UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação dos efeitos da curcumina sobre a hepatotoxicidade induzida pelo
mercúrio em células humanas HepG2**

Fábio Henrique Villa Pinto

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação dos efeitos da curcumina sobre a hepatotoxicidade induzida pelo
mercúrio em células humanas HepG2**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Fábio Henrique Villa Pinto

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi
Antunes

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 10/06/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2015

PINTO, F.H.V.	Avaliação dos efeitos da curcumina sobre a hepatotoxicidade induzida pelo mercúrio em células humanas HepG2.		MESTRADO FCFRPUSP 2015
------------------	--	--	------------------------------

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pinto, Fábio Henrique Villa

Avaliação dos efeitos da curcumina sobre a hepatotoxicidade induzida pelo mercúrio em células humanas HepG2. Ribeirão Preto, 2015.

73 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Antunes, Lusânia Maria Gregg.

1. Curcumina. 2. Mercúrio. 3. Genotoxicidade. 4. Composto Polifenólico. 5. Nutrigenômica. 6. Expressão gênica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fábio Henrique Villa Pinto

Avaliação dos efeitos da curcumina sobre a hepatotoxicidade induzida pelo mercúrio em células humanas HepG2.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria
Greggi Antunes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À toda minha família, em especial
à minha mãe Eliana e ao meu pai
Claúdio, minha avó Maria, minha
irmã Amanda e à minha namorada
Natália.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de Mestrado.

À minha orientadora Profa. Lusânia Maria Gregg Antunes pela oportunidade e pela paciência ao longo desses anos e a Profa. Maria de Lourdes Pires Bianchi.

A todos os colegas do Laboratório de Nutrigenômica, em especial ao Vinicius de Paula Venâncio e ao Alexandre Ferro Aissa, por toda a ajuda com os experimentos.

À equipe do Laboratório de Nutrigenômica, Regislaine Valéria Burim, Joana D'arc Castania Darin e Jefferson Codognotto, por toda a ajuda que sempre prestaram.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, pelo auxílio constante com a parte burocrática.

A todos os meus grandes amigos de Ribeirão Preto, membros ou não da TFM, por dois anos de experiências incríveis e muito companheirismo sempre.

“Existe apenas um bem, o saber, e apenas um mal, a ignorância.”

SÓCRATES

RESUMO

PINTO, F. H. V. **Avaliação dos efeitos da curcumina sobre a hepatotoxicidade induzida pelo mercúrio em células humanas HepG2. 2015.** 71f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O mercúrio é um dos metais mais nocivos presentes no ambiente, advindo tanto de fontes naturais quanto antropogênicas. Os indivíduos estão expostos a diferentes formas do mercúrio através de diversas vias, como a alimentação, principalmente no caso do metilmercúrio presente em peixes. Suas formas orgânicas são muito significativas do ponto de vista toxicológico, considerando-se a exposição da população e seus efeitos pró-oxidantes e genotóxicos envolvidos na origem de inúmeras doenças. Por outro lado, é suposto que compostos polifenólicos e outros antioxidantes da dieta podem exercer atividade protetora contra os efeitos deletérios do mercúrio. A curcumina é um pigmento amarelo polifenólico extraído do rizoma da planta *Curcuma longa* Linn (*Zingiberaceae*). Diversas evidências apontam para suas propriedades antioxidantes, de modulação da sinalização celular e alteração da expressão gênica, além da possibilidade de sua utilização na prevenção dos efeitos deletérios dos metais no organismo. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da associação entre o mercúrio e a curcumina, investigando a citotoxicidade de dois compostos orgânicos de mercúrio, metilmercúrio e etilmercúrio, e da curcumina, de forma isolada e combinada, em células HepG2, utilizando o ensaio do MTT. A genotoxicidade desses mesmos compostos também foi avaliada por meio do ensaio do cometa. Além disso, a alteração no estado oxidativo das células pela razão de glutatona (GSH/GSSG) e a alteração na expressão de 84 genes relacionados com vias de dano e reparo no DNA, utilizando-se de *PCR-Array*, também foram avaliados. Os compostos orgânicos de mercúrio apresentaram citotoxicidade em concentrações iguais ou maiores que 16 μM . A curcumina apresentou citotoxicidade apenas na concentração de 128 μM . Nos experimentos de associação entre o mercúrio e a curcumina foi observado um aumento da citotoxicidade, entre a concentração de 8 μM das duas formas de mercúrio e a concentração de 64 μM de curcumina. Na avaliação da genotoxicidade foi observado um efeito genotóxico significativo do metilmercúrio nas concentrações de 8, 16 e 32 μM , enquanto o etilmercúrio apresentou genotoxicidade significativa apenas na concentração de 32 μM . A curcumina não apresentou genotoxicidade. Na associação dos compostos não foi detectada ação antigenotóxica da curcumina e houve um aumento na genotoxicidade do metilmercúrio em associação com a concentração de 32 μM de curcumina. A razão de glutatona mostrou um aumento significativo nas células tratadas com metilmercúrio, entretanto isso não foi observado quando o metilmercúrio foi associado com a curcumina. A análise da expressão de 84 genes relacionados com danos no DNA por *PCR-Array* mostrou alteração na expressão de 26 genes, sendo que 3 deles tiveram aumento na expressão, *DDIT3*, *GADD45A* e *PPP1R15A*, relacionados principalmente com o bloqueio do ciclo celular e o processo de apoptose, e 23 genes tiveram sua expressão reduzida, relacionados com diversas vias de reparo do DNA, checkpoints do ciclo celular e apoptose. Os resultados obtidos indicam que, nas condições avaliadas, a associação da curcumina com o mercúrio aumentou os efeitos deletérios do metal, causando um aumento na citotoxicidade e na genotoxicidade do mercúrio, não se caracterizando como uma possível estratégia de prevenção dos efeitos deletérios do mercúrio.

Palavras-chave: curcumina, mercúrio, genotoxicidade, composto polifenólico, nutrigenômica, expressão gênica.

