Caspases são um grupo de enzimas proteases com um resíduo de cisteína capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico, uma especificidade incomum entre proteases. O nome "caspase" é derivado dessa função molecular característica: cysteine-aspartic-acid-proteases. Caspases são essenciais na apoptose celular, que ocorre durante o desenvolvimento e em outras fases da vida adulta.

Algumas caspases também são necessárias no sistema imune para a maturação das citocinas. Falhas na apoptose são uma das contribuições principais para o desenvolvimento de tumores e doenças auto-imunes. Somando-se isso a apoptose indesejada, que ocorre na isquemia ou mal de Alzheimer, despertou-se

rapidamente interesse para as caspases como alvos terapêuticos desde que foram descobertas, em meados da década de 90 (PAROLIN e REASON, 2001; PERES e CURI, 2005).

Existem dois tipos de caspases: caspases iniciadoras e caspases efetoras. Caspases iniciadoras (por exemplo, caspase-8, caspase-9) clivam pró-formas inativas de caspases efetoras, ativando-as; caspases efetoras (por exemplo, caspase-3, caspase-7), por sua vez, clivam outros substratos proteicos da célula, resultando no processo apoptótico. A iniciação da reação em cascata é regulada por inibidores de caspases.

A cascata das caspases pode ser ativada pela granzima B, liberada por linfócitos T citotóxicos, que ativam caspases-3 e -7; receptores de morte (como o ligante FAS, o TRAIL e o TNF) que podem ativar caspases-8 e -10; e o apoptossomo, regulado pelo citocromo c e a família Bcl-2, que ativa a caspase-9. Uma vez que a cascata é ativada, uma resposta retroalimentadora positiva garante que a célula inevitavelmente entre em apoptose: por exemplo, a caspase-9, codificada pelo gene *CASP9*, ativada pelo apoptossomo, cliva e ativa a caspase-3, esta, por sua vez, além de clivar suas proteínas-alvo irá também clivar mais caspase-9, que ativará mais caspase-3, assim sucessivamente (PERES e CURI, 2005).

Outra forma de ativação das caspases é por alteração da membrana plasmática mitocondrial. A mitocôndria participa da manutenção de funções celulares vitais, tais como respiração celular e síntese de ATP, modulação do estado redox da célula, regulação osmótica, controle do pH, homeostasia do cálcio no citosol e sinalização intra-celular. Paradoxalmente, a mitocôndria guarda no espaço intermembranoso substâncias letais, capazes de deflagrar o processo de morte celular, entre as quais figura o citocromo-c. Quando liberado da mitocôndria, o citocromo-c se associa a duas proteínas presentes no citosol – a apaf-1 e a prócaspase-9 – e na presença de ATP, ativa a caspase-9. A caspase-9, por sua vez, ativa as pró-caspases-3 e 7, que executam o processo de apoptose.

1.7.2 BCL-XL

Um número crescente de genes tem sido identificado como capazes de influenciar o processo de apoptose. Entre eles, destaca-se a família das proteínas Bcl-2, que desempenha papel crítico na regulação de apoptose em condições fisiológicas ou patológicas. Pelo menos 15 membros dessa família já foram identificados nos mamíferos. Algumas dessas proteínas, como Bcl-2 e Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 e A1, são antiapoptóticas, enquanto outras, tais como a Bax, Bad e Bid, são próapoptóticas (PATEL e GORES, 1998; PAROLIN e REASON, 2001).

Os principais antagonistas de apoptose, Bcl-2 e Bcl-XL, localizam-se principalmente, na membrana mitocondrial. Essas proteínas são capazes de formar poros condutores de íons em membranas sintéticas. Acredita-se que um dos mecanismos pelos quais elas mantêm a homeostasia celular seja o de regulação da permeabilidade das membranas nas quais se distribuem (PATEL e GORES, 1998, THOMPSON, 1999).

Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, em especial a proteína codificada pelo gene *BCL-XL*, são normalmente encontrados no citosol e, quando ativados, se translocam para a mitocôndria, alterando a permeabilidade da membrana dessa organela, e permitindo o extravazamento de proteínas pró-apoptóticas, tais como o citocromo-c, o fator indutor da apoptose, DNase e pró-caspases 2 e 9 (KERR, 1972; PATEL e GORES, 1998; THOMPSON, 1999).

1.8 Ensaios biológicos

Para a avaliação da atividade do selênio na cinética de proliferação, citotoxicidade, apoptose e expressão gênica, os seguintes ensaios foram realizados:

Ensaio de citotoxicidade, ensaio da cinética de proliferação celular, ensaio de viabilidade celular, detecção da apoptose *in situ* e RT-PCR.

1.8.1 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a produção de cristais de formazano, intensamente coloridos, no interior das células. Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo, o DMSO, permitindo, assim, a sua quantificação através da espectrofotometria. Este método foi sugerido, pela primeira vez, por Mossman (1983).

O autor relata que o sal tetrazólio (MTT) pode ser empregado como um método quantitativo colorimétrico para a avaliação da sobrevivência e da proliferação de células. Ele detecta o sinal gerado pela ativação de células vivas cuja avaliação é realizada por um espectrofotômetro, que apresenta um alto grau de precisão na leitura de incrementos celulares para o estudo de citotoxicidade. As vantagens do método colorimétrico são: a sua rapidez, precisão, além de não ser necessária a utilização de radioisótopo (VIDAL, 2007).

Dessa forma, pode-se avaliar o nível de toxicidade celular quando células de HT29 foram tratadas com selênio em diferentes concentrações.

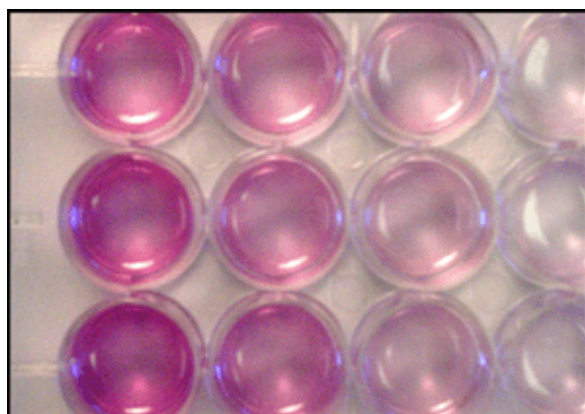


Figura 2. Ensaio de citotoxicidade (MTT).

1.8.2 Cinética de proliferação celular e ensaio de viabilidade celular

O ensaio de proliferação celular é baseado nos estímulos proliferativo e não proliferativos de substâncias *in vitro*. A substância pesquisada é introduzida em culturas de células que respondem ao estímulo, de forma positiva, aumentando sua cinética de proliferação, ou negativa, com o decréscimo de sua proliferação (SOTO et al., 1995).

Os ensaios de proliferação celular permitem visualizar de diferentes modos as alterações celulares, como por exemplo, a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares, provocadas pela ação de certas substâncias. O parâmetro mais utilizado para se testar a atividade de um material atuante em uma cultura de células é a avaliação da viabilidade celular que uma cultura apresenta após permanecer em contato com este material. Esta viabilidade só poderá ser detectada caso seja incorporado ao meio de cultura um corante vital. Tais corantes são captados rapidamente pelas células vivas e atravessam a membrana celular fixando-se na matriz lisossomal e corando as células (VIDAL, 2007).

Quando os materiais testados apresentam-se nocivos às células, estas entram em processo de apoptose, ocorrendo alterações em sua membrana e, conseqüentemente, liberam o corante. Esse processo determina, ao redor e sob o material, uma região com células mortas e descoradas, uma região denominada de “halo de inibição”. Como se vê, é possível diferenciar as células vivas das células mortas pela intensidade ou ausência de coloração que a célula apresenta ao final do ensaio (CIAPETTI et al., 2002).

1.8.3 Detecção de apoptose in situ.

Em 1885, Flemming realizou a primeira descrição morfológica do processo natural de morte celular, atualmente conhecido como apoptose, um termo conferido por Kerr (1972) para descrever a morfologia única associada à morte celular, que a difere de necrose. O autor e seus colaboradores descreveram a

morfologia de amostras de células em processo apoptótico, inicialmente chamado de “necrose de encolhimento”, no qual a célula perde 30% do seu volume por perda de água.

Resumidamente, as principais características do processo de apoptose são: programação da morte celular; em que os estágios iniciais envolvem a clivagem da cromatina e colapso nuclear; condensação do citoplasma, mudanças na membrana plasmática e ausência de inflamação (SAVILL et al., 1990; GOLSTEIN e COHEN, RAFF, 1992).

A utilização de métodos confiáveis e reprodutíveis para identificar e quantificar a apoptose é uma condição preponderante para a diferenciação do comportamento apoptótico nos grupos sinalizados. No presente experimento, portanto, a identificação das células apoptóticas foi feita por análise do padrão de fragmentação do DNA nuclear após coloração com acridina Orange, com colheita realizada seguindo o protocolo de Rovozzo (1973). Além disso, a diferenciação do estado celular é realizada seguindo as características de uma célula em apoptose, como se pode notar na Figura 3.