ABSTRACT

PINTO, F. H. V. Evaluation of the effects of curcumin on the hepatotoxicity induced by mercury in human HepG2 cells. **2015**. 71pp. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Mercury is one of the most harmful metals present in the environment arising from both natural and anthropogenic sources. The individuals are exposed to different forms of mercury through various sources, such as food, especially in the case of methylmercury in fish, with this organic forms being very significant from a toxicological point of view, considering the exposure of the population and its pro-oxidant and genotoxic effects, involved in the origin of many diseases. On the other hand it is assumed that polyphenolic compounds and other dietary antioxidants can have protective activity against the harmful effects of mercury. Curcumin is a polyphenol extracted from the rhizome of *Curcuma longa* Linn. (*Zingiberaceae*). Several evidences show its ability to act as an antioxidant, modulate cell signaling and gene expression, and the possibility of its use in chemoprevention of the deleterious effects of metals. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of the association between mercury and curcumin, investigating the cytotoxicity of two organic compounds of mercury, methylmercury and ethylmercury, and curcumin, alone and in combination, in HepG2 cells using the the MTT assay, the genotoxicity of these same compounds through the comet assay, the changes in oxidative state of the cells by the concentration of glutathione and GSH/GSSG ratio and the changes in the expression of 84 genes related to DNA damage and repair pathways by PCR-Array. Organic mercury compounds showed cytotoxicity at concentrations equal to or greater than 16 μ M. Curcumin only showed cytotoxicity at the concentration of 128 μ M. There was an increase in cytotoxicity when mercury (8 μ M) was associated with curcumin (64 μ M). In the genotoxicity assay there was a significant genotoxic of methyl mercury at concentrations of 8, 16 and 32 μ M while ethyl mercury was genotoxic only at 32 μ M. Curcumin was not genotoxic. There was no anti-genotoxic activity in the association of compounds and there was an increase in genotoxicity of MeHg in association with 32 μ M of curcumin. The quantification of glutathione (GSH/GSSG) showed a significant increase in the GSH/GSSG ratio in cells treated with MeHg, however this was not observed when MeHg was associated with curcumin. Gene expression analysis showed changes in the expression of 26 genes, 3 of them were upregulated, DDIT3, GADD45A and PPP1R15A, mainly related to the cell cycle blockage and apoptosis, and 23 genes were down-regulated, related with DNA repair, cell cycle checkpoints and apoptosis. These results indicate that the combination of curcumin with mercury increased the deleterious effects of the metal, causing an increase in cytotoxicity and genotoxicity of mercury, and do not represent a possible strategy to prevent the harmful effects of mercury.

Keywords: curcumin, mercury, genotoxicity, polyphenolic compounds, nutrigenomics, gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da curcumina.....	4
Figura 2. Ciclo biogeoquímico do mercúrio.....	6
Figura 3. Papel da glutathione na neutralização direta de radicais livres	9
Figura 4. Papel da glutathione na neutralização enzimática do peróxido de hidrogênio.....	9
Figura 5. Redução do reagente de MTT.....	16
Figura 6. Programa <i>Comet Assay IVTM</i> utilizado para análise do ensaio do cometa.....	18
Figura 7. Avaliação da citotoxicidade do Metil metano sulfonato (MMS) em células HepG2 pelo ensaio do MTT.....	24
Figura 8. Avaliação da citotoxicidade do Metanol em células HepG2 pelo ensaio do MTT.....	25
Figura 9. Avaliação da citotoxicidade do Metil mercúrio (MeHg) em células HepG2 pelo ensaio do MTT.....	26
Figura 10. Avaliação da citotoxicidade do Etil mercúrio (EtHg) em células HepG2 pelo ensaio do MTT.....	26
Figura 11. Avaliação da citotoxicidade Curcumina em células HepG2 pelo ensaio do MTT.....	27
Figura 12. Avaliação da citotoxicidade da associação entre o MeHg e a Curcumina em células HepG2 pelo ensaio do MTT.....	28
Figura 13. Avaliação da citotoxicidade da associação entre o EtHg e a Curcumina (CMN) em células HepG2 pelo ensaio do MTT.....	29
Figura 14. Avaliação da genotoxicidade do MeHg e do EtHg em células HepG2 pelo parâmetro <i>Tail intensity</i> do ensaio do Cometa.....	31
Figura 15. Avaliação da genotoxicidade da Curcumina (CMN) em células HepG2 pelo parâmetro <i>Tail intensity</i> do ensaio do Cometa.....	32

Figura 16. Avaliação da genotoxicidade do MeHg associado com a Curcumina em células HepG2 pelo parâmetro <i>Tail intensity</i> do ensaio do Cometa.....	33
Figura 17. Avaliação da genotoxicidade do EtHg associado com a Curcumina em células HepG2 pelo parâmetro <i>Tail intensity</i> do ensaio do Cometa.....	34
Figura 18. Concentração de GSH em células HepG2.....	36
Figura 19. Concentração de GSSG em células HepG2.....	36
Figura 20. Razão GSH/GSSG em células HepG2.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos genes com expressão significativamente alterada na análise de expressão gênica por PCR-Array.....	39
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%DNA	Porcentagem de ácido desoxirribonucleico
CAT	Catalase
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CMN	Curcumina
DMEM	Dullbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzólico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtHg	Etilmercúrio
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
HepG2	Linhagem de hepatocarcinoma humano
Hg	Mercúrio
MeHg	Metilmercúrio
MMS	Metil metano sulfonato
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SOD	Superóxido dismutase

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. Introdução.....	1
1.1. Curcumina.....	2
1.2. Curcumina e metais.....	3
1.3. Mercúrio, Glutathione e estresse oxidativo.....	8
2. Objetivos.....	11
2.1. Objetivos Gerais.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. Material e Métodos.....	13
3.1. Agentes químicos.....	14
3.2. Linhagem celular.....	14
3.3. Teste de Viabilidade Celular (MTT).....	15
3.4. Ensaio do cometa.....	16
3.5. Determinação de Glutathione.....	19
3.6. Expressão gênica por PCR-Array.....	20
3.7. Análise estatística.....	22
4. Resultados e Discussão.....	23
4.1. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT).....	24
4.2. Ensaio do Cometa.....	30
4.3. Determinação de Glutathione.....	35
4.4. Análise de expressão gênica por PCR-Array.....	38
5. Conclusões.....	44

6. Referências..... 46

1 Introdução

1.1. Curcumina

Estudos experimentais e evidências epidemiológicas têm demonstrado que o consumo de dietas ricas em alimentos de origem vegetal, principalmente aqueles com grandes concentrações de componentes bioativos, apresenta propriedades de manutenção da saúde e diminuição dos riscos de desenvolvimento de doenças crônicas. Contudo, os processos bioquímicos e moleculares responsáveis por esses efeitos protetores ainda não estão completamente esclarecidos (BALSTAD et al., 2011).

Várias atividades biológicas dos compostos bioativos da dieta têm sido atribuídas aos seus efeitos antioxidantes, capacidade de modulação da sinalização celular e alteração da expressão gênica (VIRGILI e MARINO, 2008). Entre os antioxidantes da dieta, a curcumina tem sido extensivamente investigada em estudos clínicos e pré-clínicos, quanto aos seus possíveis efeitos protetores contra diversas doenças crônicas não comunicáveis, como o câncer, doenças pulmonares, neurológicas, metabólicas, cardiovasculares, autoimunes e inúmeras doenças crônicas (GUPTA; PATCHVA e AGGARWAL, 2013). Múltiplas publicações na literatura têm lhe dedicado atenção, inclusive com volumes especiais, como o publicado pela Molecular Nutrition & Food Research (GESCHER, 2013), além de indicar a sua segurança em modelos animais, tais como roedores e primatas (GUPTA; KISMALI e AGGARWAL, 2013).

A curcumina é um pigmento amarelo polifenólico extraído da planta *Curcuma longa* Linn. (*Zingiberaceae*). O rizoma é a parte da cúrcuma de maior interesse, sendo frequentemente utilizado na forma de pó. Este pó de coloração amarelada é utilizado como corante e aromatizante, inclusive pela indústria de alimentos (ANTUNES et al., 2000). A cúrcuma tem sido empregada há milhares de anos na medicina chinesa e Ayurvedica (GOEL; KUNNUMAKKARA e AGGARWAL, 2008).

A curcumina é um potente agente antioxidante, anti-inflamatório e inibidor da peroxidação lipídica (PHAN et al., 2001; TOKAÇ et al., 2013). Mais recentemente, tem sido demonstrado que este composto bioativo da dieta foi capaz de modular a expressão de genes codificadores de enzimas em tecidos de roedores e células humanas *in vitro* (AGARWAL; GOEL e BEHARI, 2010).

Diversos estudos demonstram a capacidade da curcumina em modular a expressão de diversos fatores de transcrição, fatores de crescimento, quinases, citocininas e proteínas envolvidas no processo apoptótico (CHEN; WANG e CHEN, 2014; GANDHY et al., 2012; SHEHZAD; LEE e LEE, 2013; SHEHZAD e LEE, 2013). A modulação de importantes fatores envolvidos no processo apoptótico parece contribuir com seus efeitos no organismo e

com sua ação antitumoral; com trabalhos mostrando a influência da curcumina na supressão do fator NF-kB (LÁZARO, 2008), um importante fator de transcrição em situações de estresse celular e no controle da expressão de genes ligado à multiplicação celular e na modulação de enzimas do sistema antioxidante (LU, 2013). Outros trabalhos também mostram o aumento na expressão de genes da família *GADD45*, que codificam proteínas nucleares envolvidas com o estresse celular e o desencadeamento da apoptose (ZHOU, BEEVERS e HUANG, 2011). Assim como trabalhos que demonstram uma resposta variada em relação ao gene *TP53*, que codifica a proteína p53, uma importante proteína na manutenção da estabilidade genômica (SURGET; KHOURY e BOURDON, 2013). Com alguns desses trabalhos mostrando o aumento na expressão do *TP53* (ZHOU, BEEVERS e HUANG, 2011), o quê pode ser importante para sua ação antitumoral, já que diversos tipos de câncer apresentam diminuição na expressão desse gene; enquanto outros trabalhos demonstram diminuição na expressão do *TP53* (ZHOU, BEEVERS e HUANG, 2011), o quê poderia contribuir com a genotoxicidade da curcumina encontrada em outros trabalhos (LÁZARO, 2008).

Devido a estas propriedades, já foram descritos na literatura os efeitos antigenotóxicos, antimutagênicos, neuroprotetores, hepatoprotetores e nefroprotetores da curcumina sobre os efeitos adversos induzidos pelos tratamentos com quimioterápicos (ANTUNES; DARIN e BIANCHI, 2001; ANTUNES et al., 2000; CAO et al., 2007; MENDONÇA et al., 2009, 2010, 2013; WASEEM; PARVEZ, 2013).

Uma vez que os efeitos protetores da curcumina sobre os efeitos adversos dos quimioterápicos têm sido atribuídos ao seu efeito antioxidante, este composto fenólico tem sido associado com diferentes metais, que também induzem a geração de espécies reativas e, conseqüentemente, são responsáveis pelo desequilíbrio oxidativo e danos em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Metais como o cádmio e mercúrio causam a depleção de moléculas como a glutatona (GSH) e danificam enzimas antioxidantes endógenas (STOHS e BAGCHI, 1995), levando ao estresse oxidativo.

1.2. Curcumina e metais

A estrutura química da curcumina, e suas propriedades físicas, químicas e biológicas apresentam três importantes funcionalidades (Figura 1). O grupo metoxifenol e o hidrogênio metilênico são os responsáveis pela atividade antioxidante da curcumina, os quais doam o átomo de hidrogênio para a oxidação dos radicais livres, minimizando o estresse oxidativo. A curcumina também interage com várias biomoléculas por meio de ligações covalentes e não

covalentes. O grupo β -dicetônico interage com os grupos tióis das proteínas e forma quelatos com os metais de transição, reduzindo a toxicidade de alguns metais, mas também podendo originar interações de natureza mais complexa, principalmente em relação aos metais que possuem função biológica, como o ferro, o zinco e o cobre.

Figura 1: Estrutura química da curcumina. Adaptado de (PRIYADARSINI, 2013).

Os efeitos da exposição simultânea aos metais de transição e aos antioxidantes da dieta, entre eles a curcumina, com o objetivo de redução da toxicidade dos metais, é uma possível estratégia de promoção da saúde que ainda necessita de mais investigações. Estudos em células humanas hepáticas (HepG2) e pulmonares (A-549) em cultura mostraram que o cotratamento das culturas com cobre e curcumina aumentou a viabilidade celular e reduziu o estresse oxidativo. Estes resultados protetores da curcumina não foram encontrados nos tratamentos com outros antioxidantes da dieta, como o resveratrol ou o ácido cafeico, quando combinados com o cobre (ARNAL; ALANIZ e MARRA, 2012).

Existem estudos na literatura sobre a interação da curcumina com diversos outros metais, como ferro, manganês, zinco, cobre, e chumbo. Ela apresentou efeito protetor contra a peroxidação lipídica causada pelo chumbo (DANIEL et al., 2004), provavelmente associado à sua capacidade quelante. Estudos em associação com o ferro mostraram uma alta afinidade da curcumina por esse metal (BORSARI et al., 2002; JIAO et al., 2006), fator que poderia contribuir para a atividade antioxidante da curcumina, devido ao envolvimento do ferro na reação de Fenton.

Karaytug, Sevgiler e Karayakar (2011) realizaram um estudo com a curcumina sobre o estresse oxidativo induzido pelo cádmio ou cromo nas células renais e hepáticas de carpas (*Cyprinus carpio carpio* L.). O tratamento de associação com o antioxidante e o cádmio aumentou a peroxidação lipídica no tecido renal, sendo que outros estudos também mostraram efeitos pró-oxidantes em complexos com o cobre (LEUNG; HARADA e KEE, 2013), alertando para a necessidade de atenção na associação da curcumina com metais, já que além desses trabalhos, existem outros relatos sobre a toxicidade e a genotoxicidade da curcumina mediada pelo estresse oxidativo (LÁZARO, 2008).