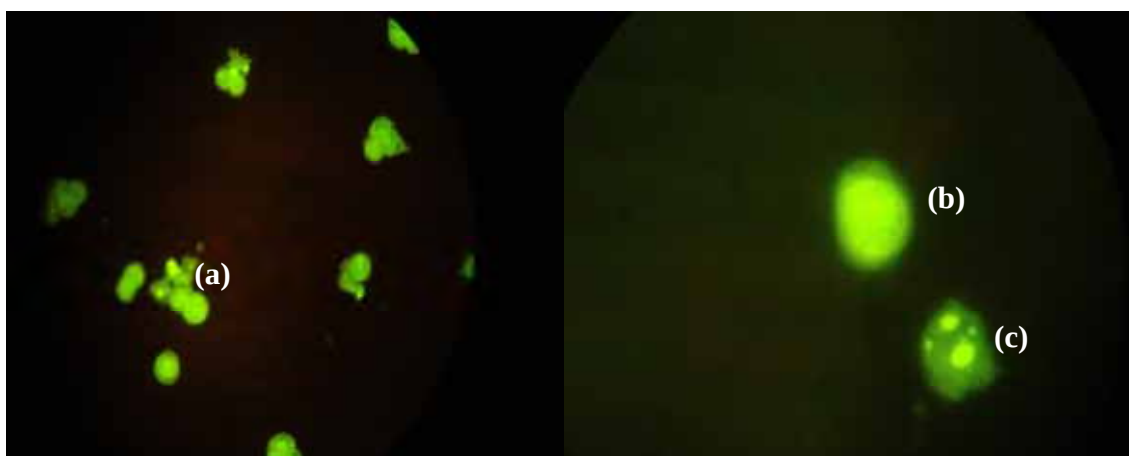


Figura 3: Detecção de apoptose *in situ*. Coloração: Alaranjado de acridina. (a) Corpos apoptóticos; (b) Célula normal; (c) Núcleo cariorrexe

1.8.4 PCR em tempo real

As análises do padrão de expressão de genes em diferentes situações fisiológicas ou patológicas são realizadas através de técnicas, como *Northern blotting*, ensaio de proteção à ribonuclease e transcrição reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), sendo esta última muito empregada hoje em dia graças à implementação da técnica conhecida como RT-PCR quantitativa ou em tempo real (*real time RT-PCR*) (MIR, 2004).

Essa técnica realiza a quantificação dos ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado *Cycle Threshold* (Ct). Este produto permite a quantificação exata e reprodutível, baseado na fluorescência. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. Os compostos fluorescentes mais utilizados são o SYBR Green e TaqMan (NOVAIS et al., 2004; SILVA, 2009).

O SYBR Green se liga a fita dupla de DNA e, com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. As vantagens da utilização do SYBR Green são: baixo custo, facilidade no uso e sensibilidade. A desvantagem é a ligação em todo DNA fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos *primers* e outros produtos inespecíficos, podendo superestimar a concentração do fragmento alvo. O SYBR Green não ligado ao DNA exibe uma fluorescência muito pequena. Entretanto, a fluorescência é realçada quando ligado na fita dupla do DNA.

No começo da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os *primers* e o SYBR Green. As moléculas não-ligadas do SYBR Green apresentam fluorescência fraca, produzindo um sistema mínimo, sendo este subtraído durante a análise de computador. Após o anelamento dos *primers*, algumas moléculas do SYBR Green podem ligar-se na fita dupla previamente

formada. Durante a polimerização catalisada pela enzima *Taq* DNA polimerase, as moléculas do SYBR Green vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. Assim, a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do SYBR Green são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa da extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (NOVAIS et al., 2004).

Já TaqMan é uma sonda (fragmento de DNA marcado, utilizado para hibridizar outra molécula de DNA), utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta, em uma extremidade, um fluoróforo e, na outra extremidade, um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5' – 3' da *Taq* DNA polimerase.

Durante a PCR em tempo real, a sonda TaqMan hibridiza com a sequência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. No processo da amplificação, a sonda TaqMan é degradada devido à atividade exonuclease 5' – 3' da *Taq* DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação, a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida (NOVAIS et al., 2004; SILVA, 2009). A reação com a TaqMan é considerada um método sensível para determinar a presença ou ausência de sequências específicas.

1.9 Referências

ARRIGO, A. P. Gene expression and thiol redox state. **Free Radica. Biol. Med.**, n. 27, p.936-944, 1999.

BARBOSA, N.B.V. **Efeito de compostos orgânicos de selênio em modelos experimentais de câncer e diabetes mellitus.** Santa Maria, 2006.149 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria.

BECK MA, ESWORTHY RS, HO YS, CHU FF. 1998. Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis. **FASEB J.** 12:1143–49, 1998.

BECK MA, LEVANDER OA, HANDY J. Selenium deficiency and viral infection. **J. Nutr.** 133:1463–67S, 2003.

BERMANO G., PAGMANTIDIS, V., HOLLOWAY, N., KADRI, S., MOWAT, N. AG., SHIEL, R.S, ARTHUR, J.S, MATHERS, J.C, DALY, A K., BROOM, J., HESKETH ,J.E. Evidence that a polymorphism within the 3'UTR of glutathione peroxidase 4 is functional and is associated with susceptibility to colorectal cancer. **Genes Nutr.** v. 2, p. 225-232, 2007.

BERRY, M.J; Insights into the hierarchy of selenium incorporation. **Nature Genetics.** V.37, 1162 – 1163, 2005.

BROOME CS, MCARDLE F, KYLE JA, ANDREWS F, LOWE NM. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. **Am. J. Clin. Nutr.** 80:154–62, 2004.

BOS, J.L; KREIJL, C.F. Genes and genes products that regulate proliferation: Critical targets in carcinogenesis. **IARC. Sci. Publ.**, n. 116, p. 57-65, 1992.

BORGES, LP; NOGUEIRA, CW; ROCHA, JBT; ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chemico-Biological Interactions**, 0-0, 2006.

BUDDINGTON, K.K.; DONAHOO, J.B.; BUBBINGTON, R.K.; Dietary oligofructose and inulin Protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. **The J. Nutr.**, v. 132, p. 472-477, 2007.

BURGER, ME; FACHINETTO, R; ZENI, G; ROCHA, JBT. Ebselen attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat brain. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, 608-615, 2005.

BURNS, A.J; ROWLAND, I.R. Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. **Mutation Res.** v.551, p.233-243, 2004.

CHENG, L.; LAI, M.; Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World J. Gastroenterol.**, v.9, p. 2642-2649, 2003.

CIAPETTI, G; GRANCHI, D; SAVARINO L; CENNI, E; MAGRINI, E; BALDINI, N; GIUNTI, A. In vitro testing of the potential for orthopedic bone cements to cause apoptosis of osteoblast-like cells. **Biomaterials** v. 23 (2), 617-627, 2002.

CLARCK, LC; COMBS, GF; TURNBULL, BW; SLATE, E; CHALKER, D.K; CHOW, J. DAVIS, LS; GLOVER, RA; GRAHAM, GF; GROSS, EH; KRONGRAD, A; LESHAR, JL; PARK, HK; SANDERS, BB; SMITH, CL; TAYLOR, JR. Effects of selenium for cancer prevention in patients with carcinoma of skin. **Journal of American Medical Association**, v. 276, 1957-1985, 1996.

COMBS, GF; GRAY, PG. Chemopreventive agents: Selenium. **Pharmacology and Therapeutics**. V. 79, 179-192, 1998.

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

EL-BAYOUMY, K. The role of selenium in cancer prevention. In: Cancer prevention, In: De Vita, VT, HELLMAN S and ROSENBERG SA, (eds), Cancer prevention. Philadelphia: JB. **Lipincott Company**, pp. 1-15, 1991a.

EL-BAYOUMY, K. UPADHYAYA, P.; DATE, V; SOHN,O; FIALA, E.S; REDDY, B. Metabolism of [14c] Benzyl Selenocyanate in the F344 Rat. **Chem Res Toxicol**, 4: 560-565,1991b.

FAUBION, W.A; GUICCIARDI,M.A; MYIOSHI, H; BRONK, S.F; ROBERTS, P.J; SVINGEN, P.A; KAUFMANN, S.H; GORES, G.J. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. **J Clin Invest**. V. 103(1):137–145, 1999.

FERREIRA, S.F; GOMES, J.C; BELLATO, C.R; JORDÃO, C.P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health** 11(3), 2002.

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

FLEMING, J; GHOSE, A; HARRISON, P.R. Molecular mechanisms of cancer preventium by selenium compounds. **Nutr. Cancer** , v: 40, 42-49, 2001.

FOGG-JOHNSON, N.; KAPUT, J. Nutrigenomics: An Emerging Scientific Discipline. **Food Technol.**, v. 57 (4), p. 60-67, 2003.