Os possíveis efeitos da curcumina sobre a toxicidade do mercúrio ainda são pouco investigados (AGARWAL; GOEL e BEHARI, 2010). O mercúrio é um dos metais mais nocivos no ambiente, presente na atmosfera na forma de Hg^0 advindo de fontes naturais, como erupções vulcânicas, evaporação do solo e dos oceanos e também de fontes antropogênicas, como mineração e fundição de metais (mercúrio, ouro, cobre e zinco), queima de combustíveis fósseis e incineradores. O Hg^0 pode permanecer na atmosfera por um período de até um ano, o que contribui para sua ampla distribuição ao redor do globo. Ao ser oxidado na atmosfera, ele retorna a superfície da terra com a água da chuva ou por deposição, podendo evaporar novamente ou entrar nas cadeias biológicas sob suas formas orgânicas, principalmente metilmercúrio (MeHg), um produto do metabolismo microbológico nos sedimentos aquáticos, que pode se acumular ao longo das cadeias alimentares e atingir elevadas concentrações em espécies aquáticas, principalmente nos peixes carnívoros de topo de cadeia, como o atum, sendo essa uma das vias de exposição mais significativas para os seres humanos (HONG; KIM e LEE, 2012).

Figura 2: Ciclo biogeoquímico do mercúrio (LIU, GOYER e WAALKES, 2008).

No ambiente, os organismos estão expostos às diferentes formas do mercúrio e todas podem causar efeitos tóxicos, dependendo das condições de exposição. Os indivíduos estão expostos ao mercúrio por meio de algumas outras fontes, como o Hg^0 gasoso liberado de amálgamas dentárias, formas orgânicas como o MeHg presente na alimentação, e no uso de alguns medicamentos ou substâncias associadas, como o etilmercúrio (EtHg) presente no timerosal, um composto orgânico de mercúrio utilizado como conservante em vacinas devido às suas propriedades bacteriostáticas (BERNHOF, 2012; CLARKSON, 2002), seu metabolismo no organismo pode dar origem ao etilmercúrio, podendo constituir uma fonte de exposição para crianças em idade de vacinação (DÓREA, FARINA e ROCHA, 2013). De forma comparativa, o MeHg possui maior potencial de acumulação no organismo e ao longo das cadeias alimentares em relação ao EtHg , o que em parte é reflexo de sua velocidade de metabolização mais lenta, com ambas as formas sendo convertidas ao longo do tempo em mercúrio inorgânico, considerado menos tóxico, e possuindo seus efeitos deletérios associados principalmente com o estresse oxidativo (DÓREA, FARINA e ROCHA, 2013).

A neurotoxicidade e a nefrotoxicidade geralmente constituem os aspectos melhores estudados e compreendidos da toxicidade do mercúrio (BERNHOF, 2012; CLARKSON e MAGOS, 2006), entretanto a hepatotoxicidade também se apresenta como um fenômeno relevante. O fígado está envolvido na toxicocinética do mercúrio por meio do ciclo entero-hepático do metal, com participação da GSH intracelular (DUTCZAK e BALLATORI, 1994) e também pela metabolização dos compostos de mercúrio (BRANCO et al., 2012), além de influenciar a captação de mercúrio inorgânico pelos rins.

Em ratos expostos ao cloreto de mercúrio (HgCl_2) as concentrações mais altas de mercúrio foram encontradas no rim e no fígado, órgãos que apresentaram alterações histopatológicas bastante significativas. Em peixes expostos ao HgCl_2 , foi observada a indução da via intrínseca de apoptose em células do fígado, além de esteatose hepática e acúmulo de glicogênio (UNG et al., 2010). Peixes medaka (*Oryzias latipes*) expostos ao MeHg, acumularam grande quantidade desse composto no fígado (LIAO et al., 2006). Também foram observadas alterações histopatológicas no fígado e nos rins de peixes da família *Sparidae* expostos ao MeHg e ao Hg^{2+} (BRANCO et al., 2012). Ratos expostos ao MeHg por um período de 45 dias apresentaram alterações nas concentrações das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase. Quando o tratamento com o mercúrio na dieta foi acompanhado da administração simultânea do flavonoide quercetina, ou dos carotenoides bixina ou norbixina, os animais apresentaram uma redução significativa dos danos no DNA induzidos pelo mercúrio nas células hepáticas (BARCELOS et al., 2012, 2011b).

Parte da toxicidade do mercúrio está relacionada com a alta afinidade de suas várias formas por grupamentos sulfidrílicos (-SH), danificando moléculas endógenas como a GSH, e enzimas como a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), todos importantes componentes do sistema de defesa antioxidante, causando aumento na geração de espécies reativas (BERNHOF, 2012; STOHS e BAGCHI, 1995). A geração de espécies reativas está implicada no processo de peroxidação lipídica, dano tecidual, nefrotoxicidade (STOHS e BAGCHI, 1995), neurotoxicidade (NASCIMENTO et al., 2008) e genotoxicidade do mercúrio (CRESPO-LÓPEZ et al., 2009).

Trabalhos realizados em populações humanas apoiam os resultados observados nos experimentos laboratoriais. Alguns dos estudos epidemiológicos já realizados encontraram associação entre a exposição ao mercúrio e efeitos neurológicos (HONG; KIM e LEE, 2012), sendo que também foi observada associação entre biomarcadores de exposição ao mercúrio e estresse oxidativo, acessado pela atividade de enzimas como a GPx, CAT e concentrações de

GSH, em populações ribeirinhas da Amazônia (BARCELOS et al., 2015; GROTTTO et al., 2010).

Embora o fígado seja reconhecido como um dos alvos da toxicidade do mercúrio, as informações sobre os efeitos adversos deste metal sobre o tecido hepático ainda são limitadas, principalmente o conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na sua hepatotoxicidade. Um dos estudos que mostram esta associação é de Ung et al. (2010) que realizaram uma análise do hepato-transcriptoma do *zebrafish* (*Brachydanio rerio*), um importante modelo experimental vertebrado (LIESCHKE e CURRIE, 2007), exposto ao mercúrio. Os dados revelaram alterações na regulação de genes associados com danos no DNA, apoptose e vias de sinalização celular. A meta-análise comparativa dos *microarrays* entre o *zebrafish* e as células humanas hepáticas da linhagem HepG2 sugeriu a identificação de efeitos semelhantes de hepatotoxicidade do mercúrio em ambos os modelos experimentais. Estudo anterior realizado por Ayensu e Tchounwou (2006) evidenciou a modulação da expressão gênica em células HepG2 expostas ao mercúrio, especificamente em relação aos genes envolvidos em disfunções do sistema imunológico.

1.6. Mercúrio, Glutathione e estresse oxidativo.

O estresse oxidativo, caracterizado como o desbalanço entre a geração e a eliminação de espécies químicas reativas, derivadas de elementos como o oxigênio e o nitrogênio, está associado com o dano em componentes estruturais do organismo, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, e na etiologia de inúmeras doenças degenerativas (HYBERTSON et al., 2011; UTTARA et al., 2009), além de representar uma das principais formas de atuação do mercúrio no organismo (BERNHOF, 2012; STOHS e BAGCHI, 1995).

O GSH, um tripeptídeo formado por cisteína, ácido glutâmico e glicina, é um dos principais componentes do sistema de defesa antioxidante do organismo, atuando na detoxificação de xenobióticos e realizando a neutralização de diversas formas de espécies reativas, como radicais hidroxila, peroxila, peroxinitrito e peróxido de hidrogênio, tanto de forma direta (Figura 3), quanto de forma dependente da ação enzimática (Figura 4) (WU et al., 2004).