GALLE PR, HOFMANN WJ, WALCZAK H, SCHALLER H, OTTO G, STREMMEL W, KRAMMER PH, RUNKEL L. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. **J Exp Med** 1182:1223-30, 1995.

GHIBELLI L., COPPOLA S., ROTILIO G., LAFAVIA E., MARESCA V. AND CIRIOLO M. R. Non-oxidative Loss of Glutathione in Apoptosis via GSH Extrusion. **Biochem. Biophys. Research Comm.** v.216 (1), 313-320, 1995

GOLSTEIN, P; OJCIUS, D.M; YOUNG, D.E. Cell death mechanisms and the immune system. **Immunology Review**, v. 121, 29-65.

GUEMBAROVSKY, R.L; CÓLLUS, I.M.S. Câncer uma doença genética. **Genética na escola (SBG)**, 4-7, 2008.

HATFIELD, D. L. & GLADYSHEV, V. N. How selenium has altered our understanding of the genetic code. **Mol. Cell. Biol.** 22: 3565–3576, 2002

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

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa, 2010. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa>> Acesso em: 18 de outubro. 2010

KAPLOWITZ N. Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. **Clin Liver Dis**,4:1-23, 2000.

KAPUT, J. Diet–Disease Gene Interactions. **Nutrition**, v. 20, 26–31, 2004

KAPUT J, RODRIGUEZ RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. **Physiol Genomics** 16: 166–177, 2004.

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

KAPUT J, PERLINA A, HATİPOĞLU B, BARTHOLOMEU A, NIKOLSKY Y. Nutrigenomics: concepts and applications to pharmacogenomics and clinical medicine. **Pharmacogenomics**, 8(4):369-90, 2007b.

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 26:18, 1972.

KERR, J.R.F; WINTERFORD, C.M; HARMON, B.V. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2013-2026, 1994.

KOLONEL, L. N., HENDERSON, B. E., HANKIN, J. H., NOMURA, A. M., WILKENS, L. R., PIKE, M. C., STRAM, D. O., MONROE, K. R., EARLE, M. E. & NAGAMINE, F. S. A multiethnic cohort in Hawaii and Los Angeles: baseline characteristics. **Am. J. Epidemiol.** 151: 346–357, 2004.

KRYUKOV, G.V; CASTELLANO,S; NOVOSELOV, S.V; LOBANOV,A.V; ZEHTAB, O.,GUIGÓ,R; GLADYSHEV, V.N. Characterization of Mammalian Selenoproteomes. **Science**, v. 300 (5624) pp. 1439 – 1443, 2003.

LARSSON, A. et al. (Ed.). Functions of glutathione. Biochemical, physiological toxicological and clinical aspects. **New York: Raven**, 1983.

McBAIN, A.J.; MACFARLANE, G.T.; Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharide metabolism in in-vitro human gut bacterial ecosystems. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 833-842, 2001.

MIR, L. Genômica. São Paulo: Atheneu, 2004.

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.

MCCONKEY, D.J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, v. 99 (3), 157-168, 1998.

NAYINI, J; EL-BAYOUMY, K; RAO, C.V; RIGOTTI, J; SOHN, O.S; REDDY, B.S. Effect o dietary benzylselenocyanate on azoximethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. **Nutrition and cancer**, v:15, 129-139, 1991.

NOGUEIRA, CW; QUINHONES, EB; JUNG, EA; ZENI, G.; ROCHA, JBT. Antiinflammatory and antinociceptive activity of diphenil diselenide. **Inflammation Research**, v. 52, 56-63, 2003.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F.F. PCR em tempo real. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n. 33, p. 10-13, 2004.

OLIVEIRA, R.J; RIBEIRO, L.R.; SILVA, A.F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.1225-1233, 2006.

ORRENIUS,S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicology Letters**. V. 149 (1-3), 19-23, 2000.

PAPP LV, LU J, HOLMGREN A, KHANNA KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid Redox Signal** , v. 9, p. 775–806, 2007.

PAROLIN, M.B; REASSON, R.J. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq Gastroenterol**, v. 38:138-144, 2001.

PATEL T. Apoptosis in hepatic pathophysiology. **Clin Liver Dis**;4:295- 317, 2000.

PATEL,T; GORES, G.J. Apoptosis in liver transplantation: A mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. **Cancer Res** v. 4(1), 42–50,1998.

PERES, C.M; CURI, R. **Como cultivar células**. Ed. Guanabara Koogan, 2005.

PIENTA, K.J; PARTIN, A.W; COFFEY, D.S. Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. **Cancer Res**. V. 49, p. 2525-2532, 1989.

PITOT, H.C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v.72, p. 962-7, 1993.

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

POOL-ZOBEL, B. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. **British J. Of Nutr.** v.93, p. S73-S90, 2005.

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

RAFF, M.C. Social controls on cell survival and cell death. **Nature** v. 356, 397 – 400, 1992.

RAMAKRISHNAN, N.; KALINICH, J.F.; MACCLAIN, D.D. Ebselen inhibition of apoptosis by reduction of peroxides. **Biochemical Pharmacology**, v: 51, 1443-1451, 1996.

RAO, C.V; CHOU, D; SIMI, B; KU, H; REDDY, B.S. Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. **Carcinogenesis**, v. 19, p.1815-1819, 1998.

RAYMAN MP. The argument for increasing selenium intake. **Proc. Nutr. Soc.** 61:203–15, 2002.

REAGEN-SHAW, S., Nihal, M., Ahsan, H., Mukhtar, H., Ahmad, N. Combination of vitamin E and selenium causes an induction of apoptosis of human prostate cancer cells by enhancing Bax/Bcl-2 ratio. **Prostate** V. 68(15): 1624–1634, 2008.

ROVOZZO GC, BURKE CN. **A manual of basic virological techniques**. New Jersey: Prentice Hall, p. 159, 1997.

ROSSATO, J; KELTZER, LA; CENTURIÃO, FB; Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochem Res**, v. 318, 137-140, 2002.

SAVIL, J.S; DRANSFIELD, I; HOGG, N; HASLETT, C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **Nature**, v. 343, 170-173, 1990.

SHERIDAN PA, ZHONG N, CARLSON BA, PERELLA CM, HATFIELD DL. Decreased selenoprotein expression alters the immune response during influenza virus infection in mice. **J. Nutr.** 137:1466–71, 2007.

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

SILVA, A.F. **Efeitos da beta-glucana extraída de *Agaricus blazei* na expressão dos genes *ERCC5*, *CASP9*, *TP53* e *CYP1A1* em células de hepatoma humano**. Londrina, 2009. 55 p. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Londrina.

SILVA, R.L.A. Oncogenes e genes supressores de tumor. IN: Ferreira, C.G.; Rocha, J.C.C. (Org.). **Oncologia Molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

SOTO, J; QUINDÓS, L.S; COS, S.; SÁNCHEZ-BARCELÓ, E.J. Influence of low doses of radiation due to ^{222}Rn on proliferation of fibroblasts and MCF-7 human breast cancer cells in vitro. **Science of The Total Environment**. V. 29, 181-185 1995.

SLATER, F.G; STEFAN, C; NOBEL, I; ORRENIUS, S. The role of intracellular oxidants in apoptosis. **Biochimica Biophys Acta**. v.1271 (1), 59-62, 1995.

SHENG, J, Q; CUI, W.J; FU, L; JIN, P; HAN, Y; LI, S.J; FAN, R.Y; LI, A.Q; ZHANG, M.Z; LI, S.R. APC gene mutations in Chinese familial adenomatous polyposis patients. **World J Gastroenterol**, v. 28 (12), p.1522-1526, 2010.

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

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

STAPLETON, SR. Selenium: na insulin-mimetic. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, 1874-1879, 2000.

STEVENS, R. G.; SWEDE, H.; ROSENBERG, D.W. Epidemiology of colonic aberrant crypt foci : Review and analysis of existing studies. **Cancer lett.** , 2006.

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

THOMPSON, E.W. LCC15 cells are MDA-MB-435: A review of misidentified breast and prostate cell lines. **Clinical & Experimental Metastasis**. 21: 535-541. 1999.

UNNI,E; KITTRELL, F.S; SINGH, U; SINHA, R. *Osteopontin* is a Potential target gene in mouse mammary cancer chemoprevention by Se-methylselenocysteine. **Brest Cancer Research**, v:6 (5), 586-592, 2004.

VERMA, R.S.; TRIANTAFILLOU, N.G. Oncogenetic map of human genome. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 100:88-90, 1998.

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

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

WHANGER PD, BUTLER JA. Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats. **J Nutr** 118:846–852, 2004.

WEINBERG, R.A. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. **Cell**, V. 81,323-330, 1995.

ZASSO, FB; GONÇALES, CEP; JUNG, EAC; ARALDI, D; ZENI, G; ROCHA, JBT; NOGUEIRA, CW. On the mechanisms involved in antinoception induced by dhyphenil diselenide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. V. 19, 283-189, 2005.

ZENG H, COMBS GF JR. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. **J Nutr Biochem** 19:1–7 (2008).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade do micronutriente selênio com relação a citotoxicidade, proliferação celular, indução de apoptose e expressão de genes relacionados a estes eventos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do selênio na célula HT29 por meio do ensaio do MTT;
- Verificar a ação do micronutriente selênio na cinética de proliferação celular de células HT29;
- Averiguar a atividade do selênio frente à indução de apoptose por meio do ensaio de apoptose *in situ*, em células HT29;
- Verificar a expressão do gene *APC*, envolvido no controle de ciclo celular, em células HT29 tratadas com selênio, por meio da técnica de RT-PCR;
- Avaliar a expressão do gene pró-apoptótico *CASP9* após o tratamento de células HT29 com selênio, por meio da técnica de RT-PCR;
- Averiguar o padrão de expressão do gene *BCL-XL*, antiapoptótico, em células HT29 tratadas com selênio, por meio da técnica de RT-PCR.

III. RESULTADOS

Os resultados obtidos estão sendo apresentados sob a forma de um artigo.

TITLE: Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells.

AUTHORS: Mariana de Oliveira Mauro¹, Daniele Sartori², Rodrigo Juliano Oliveira³, Priscila Lumi Ishii¹, Mário Sérgio Mantovani², Lúcia Regina Ribeiro¹.

(1) Graduate Program in Biological Sciences (Cell and Molecular Biology), Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro (SP), Brazil.

(2) General Biology Department, State University of Londrina (UEL), Londrina (PR), Brazil.

(3) Coordination of Open and Distance Education, Graduate Program in Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande (MS), Brazil.

Corresponding author

Mariana de Oliveira Mauro

Phone: +55 (67) 3388-6511

e-mail: mari.mauro@hotmail.com

Abstract

Intestinal cancers are correlated with diet. Thus, determining and understanding nutrient-genome interactions is important. The present work assessed the action of the oligoelement selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and *in situ* apoptosis induction and on the expression *CASP9*, *BCL-XL* and *APC* genes in intestinal adenocarcinoma cells (HT29). HT29 cells were cultured and treated with selenium at concentrations of 5, 50 and 500 ng/mL with or without the damage-inducing agent doxorubicin. These cells were then evaluated for cytotoxicity (MTT), cell proliferation and *in situ* apoptosis induction. To evaluate gene expression, only the cells treated with 500 ng/mL of selenium were used. RNA was extracted from these cells, and the expressions of *CASP9*, *BCL-XL* and *APC* were analyzed by the RT-PCR method. The GAPDH gene was used as a reference gene. The MTT assay showed that selenium was not cytotoxic at any of the concentrations tested. The cell proliferation assay showed that selenium did not interfere with cell proliferation at the three concentrations tested. In contrast, when the three concentrations were combined with doxorubicin, a significant decrease in the proliferation rate was observed. The apoptosis rate was significantly increased in the selenium (500 ng/mL) and doxorubicin group. *CASP9* expression was increased and *BCL-XL* expression decreased in the selenium (500 ng/mL) and doxorubicin group. *APC* was significantly increased in the selenium group alone. These results show that selenium increases apoptosis, especially when it is associated with a damage-inducing agent. Also, selenium has an important role in the expression of the *APC* gene, which is related to cell cycle regulation.

Key words: Selenium; oligoelement; gene expression; RNA.

Introduction

Researchers have long reported that genetic differences between individuals are responsible for various responses to the environment. This is especially true with diet, which is one of the greatest and most constant factor that genes are exposed to throughout life (FOGG-JONHSON and KAPUT, 2003). These variations are why some people can consume unhealthy diets and not develop chronic diseases, but other people develop extremely aggressive, chronic diseases on the same diets (FOGG-JONHSON and KAPUT, 2003). Chronic diseases occur due to a combination of different factors that act concomitantly, such as common genetic variants and the environment (KAPUT, 2007). Genetic factors contribute to disease complexity and are difficult to detect, since they insert small effects of the disease for long periods. However, genetic and environmental changes, such as lifestyle and diet, can modify the disease magnitude (HESKETH, 2009).

Neoplasias (endemic chronic disease) appear to be due to genetic mutations, which are spontaneous or induced by agents (metals, radiation, oxygen free radicals, chronic inflammation and xenobiotics). These agents promote cell-cycle disorders, which lead to increases in cell proliferation rates and/or deficiency in cell death rates. These changes culminate with the formation of clusters of neoplastic cell clones or tumors (FERRARI and TORRES, 2002).

Several studies demonstrate a strong, inverse (negative) association between the consumption of fruits and vegetables and the risk of a variety of cancers and other causes of morbidity and mortality (FLAGG et al., 1995; FERRARI and TORRES, 2001; WEISBURGUER, 2001). For decades, compounds present in foods have been isolated and tested as possible anti-tumor agents, and several micronutrients are among these compounds. It is in this context that the study of nutrigenomics has emerged. Through gene expression, SNP (Single Nucleotide Polymorphism) and haplotype analyses, which are associated with biochemical and physiological results, researchers have verified individuals and groups that respond to different diets (FOGG-JONHSON and KAPUT, 2003).

Epidemiologic studies have shown that a diet deficient in the micronutrient selenium is related to the beginning or progression of a variety of diseases, such as cardiovascular and neurological diseases, cancer and diabetes (REDDI et al., 2001; COMBS, 2006; HESKETH, 2008; JACKSON and COMBS, 2008; ALBANES, 2009, CHAKRABORTY et al, 2009).

Selenium's antioxidant activity seems to be responsible for its efficiency in the treatment of diseases with oxidative stress as a central component in their development. Besides the antioxidant activity, certain selenium compounds possess neuroprotective, anti-inflammatory, hepatoprotective, apoptotic and anti-tumor activities (HESKETH, 2008; PENG et al., 2009; SCHOMBURG, 2009; WALLACE et al., 2009, SUTHERLAND et al., 2010). Therefore, in the last decade, interest in different selenium compounds as therapeutic agents in different diseases has increased.

Colorectal cancer is the second most commonly diagnosed cancer in developed countries and is second in mortality rates (STEVENS et al., 2006). Since this disease is closely related to oxidative stress, apoptosis and diet (PIENTA et al., 1989; BOS and KREIJL, 1992; PITOT, 1993; KERR et al., 1994; POOL-ZOBEL, 2002; BUDDINGTON et al., 2007), intestinal adenocarcinoma cells (HT29) have become a good tool to study selenium activity. The present study evaluated the effects of selenium, in the form of selenomethionine, on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the gene expression of CASP9, BCL-XL and APC in HT29 cells.

2. Material and Methods

2.1 Cell line and culture conditions

The human intestinal adenocarcinoma cell line, HT29, was obtained from the cell bank of the Federal University of Rio de Janeiro. The cells were cultivated in 25 cm² culture flasks in Minimum Essential Medium (MEM; Gibco) that was

supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco) and 1% sodium pyruvate (Gibco). The cells were grown in a CO₂ (5%) incubator that was humidified at 37°C.

2.2 Chemical agents

HT29 cells were treated with doxorubicin (CAS: 23214928; Rubex®), a DNA-damaging agent, at a concentration of 0.1 mg/mL.

For the selenium assays, L-(+)-selenomethionine (C₅H₁₁NO₂; CAS: 3211765; Acros®) was used at the concentrations of 5, 50 and 500 ng/mL. Selenium was diluted in ultrapure water (Milli-Q).

2.3 Cytotoxicity assay

The MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide; CAS 298931; Sigma Aldrich®), assay was performed according to the method described by Mosmann (1983). HT29 cells were seeded (2×10^4 cells/well) in a 24-well culture plate and incubated for a period of 24 hours to stabilize. The cells were then treated with various concentrations of selenium (5, 50, 500 ng/mL), doxorubicin (0.1 mg/mL) and/or ultra-pure Milli-Q water (control) for 24 hours. Next, the treatment medium was discarded, and the plate was incubated at 37°C for 4 hours with MTT diluted in phosphate buffer saline (PBS) at 330 µg/mL. The MTT solution was then discarded, and dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to analyze for cytotoxicity. The plate was read in a spectrophotometer (Uniscience) with a 550 nm filter. The experiments were performed in triplicate.

2.4 Cell proliferation assay

To perform the cell proliferation assay, HT29 cells (2×10^4) were seeded in assay tubes containing 5 mL of culture medium with 5% fetal bovine serum. After a 24-hour stabilization, doxorubicin (0.1 mg/mL), ultrapure water (control), selenium (5, 50 and 500 ng/mL) or selenium (5, 50 and 500 ng/mL) and doxorubicin (0.1

mg/mL) were added to the tubes. Four culture flasks were used for each treatment, and cells were harvested after 24, 48, 72 and 96 hours. The culture medium for each sample was reserved in conical tubes, and the cells were washed twice with PBS (5 mL) and trypsinized with trypsin-EDTA (500 μ L; 0.025%) at 37°C. The trypsin was inactivated with the reserved medium. The sample was centrifuged for 5 minutes at 1000 g x, and the medium was removed until 0.5 mL of cell suspension was left. The cell suspension was then transferred to a Neubauer chamber. This procedure was repeated for all samples at each time point, and the experiments were repeated three times. After all analyses, a cell proliferation curve was obtained.