Figura 3: Papel da glutatona reduzida (GSH) na neutralização direta de radicais livres (R), com a formação de glutatona oxidada (GSSG) e sua posterior reciclagem pela enzima glutatona redutase (GR). Fonte: Adaptado de LIU, GOYER e WAALKES, 2008.

Figura 3: Papel da glutatona (GSH) na neutralização enzimática do peróxido de hidrogênio (HOOH) formado pela neutralização do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela enzima Superóxido dismutase (SOD), dependente da enzima glutatona peroxidase (GPx). Fonte: Adaptado de LIU, GOYER e WAALKES, 2008.

O GSH é sintetizado principalmente nas células do fígado, pelas enzimas γ -glutamil-cisteína-sintetase (GCL) e glutatona-sintetase (GS), existindo em duas formas, reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (MEISTER e TATE, 1976). O primeiro passo na sua síntese é realizado pela enzima GCL e representa a etapa limitante do processo em condições fisiológicas normais, sendo que a atividade da GCL pode ser modulada por fatores como o estresse oxidativo, a concentração de GSH existente na célula e a disponibilidade de substratos, principalmente a cisteína. A segunda etapa da síntese é realizada pela enzima GS e pode ser limitante em condições de estresse oxidativo, também possuindo sua atividade modulada por fatores como o estresse oxidativo (LU, 2013). A recuperação da glutatona reduzida (GSH) é feita pela redução da forma oxidada realizada pela enzima glutatona redutase (GR), que é expressa constitutivamente pelo organismo, mas que também pode ser induzida em situações

de estresse oxidativo, fazendo com que a forma reduzida seja predominante em situações fisiológicas normais (ZITKA et al., 2012).

A razão entre as suas duas formas (GSH/GSSG) é um importante determinante do estado oxidativo da célula (WU et al., 2004) e, como consequência, também está envolvida no controle de processos mais amplos dentro da célula, que apresentam sensibilidade a esse estado oxidativo do meio celular, como a expressão de diversos genes, a proliferação e a morte celular (WU et al., 2004), fato que contribui para explicar a associação do desequilíbrio dessa razão com eventos adversos no organismo, como o desenvolvimento do câncer e doenças cardiovasculares (TOWNSEND; TEW e TAPIERO, 2003).

Com isso, a hipótese desse presente estudo é de que a curcumina, devido a suas diversas propriedades, poderia modificar a citotoxicidade, a genotoxicidade e o estresse oxidativo envolvidos na toxicidade do mercúrio em células da linhagem HepG2, com vistas à possibilidade de prevenção dos efeitos deletérios do metal.

2 Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos da curcumina sobre a hepatotoxicidade induzida pelo mercúrio em células humanas HepG2.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar os efeitos do MeHg ou EtHg, associado ou não com a curcumina, sobre a viabilidade celular de células HepG2.
- Avaliar os possíveis efeitos antigenotóxicos da curcumina em células HepG2 expostas ao MeHg ou EtHg.
- Investigar os efeitos do MeHg ou EtHg, associado ou não com a curcumina, sobre a razão de GSH/GSSH em células HepG2.
- Investigar os efeitos do MeHg, associado ou não com a curcumina, sobre a expressão de 84 genes envolvidos na indução e sinalização de danos no DNA, tais como os genes relacionados com os processos de apoptose, ciclo celular, estabilidade do genoma e reparo do DNA, por meio da técnica de PCR Array.

3 Material e Métodos

3.1. Agentes químicos

A curcumina (CAS 458-37-7), o cloreto de metilmercúrio (CAS 115-09-3), o cloreto de etilmercúrio (CAS 107-27-7), o dimetilsulfóxido (CAS 9008-97-3) e o 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo-MTT (CAS 298-93-1), assim como os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). “Dulbecco's Modified Eagle Medium” (DMEM) e soro bovino fetal (SBF) foram comprados da Gibco (Carlsbad, CA, EUA). Agarose e agarose de baixo ponto de fusão foram adquiridos pela Invitrogen (California, CA, EUA). Todos os outros reagentes foram de padrão analítico da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.2. Linhagem celular

As células HepG2 são derivadas de células humanas e, por isso, mostram correlação com possíveis efeitos tóxicos para o ser humano (KNASMÜLLER et al., 1998). Essa linhagem apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar proteínas plasmáticas características das células normais do fígado humano (KNASMÜLLER et al., 1998). Essas células conservam as atividades de enzimas de fase I, tais como as do citocromo P450 CYP1A1, CYP1A2, CYP2B e CYP2E1, assim como também enzimas de fase II, incluindo glutationa-S-transferases, sulfotransferases, N-acetiltransferases e glucuronosiltransferases, enzimas envolvidas no metabolismo e na ativação e detoxificação de carcinógenos, sendo empregadas em estudos toxicogenômicos (JENNEN et al., 2010; UHL; HELMA e KNASMÜLLER, 1999).

As células HepG2 (Cat. No. HB-8065) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA) e foram cultivadas em frascos de 75 cm², em uma incubadora umidificada, numa atmosfera de 5% de CO₂ e com uma temperatura de 37 °C (Thermo Electron Co.) no Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP-USP. Elas foram mantidas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina. As células foram cultivadas em quantidades e por períodos específicos para cada protocolo experimental, sendo repicadas quando atingida a confluência de 80-90 %, e utilizadas entre a terceira e oitava passagem.

Os estoques de culturas celulares (alíquotas de 1,0 mL com aproximadamente 10⁶ células viáveis conservadas em solução de congelamento composta por SBF 10% DMSO) foram conservados em nitrogênio líquido.

Nos experimentos, pelo menos três concentrações dos agentes químicos e suas associações foram avaliadas. Como controle positivo foi utilizado o metil metano sulfonato (MMS), um agente alquilante com propriedades genotóxicas e citotóxicas classicamente empregado em estudos de biologia celular e molecular (WYATT e PITTMAN, 2006).

Nos testes com a curcumina, primeiramente foi realizada a sua solubilização com DMSO e as diluições posteriores foram realizadas com PBS, para uma concentração máxima de 0.5% de DMSO antes da exposição das células.

3.3. Teste de Viabilidade Celular (MTT)

A avaliação da viabilidade celular é uma parte fundamental dos ensaios *in vitro*. A necessidade de distinção entre células viáveis e não viáveis pode estar relacionada com o objetivo principal do trabalho, como nos testes de toxicidade, como também pode ser uma informação necessária para a correlação com outros parâmetros avaliados, ou ainda uma informação necessária para a correta interpretação de resultados (STODDART, 2011).

O ensaio do MTT é uma técnica largamente empregada para a avaliação da citotoxicidade de diferentes compostos *in vitro*, utilizando-se tanto de linhagens celulares imortalizadas quanto de células primárias, sendo empregado para a avaliação da citotoxicidade em novos modelos experimentais (HO et al., 2012). O método foi desenvolvido como uma alternativa não radioativa ao método de incorporação de timidina ao DNA e foi o primeiro ensaio desenvolvido no formato de 96 poços adequado para “*high throughput screening*” (MOSMANN, 1983).

O reagente de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é adicionado no meio de cultivo celular e incubado, sendo que células metabolicamente ativas convertem, através de redução, o reagente de MTT em formazan, de coloração arroxeada, que possui absorção máxima próxima de 570 nm. As células mortas rapidamente perdem a capacidade de converter o reagente de MTT.

Figura 5: Redução do reagente de MTT (STODDART, 2011).

O mecanismo da reação de redução do MTT envolve moléculas redutoras como o NADH e o NADPH, sendo função não apenas da atividade mitocondrial, mas também do compartimento citosólico e de outras membranas (BERRIDGE; HERST e TAN, 2005; BERRIDGE e TAN, 1993). O formazan formado é insolúvel e se precipita no poço, sendo depositado também no meio e na superfície celular, necessitando ser solubilizado antes da leitura. A quantidade de sinal gerada é depende de vários parâmetros como: a concentração de MTT, o período de incubação, o número de células viáveis e o seu estado metabólico (BERRIDGE; HERST e TAN, 2005; BERRIDGE e TAN, 1993). O método MTT, originalmente descrito por Mosmann (1983), com pequenas modificações, foi utilizado para verificar a citotoxicidade do mercúrio e da curcumina em diferentes concentrações. O seguinte protocolo foi adotado durante os experimentos:

Utiliza-se uma placa de 96 poços, de modo que os três primeiros poços para a leitura do branco não recebem células e tratamento, o restante recebe 5×10^4 células por poço com um volume final de 100 μL , sendo incubado por 24h. Após um dia de incubação, adicionar 100 μL dos agentes (droga teste ou controles), sendo o volume final de cada poço de 200 μL . As células são novamente incubadas por mais 24 h. Após esse período, 10 μL de solução MTT 5 mg/mL (dissolvido em PBS) é adicionado em todos os poços (incluindo branco), e as células são incubadas por mais 2 horas. A placa é centrifugada (2012.4g durante 5 minutos) e todo o sobrenadante é descartado. Adiciona-se 100 μL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO), seguido de agitação da placa (totalmente coberta com papel laminado) por 20 minutos em agitador. Procede-se a leitura das absorbâncias em 570 nm com um leitor de microplacas.

3.4. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa é uma técnica utilizada para o estudo da genotoxicidade baseada no princípio da migração do DNA em um gradiente eletroforético, atraindo a atenção dos pesquisadores por sua relativa simplicidade de execução aliada à sua versatilidade e sensibilidade, encontrando aplicação em estudos de genotoxicidade, biomonitoramento e epidemiologia (COLLINS et al., 1997, 2014), principalmente nos trabalhos que envolvam substâncias de conhecidas propriedades genotóxicas, como é o caso do mercúrio (CRESPO-LÓPEZ et al., 2009).

No ensaio do cometa, células incorporadas em agarose são colocadas sobre uma lâmina, lisadas com detergente e uma alta concentração de sal, submetidas a um processo de desnaturação do DNA e a uma eletroforese, de forma que células com uma maior quantidade de quebras no DNA irão apresentar uma maior migração desse DNA em relação ao ânodo, formando um padrão semelhante a um cometa, com o nucleóide como sua cabeça e os fragmentos de DNA que migraram presentes na cauda. Entretanto, os danos detectados dessa forma podem não necessariamente resultar em mutação, sendo ainda passíveis de reparo (COLLINS et al., 1997). A versão alcalina do ensaio do cometa (pH 13) foi desenvolvida por Singh et al. (1988), sendo capaz de detectar quebras de fita-simples, quebras de fita-dupla, sítios álcali-lábeis e cross-links DNA-DNA ou DNA proteína. Suas principais vantagens são sua sensibilidade, seu baixo custo, a necessidade de um pequeno número de células e a rapidez para se obter os resultados (TICE et al., 2000). O alto valor de pH utilizado na versão alcalina causa a desnaturação do DNA e o relaxamento da dupla-fita, causando um aumento na migração do DNA associado com a aumento do nível de quebras de fita-simples e sítios apurínicos se expressando como quebras de fita-simples.

Alguns dos parâmetros chave dessa metodologia são a densidade da agarose utilizada, a duração da desnaturação em pH alcalino e a duração da eletroforese (ERSSON e MÖLLER, 2011). Uma concentração muita alta da agarose pode comprometer a migração do DNA (ERSSON e MÖLLER, 2011), já uma densidade celular muita elevada pode dificultar a análise pela sobreposição dos cometas, principalmente em situações com uma maior quantidade de dano no DNA. A duração da desnaturação em pH alcalino pode sofrer variação devido as condições experimentais, principalmente a presença de sítios álcali-lábeis resistentes ao tratamento alcalino, como encontrado no caso de células irradiadas (ERSSON e MÖLLER, 2011). Em relação à duração da eletroforese, as condições devem ser tais que permitam que ocorra algum grau de migração do DNA nos controles negativos, como forma de avaliação da variabilidade intra-laboratorial (TICE et al., 2000). Depois de prontas, as

lâminas utilizadas nessa técnica podem ser coradas com uma série de corantes de DNA como brometo de etídeo, DAPI, SYBR GREEN I, GelRed e nitrato de prata.

Para a análise dos cometas e a realização do escore podem ser utilizados tanto sistemas automatizados (Figura 6) quanto o escore visual, realizado pelo próprio observador. Visualmente os cometas formados podem ser classificados em quatro classes (0, 1, 2 e 3), de forma crescente em relação à migração da cauda, sendo que a classe zero não apresentaria nenhum dano (COLLINS et al., 1997).

Figura 6: Programa *Comet Assay IVTM* (Perceptive Instruments, Haverhill, Inglaterra) utilizado para análise do ensaio do cometa. Fonte: <http://www.perceptive.co.uk/cometassay/>.

O ensaio do cometa foi realizado como forma de avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e anti-genotóxicos dos compostos. Foram selecionadas diferentes concentrações e os testes foram realizados com base no protocolo estabelecido por Tice et al. (2000) e modificado por Tsuboy et al. (2007). Utiliza-se uma placa de 24 poços com 1×10^6 células por poço. Após o tratamento por quatro horas com os agentes químicos, as células foram colhidas com o uso de tripsina 0,25%. Antes da realização dos ensaios foi verificada a viabilidade

celular através da utilização do azul de tripan, com o auxílio de um contator de células automático Countess® (Invitrogen).