2.5 Cell viability assay

Cell suspensions (20 μ L) were mixed with trypan blue (20 μ L) to obtain a 1:1 dilution factor, and the mixtures were transferred to a Neubauer chamber. The mixture passes through the grid by capillarity action and is retained between the chamber and the coverslip. A light microscope was used to determine the number of viable and non-viable cells to yield the cell viability (%; greater than or equal to 80%). The assays were performed in triplicate.

2.6 In situ apoptosis detection assay

After acridine orange staining, apoptotic cells were identified by analyzing DNA fragmentation patterns. Cells were treated with selenium (5, 50 and 500 ng/mL) after culture stabilization (24 hours). After 24 hours of treatment, the cells were harvested according to the method described by Rovozzo (1973). After cells were washed with PBS, the coverslips were removed from the culture flask and fixed in Carnoy's fixative I for 5 minutes. The coverslips were quickly immersed in plates containing decreasing concentrations of ethanol (95 to 25%), washed in McIlvaine buffer for 5 minutes, stained with acridine orange (0.01%) for 5 minutes,

and washed with buffer. The experiments were performed in triplicate, and 1000 cells were analyzed per treatment by a fluorescence microscope.

2.7 Real Time PCR (RT-PCR)

HT29 cells were seeded (4×10^6 cells/culture flask) for one cell cycle of growth. The selenium concentration used in this experiment showed the best response compared to the other assays. Cells were treated for 12 hours in the following experimental groups: (1) negative control (ultrapure water), (2) doxorubicin (0.1 mg/mL), (3) selenium (500 ng/mL) and (4) combined (selenium 500 ng/mL + doxorubicin 0.1 mg/mL).

RNA was extracted with Trizol LS (Invitrogen), quantified by a spectrophotometer, and its integrity was measured on a 1% agarose gel. The cDNA was synthesized with an oligo-dT primer (10 pmol/ μ L) and reverse transcriptase (M-MLV reverse transcriptase; Invitrogen), and it was stored at -80°C . The Real Time PCR (RT-PCR) reactions were run using primers for CASP9, BCL-XL, APC and GAPDH (to normalize) (Table 1) and Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen) at the following conditions: 95°C for 5 min, 40 cycles of $95^{\circ}\text{C}/20$ s, $60^{\circ}\text{C}/30$ s, and $72^{\circ}\text{C}/20$ s. The melting curve varied from 50 to 90°C . The treatments were evaluated in duplicate.

Table 1. Sequence of primers used in RT-PCR

Gene	Primer
GAPDH	F: 5' GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3'
	R: 5' GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT 3'
APC	F: 5' AAA GCG CCA TGA TAT TGC ACG GCT 3'
	R: 5' TGT TTG CTG TGC TCA CGT TTC CAG 3'
BCL-XL	F: 5' TGG GCT CAC TCT TCA GTC GGA AAT 3'
	R: 5' ATG TAG TGG TTC TCC TGG TGG CAA3'
CASP9	F: 5' GCT CTT CCT TTG TTC ATC TCC3'
	R: 5' GTT TTC TAG GGT TGG CTT CG3'

2.8 Statistical Analyses

The statistical analyses were run with GraphPad InStat software and the Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test©. The data from the MTT and cell proliferation assays were statistically analyzed by an analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test ($p < 0.05$). The data obtained from the *in situ* apoptosis detection assay were compared by the chi-squared (χ^2) test ($p < 0.05$). The data obtained by RT-PCR were analyzed by Software Rest© (PFAFLL, 2002).

3. Results

3.1 Cytotoxicity assay

Table 2 show the averages and standard deviations of the absorbances obtained with the MTT assay. The results show that the selenium was not cytotoxic at 5 ng/mL or 50 ng/mL at any time point. Selenium at 500 ng/mL was not cytotoxic at 24 and 48 hours, showing absorbances of 0.405 and 0.395 respectively; however, after 72 hours, the absorbance was 0.972, but no significant statistically differences were found ($p>0.05$). The damage-inducing agent doxorubicin (0.1 mg/mL) was cytotoxic at all experimental time points.

3.2 Cell proliferation analysis

The results from the cell proliferation assays are in Tables 3 and 4, respectively, and the average number of counted cells at 24, 48, 72 and 96 hours after treatment. There was no difference in the proliferation rates from the treated groups compared to the control group (Table 3). The proliferation rates in cells treated with selenium (500 ng/mL) and doxorubicin were significantly decreased compared to controls (Table 4).

3.3 Cell viability

Table 5 show the HT29 cell viability in the control and treatment groups. Cell viability was reduced with the combination of doxorubicin and selenium treatment in 72 and 96 hours.

3.4 *In situ* apoptosis assay

The results of the *in situ* apoptosis assay are in Table 6. The three individual concentrations of selenium and the combined concentrations of 5 and 50 ng/mL

did not show apoptotic activity when compared to control. In contrast, the combined treatment of selenium (500 ng/mL) and doxorubicin statistically increased the number of apoptotic cells (average of 498 apoptotic cells) compared to cells treated with only doxorubicin (average of 320 apoptotic cells) or water.

3.5 Real Time PCR

3.5.1 CASP 9 gene expression

Figure 1 shows the relative gene expression of the pro-apoptotic gene CASP9. Cells only treated with selenium showed no changes in CASP9 gene expression; however, cells treated with doxorubicin showed a 2.67-fold increase in CASP9 gene expression compared to control. Cells treated with the combination of selenium and doxorubicin showed a 4.97-fold increase in CASP9 gene expression when compared to the control and doxorubicin groups.

3.5.2 BCL-XL gene expression

Figure 1 shows the relative gene expression of the anti-apoptotic gene BCL-XL. Cells treated with selenium showed a 3.06-fold decrease in BCL-XL gene expression when compared to the control group. Cells in the group treated with selenium showed a 2.6-fold decrease in BCL-XL gene expression when compared to doxorubicin-treated group.

3.5.3 APC gene expression

Figure 1 shows the relative gene expression of the tumor suppressor gene APC. There was an increase in the expression of this gene in cells treated with selenium by 2.38 fold compared to the control group and association.

Discussion

In recent years, natural compounds in diets have received much attention from the scientific community because they demonstrate the ability to suppress several carcinogenic phases (SUZUKI et al., 2009). Selenium, a metalloid micronutrient present in many foods, has demonstrated an ability to prevent numerous types of cancers (BORGES et al., 2006; RIKIISHI, 2007; SUZUKI et al., 2009). Possible mechanisms for this prevention include inhibition of cell proliferation or activation of apoptotic processes (ZENG and COMBS, 2007). However, these mechanisms are still unknown, and it is important to understand and identify selenium's mechanism of action for use in the prevention of carcinomas (SUZUKI et al., 2009). The cytotoxicity assay (MTT) proved that the concentrations of selenomethionine tested in this study were not cytotoxic. Therefore, these concentrations can be tested for their chemopreventive activity, which is expected because the literature has reported the use of higher concentrations of selenium (5 to 50 $\mu\text{g/mol}$) in their testing (NARAYANAN, 2004; RUDOLF et al., 2008; ZENG and COMBS, 2008; JERIWALLA et al., 2009).

The cell proliferation and viability assays showed a significant decrease in the number of HT29 cells at the highest concentration of selenium used, especially when it was combined with the damage-inducing agent doxorubicin. This observation is in agreement with data reported in the literature (REAGEN-SHAW et al., 2008; CAO et al., 2008; GUAN et al., 2008, CHAKRABORTY, 2009).

The *in situ* apoptosis assay showed a significant increase in the number of apoptotic cells when they were treated with the combination of doxorubicin and selenium (500 ng/mL). This is in agreement with the cell proliferation and cell viability data. Studies described in the literature show an increase in apoptosis when tumor cells are treated with various concentrations of selenium (JUNG, et al., 2001; YEO et al., 2002; THANT et al., 2008; CAO et al., 2008; GUAN et al., 2008, SUZUKI et al., 2009). Such studies show the ability of selenium to inhibit cell proliferation and

to activate the apoptotic process (ZENG and COMBS, 2007). The data also indicate that its activity is increased in the presence of a damage-inducing agent.