Na preparação das lâminas com agarose são utilizadas lâminas de microscópio tradicionais que são recobertas com agarose de ponto de fusão normal. As células são suspensas em solução de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Gibco, Gaithersburg, MD, Estados Unidos), transferindo-se 80µL dessa mistura para uma lâmina convencional pré-coberta com agarose normal 1,5%, e recobrindo com uma lamínula (24 x 60mm). As lâminas são resfriadas por 20 minutos em geladeira, para permitir a solidificação da agarose. Após a solidificação da agarose, as lamínulas são retiradas e as lâminas imersas em solução de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, DMSO 10%, Triton X-100 1%, pH 10) por 14h, sendo mantidas em geladeira a 4°C. Em seguida, as lâminas são retiradas da lise e colocadas em tampão alcalino de eletroforese (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13, 4°C) por 20 minutos. Após o período de desnaturação as lâminas são submetidas à eletroforese em condição alcalina, utilizando-se uma solução de composição idêntica à utilizada para o processo de desnaturação. A eletroforese foi realizada a 25 V e 300 mA (0,74V/cm) durante 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas são colocadas em solução de neutralização (Tris 0,4M, pH 7,5 a 4° C) por 5 minutos. As lâminas foram secas a temperatura ambiente, fixadas em etanol absoluto por 2 minutos e armazenadas. As lâminas foram coradas com GelRed™ (Biotium, USA) e examinadas em microscópio de fluorescência (AxioStar Plus, Carl Zeiss Axio Cam MRc - AxioVision 3.1) utilizando filtro 516-560nm, barreira de filtro de 590nm, aumento original 200x. Para cada tratamento, foram analisados 100 nucleóides por meio do software de análise de imagem *CometAssay IV* (Perceptive Instruments), sendo avaliado o parâmetro *Tail Intensity*, referente à porcentagem de DNA na cauda.

3.5. Determinação de Glutathione

Os métodos atuais para determinação de GSH se dividem em espectofotométricos e métodos HPLC. Entre os métodos espectofotométricos se destacam os ensaios de reciclagem, que utilizam a especificidade da Glutathione redutase (GR) para a determinação de GSH e GSSG. A determinação de GSH se baseia na sua reação com o DNTB (5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico) para produzir o cromóforo TNB, que pode ser quantificado a 412 nm e que possui uma taxa de formação proporcional à quantidade de GSH. Para a determinação de GSSG é utilizado o reagente 2-vinilpiridina, que se liga ao GSH presente inicialmente na amostra e impede sua reação com o DTNB, permitindo que apenas o GSSG presente no meio seja reduzido para GSH e reaja com o DTNB (RAHMAN; KODE e BISWAS, 2006).

Dessa forma, resumidamente, primeiramente as células são colhidas e lavadas com a utilização de PBS gelado, sendo transferidas para eppendorfs previamente resfriados. É realizada a lise das células através de sonicação em água gelada e três ciclos de congelamento e descongelamento. É feita a centrifugação do material e separação do sobrenadante, que será utilizado para a determinação de GSH/GSSG. O sobrenadante de cada tratamento é dividido em duas partes, uma será utilizada para a determinação de GSH total e outra para determinação de GSSG. Primeiramente é realizada a determinação de GSH total no sobrenadante, para isso as amostras são tratadas com GR, que converte o GSSG presente em GSH, que posteriormente reage com o DTNB, formando o cromóforo TNB, que então pode ser lido em 412 nm. Em seguida é realizada a determinação de GSSG na outra parte do sobrenadante, para isso as amostras são tratadas inicialmente com o reagente vinilpiridina, que se liga ao GSH inicialmente presente na amostra, impedindo sua posterior reação com o reagente DTNB. As amostras são então tratadas com GR, que irá converter o GSSG presente em GSH. Esse GSH recém formado reage então com o DTNB para formar o TNB, entretanto isso não ocorre com o GSH inicialmente presente na amostra, devido ao seu processo de derivatização com a vinilpiridina. Dessa forma, as concentrações de GSH e GSSG podem ser obtidas através da curva de calibração de GSH e subtração da quantidade de GSSG determinada da quantidade de GSH total.

Para a realização do experimento foram semeadas 2×10^6 células em uma garrafa de cultura pequena (25cm²) e realizada a exposição aos compostos durante um período de 24 horas. Após o tratamento prosseguiu-se com a determinação de glutathiona reduzida/oxidada de acordo com RAHMAN; KODE e BISWAS (2006).

3.6. Expressão gênica por PCR-Array

O sistema "RT² Profiler PCR Array" representa a união da PCR em tempo real com a capacidade de avaliação de múltiplos genes do microarray, através da presença de diversos genes contidos individualmente nos poços de uma placa, nos quais se processa uma reação de PCR em tempo real. A PCR em tempo real constitui uma evolução em relação à técnica original desenvolvida na década de 80 (SAIKI et al., 1988). Na PCR convencional qualquer sequência nucleotídica podia ser amplificada para gerar um grande número de cópias, entretanto a quantificação do número original de cópias presentes na amostra era dificultada, pois apenas o resultado final da amplificação podia ser visualizado. Com a PCR em tempo real, através da amplificação e detecção simultâneas, a quantidade de produto formada é monitorada em cada ciclo de amplificação através da fluorescência emitida por corantes ou

sondas que se ligam ao DNA, com a detecção dos produtos da amplificação sendo realizada à medida que eles se acumulam (RAEYMAEKERS, 2000). Os dois sistemas básicos para geração da fluorescência são os agentes intercalantes da fita de DNA e as sondas fluorescentes. Os agentes intercalantes são representados por corantes como o SYBR[®] Green 1 (KUBISTA et al., 2006; RAEYMAEKERS, 2000). Um controle necessário na análise de PCR em tempo real é a utilização de genes de referência como forma de minimizar erros introduzidos por pequenas diferenças existentes entre as amostras em parâmetros como a quantidade de RNA inicial, eficiência da síntese de cDNA e de amplificação. Nessa abordagem a sequência de um gene de referência é amplificada junto com a sequência alvo, servindo como um padrão interno, contra o qual a expressão de outras sequências pode ser normalizada, sendo que genes de referência são escolhidos justamente com base na constância da sua expressão. Alguns exemplos de genes de referência incluem o da β -actina, uma proteína do citoesqueleto, e o da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma enzima da via glicolítica (RAEYMAEKERS, 2000).

Para a realização do ensaio, foram semeadas 2×10^6 células em uma garrafa de cultura pequena (25cm²) com 5 mL de meio de cultivo. As células foram expostas aos compostos testados durante um período de 24 horas. Após o tratamento foi dado início à extração do RNA das células. O RNA total das células foi extraído utilizando-se a técnica do TRIzol[®] e purificado com o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA).