RT-PCR analyzed the expression of genes related to the actions of selenomethionine in the cytological assays, particularly at the highest concentration (500 ng/mL). APC is a tumor suppressor gene. Its product regulates the transcription of a large number of key genes in cell proliferation, such as the genes in the formation of kinetochores, microtubules, cell adhesion, mitotic chromosome segregation and the regulation of free β -catenin. This indicates that this gene is essential to development and cell homeostasis and that its inactivation facilitates tumorigenesis (SHENG et al., 2010; BIENZ & HAMADA, 2004; AOKI and TAKETO, 2007). These facts show the use of this gene in the present study to verify selenomethionine's function on a gene involved in cell proliferation. The results of this study showed a significant increase in the expression of this gene in cells treated only with selenomethionine. Mutations of *APC* are closely related to proliferation of intestinal adenocarcinoma neoplastic cells (AOKI and TAKETO, 2007; SHENG et al., 2010). Thus, the data suggests the improved activity of this gene in the presence of selenomethionine. Therefore, selenium may modulate the activity of this gene in the regulation of colorectal cancer cell proliferation (NARAYANAN, 2002; SUTHERLAND et al., 2010). These data correlate with the cell proliferation and viability assays, which indicate selenium in the mechanism of tumor suppression. The *APC* gene product regulates the quantity of free β -catenin, which is an enzyme that inhibits the cell cycle progression. Its increased expression when treated with selenomethionine in HT29 cells shows that selenium, as a chemoprotective agent for colorectal tumors, is quite promising, a fact envisioned by Davis et al. (2001).

The CASP9 gene encodes an initiator caspase in the apoptosis pathway, caspase 9, which cleaves the inactive pro-forms of effector caspases in apoptosis. This activates them when alterations in mitochondrial membrane permeability occur (PAROLIN and REASON, 2001). The assay performed in the present study shows that the cells treated with the combination of doxorubicin and selenomethionine (500 ng/mL) showed an increased expression of CASP9, which

suggests that these compounds act on the initial process of apoptosis to trigger this event. Liu et al. (2005) stated that apoptosis could be initiated by methylated forms of selenium, even in p53-null phenotypes, such as the HT29 cells. We can assume that selenomethionine acts by increasing the expression of CASP9 along with the chemotherapeutic doxorubicin. The increased expression of this gene means that the apoptotic levels will also increase, especially in the cells treated with the combination of doxorubicin and selenomethionine (500 ng/mL). Apoptosis was more pronounced in cells treated with selenium.

The experiments performed with BCL-XL, a member of the BCL-2 anti-apoptotic gene family, agree with the other study results (YEO et al., 2002; LIU and ZHANG, 2005). The data show a significant decrease in the expression of this gene in cells treated with selenomethionine, doxorubicin and a combination of both of them. According to Zimmer (2007), doxorubicin restores apoptosis through different pathways, such as the BCL-2 family (in which the BCL-XL gene is included). This occurs by decreasing the expression of BCL-XL and increasing the apoptosis ratio, which was confirmed in the present study. The decrease in the expression of BCL-XL in cells treated with selenomethionine suggests that this oligoelement may act directly in the induction of apoptosis. This was also observed in the cells treated with the combination of doxorubicin and selenomethionine (500 ng/mL).

In addition to the chemopreventive action of selenium, new evidence indicates a chemotherapeutic potential of this metalloid micronutrient (SINHA and EL- BAYOUMY, 2004). The data presented here suggest that selenomethionine possesses synergistic activity with doxorubicin and increases its chemotherapeutic action, which was observed in the cytological assays. More studies are necessary to verify whether the use of selenium is an important therapeutic source, adjuvant to the doxorubicin-based chemotherapy. If this is true, the use of these two compounds in chemotherapy may improve the response to treatment and improve the quality of life for patients with colorectal cancer.

Tumor cells, such as HT29, have glutathione peroxidase and glutathione S-transferase alternations, and selenium has an important role in their active-site

arrangements. These redox alterations in the intercellular environment trigger apoptosis (GHIBELLE et al., 1995; KAPLOWITZ, 2000). Abrupt changes to the cell redox state occur also in the presence of the damage-inducing agent doxorubicin by the increased production of antioxidant enzymes. This is due to the increase of the selenomethionine supply to the cells. Redox changes, especially in the mitochondria, inhibit the expression of anti-apoptotic genes, such as BCL-XL, which makes the mitochondrial membrane permeable and allows the release of cytochrome c. When cytochrome c is present in the cell cytoplasm, the activation of pro-apoptotic enzymes occurs, such as caspase-9, and triggers the apoptotic cascade (MCCONKEY, 1998; PAROLIN and REASON, 2001; CARVALHO, 2008). In the present study, the expression of CASP9 was increased in the combination group, reinforcing the idea that more CASP9 triggers programmed cell death.

Thus, this study suggests selenium as a potential activator of apoptosis and regulator of cell proliferation. However, new studies that consider new concentrations of selenomethionine, other cell types and other genes are necessary to determine the molecular mechanism of this oligoelement.

REFERENCES

- ALBANES, D. Vitamin Supplements and Cancer Prevention: Where Do Randomized Controlled Trials Stand? **JNCI**, v. 101 (1), p. 2-4, 2009.
- AOKI, K., TAKETO, M.M., Adenomatous polyposis coli (APC): a multifunctional tumor suppressor gene. **Journal of Cell Science**, v. 120 (19), p. 3327-3335, 2007.
- BIENZ, M., HAMADA, F. Adenomatous polyposis coli proteins and cell adhesion. **Curr. Opin. Cell Biol.** v.16, p. 528-535, 2004.
- BORGES, LP; NOGUEIRA, CW; ROCHA, JBT; ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chemico-Biological Interactions**, p. 0-0, 2006.

BOS, J.L.; KREIJL, C.F. Genes and genes products that regulate proliferation: Critical targets in carcinogenesis. **IARC. Sci. Publ.**, 116, p. 57-65, 1992.

BUDDINGTON, K.K.; DONAHOO, J.B.; BUBBINGTON, R.K.; Dietary oligofructose and inulin Protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. **The J. Nutr.**, v. 132, p. 472-477, 2007.

CAO, Z; WU, L.P; LI, Y.X; GUO, Y.B; CHEN, Y.W; WU, R.H. Change of choline compounds in sodium selenite-induced apoptosis of rats used as quantitative analysis by in vitro 9.4T MR spectroscopy. **World J Gastroenterol.** v. 14(24), p. 3891-3896, 2008.

CARVALHO, G.D. **Estudo *in vitro* da apoptose induzida em linfócitos de camundongos BALB/c imunizados com o peptídeo sintético anticarrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus (SBm 7462) por via oral e nasal.** Viçosa, 2008.122 p. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa.

CHAKRABORTY, P.; HOSSAIN, U.; BHATTACHARYA, S. Chemoprotection and enhancement of cancer chemotherapeutic efficacy of cyclophosphamide in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma by diphenylmethyl selenocyanate. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 11, p. 76-88, 2009.

COMBS, GF; GRAY, PG. Chemopreventive agents: Selenium. **Pharmacology and Therapeutics.** v. 79, 179-192, 2006.

DAVIS, C.D., ZENG, H., FINLEY, J.W. Selenium-enriched broccoli decreases intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia mice. The Journal of Nutrition, v. 132, p. 307-309, 2002.

FERRARI, C.K.B., TORRES, E.A.F.S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48 (3), p. 375- 382, 2002.

FLAGG, E.W.; COATES, R.J.; GREENBERG, R.S.. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 14, p. 419-427, 1995.

FOGG-JOHNSON, N.; KAPUT, J. Nutrigenomics: An Emerging Scientific Discipline. **Food Technol.**, v. 57 (4), p. 60-67, 2003.

GHIBELLI L., COPPOLA S., ROTILIO G., LAFAVIA E., MARESCA V. AND CIRIOLO M. R. Non-oxidative Loss of Glutathione in Apoptosis via GSH Extrusion. **Biochem. Biophys. Research Comm.** v.216 (1), p. 313-320, 1995.

GUAN,L; HUANG, F.; LI, Z.; HAN, B.; JIANG, Q.; REN, Y.; YANG, Y; XU, C. P53 transcription-independent activity mediates selenite-induced acute promyelocytic leukemia NB4 cell apoptosis. **BMB reports**, v. 34, p. 745-750, 2008.

HESKETH, J. Nutrigenomics and Selenium: Gene Expression Patterns, Physiological Targets, and Genetics. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 28, p. 157-177, 2008.

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

JACKSON, M.I., COMBS, G.F. Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms. **Micronutrients**, v. 11, p. 718, 726, 2008.

JARIWALLA, R.J; GANGAPURKAR, B; NAKAMURA, D. Differential sensitivity of various human tumour-derived cell types to apoptosis by organic derivatives of selenium. **British Journal of Nutrition**, v. 101, 182–189, 2009.

JUNG, U., ZHENG, X., YOON, S.O., CHUNG, A.S. Se- ethylselenocysteine induces apoptosis mediated by reactive oxygen species in hl-60 cells. **Free radical Biology & Medicine**, v. 31(4), 479–489, 2001.

KAPLOWITZ N. Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. Clin Liver Dis, v. 4, p.1-23, 2000.

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

KERR, J.R.F; WINTERFORD, C.M; HARMON, B.V. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2013-2026, 1994.

LIU, Y; ZHANG, X. Expression of Cellular Oncogene Bcl-xL Prevents Coronavirus-Induced Cell Death and Converts Acute Infection to Persistent Infection in Progenitor Rat Oligodendrocytes. **Journal of Virology**, v. 79 (1), p. 47-56, 2005.

MCCONKEY, D.J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters** v. 99 (3), p. 157-168, 1998.

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.

NARAYANAN, B.A; NARAYANAN, N.K; ,DESAI,D.; PITTMAN, B.;REDDY, B.S. Effects of a combination of docosahexaenoic acid and 1,4-phenylene bis(methylene) selenocyanate on cyclooxygenase 2, inducible nitric oxide synthase and b-catenin pathways in colon cancer cells. **Carcinogenesis**, v.25 (12), p. 2443-2449, 2004.

PAROLIN, M.B; REASSON, R.J. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq Gastroenterol**, v. 38, p.138-144, 2001.

PENG, X., CUI, Y., CUI, W., DENG, J., CUI, H. The Decrease of Relative Weight, Lesions, and Apoptosis of Bursa of Fabricius Induced by Excess Dietary Selenium in Chickens. **Biol. Trace Elem. Res.** v. 10, p. 90-100, 2009.

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 (9), p. 2-10.

PIENTA, K.J; PARTIN, A.W; COFFEY, D.S. Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. **Cancer Res.** v. 49, p. 2525-2532, 1989.

PITOT, H.C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v.72, p. 962-7, 1993.

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

REAGEN-SHAW, S., Nihal, M., Ahsan, H., Mukhtar, H., Ahmad, N. Combination of vitamin E and selenium causes an induction of apoptosis of human prostate cancer cells by enhancing Bax/Bcl-2 ratio. **Prostate**, v. 68(15): 1624–1634, 2008.

REDDI, AS; BOLLINENI, JS. Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF-beta 1 in normal and diabetic rats. **Kidney Int.**, v.59, p. 1342-1353, 2001.

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

ROVOZZO GC, BURKE CN. **A manual of basic virological techniques**. New Jersey: Prentice Hall, v. 14, p. 159, 1973.

RUDOLF, E., RUDOLF, K., ČERVINKA, M. Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells. **Cell Biol Toxicol** v. 24, p. 123–141, 2008.

SCHOMBURG, L., DUMITRESCU, M.A., LIAO,X-H., BIN-ABBAS, B., HOEFLICH,J., KÖHRLE, J., REFETOFF, S. Selenium supplementation fails to correct the selenoprotein synthesis defect in subjects with SBP2 gene mutations. **Thyroid**. v. 19 (3), p.277-281, 2009.

SINHA R, EL-BAYOUMY K. Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 4, p.13–28, 2004.

SHENG, J, Q; CUI, W.J; FU, L; JIN, P; HAN, Y; LI, S.J; FAN, R.Y; LI, A.Q; ZHANG, M.Z; LI, S.R. APC gene mutations in Chinese familial adenomatous polyposis patients. **World J Gastroenterol**, v. 28 (12), p.1522-1526, 2010.

STAPLETON, SR. Selenium: na insulin-mimetic. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, p.1874-1879, 2000.

STEVENS, R. G.; SWEDE, H.; ROSENBERG, D.W. Epidemiology of colonic aberrant crypt foci : Review and analysis of existing studies. **Cancer lett.**,v. 32, p. 123-128, 2006.

SUTHERLAND, A., KIM, D.H., RELTON, C., AHN, Y.O., HESKETH, J. Polymorphisms in the selenoprotein S and 15-kDa selenoprotein genes are associated with altered susceptibility to colorectal cancer. **Genes Nutr.** v. 15, p. 215-223, 2010.

SUZUKI, M; ENDO, MANABU; SHINOHARA, F; ECHIGO, S; RIKIISHI, H. Differential apoptotic response of human cancer cells to organoselenium compounds. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 22, p. 43-50, 2009.

THANT, A.A, WU, Y., LEE, J., MISHRA, D.K; GARCIA, H., KOEFFLER, H.P., VADGAMA, J.V. Role of Caspases in 5-FU and Selenium-induced Growth Inhibition of Colorectal Cancer Cells. **Anticancer Research** v.28, 3579-3592, 2008.

WALLACE, K., KELSEY, K.T., SCHNED, A., MORRIS, J.S., ANDREW, A.S., KARAGAS, M.R. Selenium and risk of bladder cancer: a population-based case-control study. **Cancer Prev Res.** v. 2(1), p. 70-73, 2009.

WEISBURGER, J.H. Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. **Cancer**, v. 28, p. 60-9, 2001.

YEO, JK, CHA, SD; CHO, CH; KIM, SP; CHO, JW; BAEK, WK; SUH, MH; KWON, TK; PARK, JW; SUH, SI. Se-methylselenocysteine induces apoptosis through caspase activation and Bax cleavage mediated by calpain in SKOV-3 ovarian cancer cells. **Cancer Letters**, v.182, p. 83–92, 2002.

ZASSO, FB; GONÇALES, CEP; JUNG, EAC; ARALDI, D; ZENI, G; ROCHA, JBT; NOGUEIRA, CW. On the mechanisms involved in antinociception induced by dhyphenil diselenide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 19, 283-189, 2005.

ZENG H, COMBS GF JR. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. **J Nutr Biochem** v. 19 (1), p.7-11, 2007.

ZIMMER, AS; **Perfil imunohistoquímico das proteínas da família BCL-2 e evolução clínica do câncer de ovário: uma análise de pacientes do Hospital**

de Clínicas de Porto Alegre/Brasil. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em ciências médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

Table 02. Mean $\pm$ standard deviation of the absorbance obtained in the cytotoxicity test (MTT) after 24, 48 and 72 hours of treatment with selenomethionine in HT29 cells.

Experimental Groups	Absorbance mean $\pm$ Standard deviation			Rate of cell survival (%)
	24 hours	48 hours	72 hours	
Control	0,504 $\pm$ 0,150 ^a	0,941 $\pm$ 0,218 ^a	1,249 $\pm$ 0,082 ^a	100,00
Doxorubicin	0,326 $\pm$ 0,022 ^b	0,226 $\pm$ 0,010 ^b	0,119 $\pm$ 0,004 ^b	27,76
Se 5ng/mL	0,495 $\pm$ 0,122 ^a	0,930 $\pm$ 0,486 ^a	1,127 $\pm$ 0,092 ^a	94,00
Se 50ng/mL	0,487 $\pm$ 0,091 ^a	0,893 $\pm$ 0,141 ^a	1,201 $\pm$ 0,077 ^a	95,20
Se 500ng/mL	0,405 $\pm$ 0,081 ^a	0,695 $\pm$ 0,164 ^a	0,972 $\pm$ 0,031 ^a	79,90

Se 5ng/mL: 5 ng/mL of selenomethionine, Se 50ng/mL, 50ng/mL of selenomethionine, Se 500ng/mL: 500ng/mL of selenomethionine. Different letters indicate significant differences ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey).

Table 03. Mean $\pm$ standard deviation of the kinetics of cell proliferation in three concentrations of selenomethionine associated with doxorubicin, at 24, 48, 72 and 96 hours of treatment in HT29 cells

Treatments	Mean $\pm$ Standard deviation ($\times 10^4$ cells)				
	Spread	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	2×10^4	$32,33 \pm 2,08^a$	$73,00 \pm 200^a$	$143,66 \pm 1,52^a$	$280,33 \pm 2,51^a$
Doxorubicin	2×10^4	$20,66 \pm 1,52^b$	$18,00 \pm 2,64^b$	$10,66 \pm 4,04^b$	$4,00 \pm 1,00^b$
Se 5ng/mL	2×10^4	$30,66 \pm 1,53^a$	$72,66 \pm 2,51^a$	$141,66 \pm 2,51^a$	$280,00 \pm 2,64^a$
Se 50ng/mL	2×10^4	$34,00 \pm 1,00^a$	$72,66 \pm 4,04^a$	$142,33 \pm 0,57^a$	$281,33 \pm 2,51^a$
Se 500ng/mL	2×10^4	$31,00 \pm 2,08^a$	$68,00 \pm 1,00^a$	$146,33 \pm 2,51^a$	$282,00 \pm 1,11^a$

Se 5ng/mL: 5 ng/mL of selenomethionine, Se 50ng/mL, 50ng/mL of selenomethionine, Se 500ng/mL: 500ng/mL of selenomethionine. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$, ANOVA / Tukey).

Table 04. Mean $\pm$ standard deviation of the kinetics of cell proliferation in three concentrations of selenomethionine combined with doxorubicin, at 24, 48, 72 and 96 hours of treatment in HT29 cells.

Treatments	Mean $\pm$ Standard Deviation ($\times 10^4$ cells)				
	Spread	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	2×10^4	$32,33 \pm 2,08^a$	$73,00 \pm 2,00^a$	$143,66 \pm 1,52^a$	$280,33 \pm 2,51^a$
Doxorubicin	2×10^4	$27,66 \pm 1,52^a$	$20,00 \pm 2,64^b$	$14,66 \pm 4,04^b$	$9,00 \pm 1,00^b$
Ass. Se 5ng/mL	2×10^4	$31,00 \pm 2,14^a$	$18,66 \pm 2,51^b$	$13,66 \pm 2,51^b$	$8,66 \pm 1,15^b$
Ass. Se 50ng/mL	2×10^4	$30,00 \pm 2,64^a$	$19,33 \pm 1,52^b$	$12,50 \pm 2,00^b$	$9,00 \pm 1,00^b$
Ass. Se 500ng/mL	2×10^4	$25,00 \pm 1,45^{a,b}$	$14,00 \pm 1,00^{b,c}$	$7,66 \pm 1,52^c$	$1,00 \pm 1,00^{b,c}$

Ass. Se 5ng/mL: 5 ng/mL of selenomethionine + 0.1 mg/mL of doxorubicin, Ass. Se 50ng/mL, 50ng/mL of selenomethionine + 0.1 mg/mL of doxorubicin, Ass. Se 500ng/mL: 500ng/mL of selenomethionine + 0.1 mg/mL of doxorubicin. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$, ANOVA / Tukey).

Table 05. Percentage of cell viability in three concentrations of selenomethionine associated with doxorubicin observed at 24, 48, 72 and 96 hours in HT29 cells.

Treatments	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	82,14	87,50	84,61	94,36
Doxorubicin	76,00	65,57	28,75*	20,00*
Se 5ng/mL	79,58	84,61	91,33	97,70
Se 50ng/mL	82,14	93,75	92,13	98,18
Se 500ng/mL	80,00	86,39	92,18	94,33
Ass. Se 5ng/mL	75,00	60,00	35,33*	20,33*
Ass. Se 50ng/mL	72,85	59,57	34,90*	19,34*
Ass. Se 500ng/mL	77,74	41,74	19,95*	0,00*

Se 5ng/mL: 5 ng/mL of selenomethionine, Se 50ng/mL, 50ng/mL of selenomethionine, Se 500ng/mL of selenomethionine. Ass. Se 5ng/mL: 5 ng/mL of selenomethionine + 0.1 mg/mL of doxorubicin, Ass. Se 50ng/mL of selenomethionine + 0.1 mg / mL of doxorubicin, Ass. Se 500ng/mL: 500 ng/mL of selenomethionine + 0.1 mg/mL of doxorubicin. * Statistically significant differences (chi-square).

Table 06. Evaluation of apoptosis in HT29 cells after 24 hours of treatment with selenium. Total number of apoptotic cells, mean $\pm$ standard deviation.

Treatments	Total number of apoptotic cells	Mean $\pm$ Standard Deviation
Control	17	5,66 $\pm$ 2,88 ^a
Doxorubicin	959	319,66 $\pm$ 24,98 ^b
Se 5ng/mL	21	7,00 $\pm$ 2,00 ^a
Se 50ng/mL	31	10,33 $\pm$ 2,51 ^a
Se 500ng/mL	155	51,66 $\pm$ 4,16 ^a
Ass. Se 5ng/mL	897	299,00 $\pm$ 23,51 ^b
Ass. Se 50ng/mL	899	299,66 $\pm$ 23,50 ^b
Ass. Se 500ng/mL	1494	498,00 $\pm$ 25,159 ^c

Se 5ng/mL: 5 ng/ml of selenomethionine, Se 50ng/mL, 50ng/mL of selenomethionine, Se 500ng/mL: 500ng/mL of selenomethionine. Ass. Se 5ng/mL: 5 ng/mL of selenomethionine + 0.1 mg/mL of doxorubicin, Ass. Se 50ng/mL, 50ng/mL of selenomethionine + 0.1 mg/mL of doxorubicin, Ass. Se 500ng/mL: 500 ng/mL of selenomethionine + 0.1 mg/mL of doxorubicin Different letters indicate significant differences (p <0.05, ANOVA / Tukey).

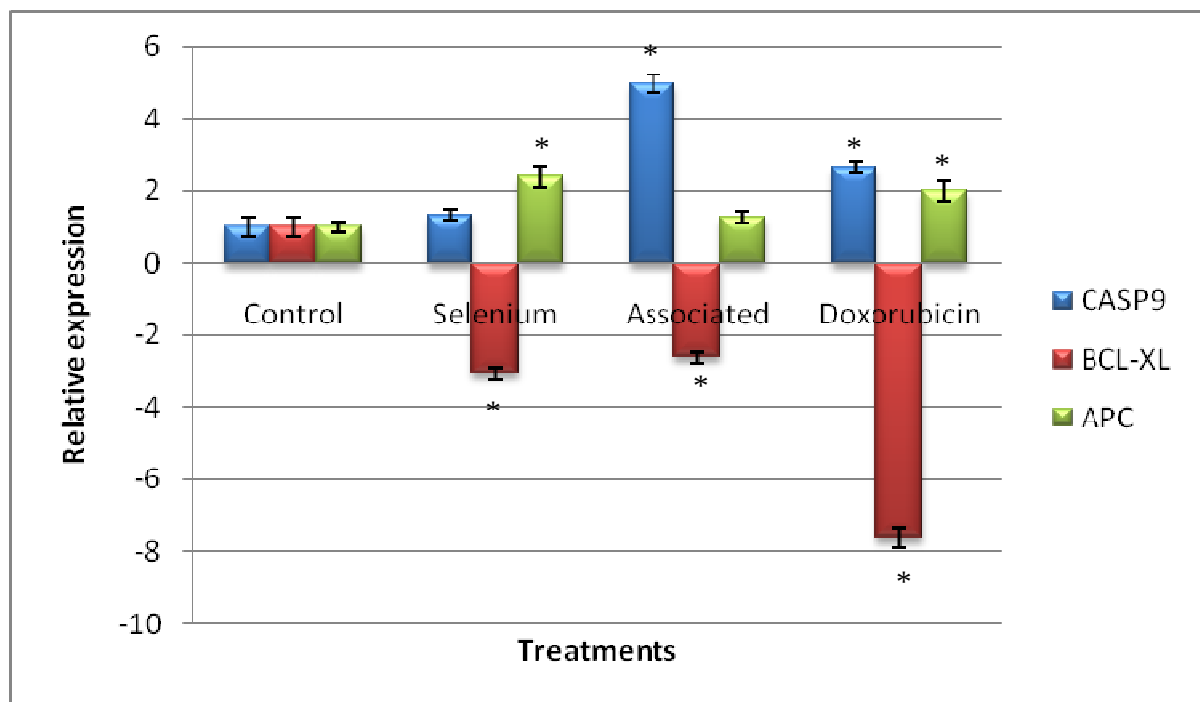


Figure 1. Relative gene expression *CASP9*, *BCL-XL* and *APC* in different treatments. Selenium: 500ng/mL, Associate: 500ng/mL of selenomethionine + 0,1 mg/mL of doxorubicin, Doxorubicin, 0.1 mg/mL. GraphPad Prism (PAFFLL)

IV. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, considera-se que o micronutriente selênio, nos ensaios citológicos:

- Não é citotóxico nas concentrações de 5,50 e 500ng/mL em culturas de células de HT29, fato este que é corroborado por dados da literatura;
- Quando na concentração de 500ng/mL associado ao agente indutor de danos doxorrubicina, diminui a significativamente a taxa de proliferação celular em células de HT29;
- Reduz a viabilidade celular em células tratadas pelas três diferentes associações de doxorrubicina e selênio, quando comparado aos controles;
- Em suas três diferentes concentrações associadas, há um aumento da atividade apoptótica, quando comparada ao controle e as células tratadas com o agente indutor de danos.

Já nos ensaios relacionados à expressão gênica, o selênio:

- Aumentou a expressão do gene pró-apoptótico *CASP 9*, na concentração de 500ng/mL, associada ao agente indutor de danos;
- Diminuiu a expressão do gene antiapoptótico *BCL-XL* em células tratadas apenas com Se na concentração de 500ng/mL, e com a mesma concentração associada ao agente indutor de danos;
- Na concentração de 500ng/mL, modulou o aumento da expressão relativa do gene supressor de tumor, envolvido na proliferação celular, o gene *APC*.

Dessa maneira, quando são considerados em conjunto os dados obtidos pelos ensaios citológicos e moleculares, consideramos que o selênio possui:

- Atividade antiapoptótica, pois os dados obtidos pelo ensaio da RT-PCR relacionados aos genes envolvidos em apoptose (*CASP 9* e *BCL-XL*), possuem correlação com os dados de apoptose *in situ*, ou seja, o oligoelemento Se melhora a atividade apoptótica do agente indutor de danos doxorrubicina;
- Ação moduladora no gene *APC*, resultado apoiado pelos resultados obtidos no ensaio de proliferação celular em células HT29.

Considerando-se que os resultados obtidos apresentam diferentes atuações do selênio dentro da carcinogênese colorretal, fazem-se necessárias novas pesquisas com este mesmo micronutriente em diferentes alvos moleculares e celulares.

V. ANEXO

1. Certificado de tradução do artigo para a língua inglesa.