Todas as amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria com o uso de um aparelho NanoDrop (ThermoScientific) e tiveram sua pureza verificada pelas razões A_{260}/A_{280} , que mostra possíveis contaminações por proteínas e DNA; e pela razão A_{260}/A_{230} , que mostra contaminação por sais e compostos orgânicos, como guanidina e fenol. As amostras de RNA também tiveram sua integridade checada em gel de agarose 1%. Para a análise da expressão gênica foram utilizadas as placas da via *Human DNA Damage Signaling Pathway PCR Array* de acordo com as instruções do fabricante (SABiosciences, Qiagen, EUA), composta de múltiplos genes, distribuídos entre as classes conforme descrito abaixo. O cDNA foi sintetizado com o kit *RT² First Strand cDNA Kit* (SABiosciences, Qiagen, EUA), a partir de 500ng de RNA total, de acordo com as instruções do fabricante. Para a preparação do mix adicionado nas placas foi utilizado o kit *RT² SYBR Green Master Mix* (SABiosciences, Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram avaliadas com a utilização de um termociclador *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Os genes investigados foram: **processo de apoptose** (*ABL1*, *BRCA1*, *CIDEA*, *GADD45A*, *GADD45G*, *GML*, *IP6K3*, *PCBP4*, *AIFM1*

(*PDCD8*), *PPP1R15A*, *RAD21*, *TP53*, *TP73*), **bloqueio do ciclo celular** (*CHEK1*, *CHEK2*, *DDIT3* (*CHOP*), *GADD45A*, *GML*, *GTSE1*, *HUS1*, *MAP2K6*, *MAPK12*, *PCBP4*, *PPP1R15A*, *RAD17*, *RAD9A*, *SESN1*, *ZAK*), **checkpoint** (*ATR*, *BRCA1*, *FANCG*, *NBN* (*NBS1*), *RAD1*, *RBBP8*, *SMC1A* (*SMC1L1*), *TP53*), **reparo do DNA** (*ANKRD17*, *BRCA1*, *DDB1*, *DMC1*, *ERCC1*, *FANCG*, *FEN1*, *MPG*, *MSH2*, *MSH3*, *N4BP2*, *NBN* (*NBS1*), *OGG1*, *PMS2P3* (*PMS2L9*), *PNKP*, *RAD1*, *RAD18*, *RAD51*, *RAD51B*, *REV1* (*REV1L*), *SEMA4A*, *XPA*, *XPC*, *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*), **reparo por excisão de bases** (*APEX1*, *MBD4*, *MPG*, *MUTYH*, *NTHL1*, *OGG1*, *UNG*), **reparo de quebra de cadeia dupla** (*CIB1*, *FEN1*, *XRCC6* (*G22P1*), *XRCC6BP1* (*KUB3*), *MRE11A*, *NBN* (*NBS1*), *PRKDC*, *RAD21*, *RAD50*), **reparo mismatch** (*ABL1*, *ANKRD17*, *EXO1*, *MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH3*, *MUTYH*, *N4BP2*, *PMS1*, *PMS2*, *PMS2P3* (*PMS2L9*), *TP73*, *TREX1*), outros genes relacionados ao reparo do DNA (*ATM*, *ATR*, *BTG2*, *CCNH*, *CDK7*, *CRY1*, *ERCC2* (*XPB*), *GTF2H1*, *GTF2H2*, *IGHMBP2*, *LIG1*, *MNAT1*, *PCNA*, *RPA1*, *SUMO1*) e os **genes de referência** (*B2M*, *HRPT* e *RPL13A*).

No método proposto, os níveis de expressão dos genes de interesse foram comparados em relação a genes de referência pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Foram selecionados apenas os genes que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$, Teste *t* de Student.) em relação ao grupo controle e apenas genes que tiveram variação da expressão maior ou igual a duas vezes em comparação ao grupo controle.

3.7. Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($N=3$). Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo Teste Kolmogorov-Smirnov e submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de comparação múltipla de Tukey, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.01. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todos os parâmetros avaliados.

4 Resultados e Discussão

4.1. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

Para a avaliação da citotoxicidade dos compostos e seleção das concentrações para os experimentos de associação entre a curumina e o mercúrio, foi realizado o ensaio do MTT como descrito em material e métodos.

O metil metano sulfonato (MMS), um agente alquilante com propriedades citotóxicas e genotóxicas (WYATT; PITTMAN, 2006), foi utilizado como controle positivo. Como pode ser observado na Figura 7, o MMS apresentou uma resposta citotóxica dose-dependente bem definida em células HepG2, caracterizando-se como um bom controle positivo para os tratamentos. A concentração de 400 μM de MMS foi selecionada para utilização como controle positivo (CP) durante os experimentos do ensaio do MTT.

Figura 7: Avaliação da citotoxicidade do metil metano sulfonato (MMS) em células HepG2 pelo ensaio do MTT. As células foram tratadas com 100, 400 e 800 μM de MMS durante 24 horas. CN: controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

Após a avaliação do MMS como controle positivo, foi realizado o MTT do metanol, solvente inicial dos compostos de mercúrio, como forma de avaliar uma possível interferência

do composto na avaliação da citotoxicidade. Na figura 8 é apresentado o teste das concentrações de metanol equivalentes às concentrações presentes nos compostos de mercúrio testados. Como pode ser observado, o metanol não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações avaliadas.

Figura 8. Avaliação da citotoxicidade do metanol em células HepG2 pelo ensaio do MTT. As células foram tratadas com concentrações equivalentes às aquelas presentes nas concentrações testadas de mercúrio (0,0625-32 μM) durante 24 horas. CN: controle negativo. CP: MMS 400 μM. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

Depois de descartada a possibilidade de interferência do solvente foram realizados os testes com as duas formas orgânicas de mercúrio, etilmercúrio e metilmercúrio, e com a curcumina. Nos testes de citotoxicidade os compostos orgânicos de mercúrio apresentaram um aumento significativo da citotoxicidade em concentrações iguais ou maiores que 16 μM, como pode ser observado nas Figuras 9 e 10.

Figura 9: Avaliação da citotoxicidade do metil mercúrio (MeHg) em células HepG2 pelo ensaio do MTT. As células foram tratadas com 0,0625-32 μM de MeHg durante 24 horas. CN: controle negativo. CP: MMS 400 μM. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 10: Avaliação da citotoxicidade do etil mercúrio (EtHg) em células HepG2 pelo ensaio do MTT. As células foram tratadas com 0,0625-32 μM de EtHg durante 24 horas. CN: controle negativo. CP: MMS 400 μM. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

O aumento brusco na citotoxicidade observado para os compostos de mercúrio se assemelha ao comportamento observado em relação a alguns dos alvos do mercúrio no organismo e parece estar relacionado com a saturação do pool de ligantes intracelulares para o mercúrio, como a glutathione (ZALUPS e KOROPATNICK., 2010).

A curcumina apresentou citotoxicidade apenas na concentração de 128 μM , como observado na Figura 11.

Figura 11: Avaliação da citotoxicidade da curcumina em células HepG2 pelo ensaio do MTT. As células foram tratadas com 0,0625-128 μM de curcumina durante 24 horas. CN: controle negativo. CS: controle solvente (DMSO). CP: MMS 400 μM . Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

Após a análise da citotoxicidade dos compostos de forma isolada, foi realizada a avaliação das diferentes associações em um protocolo de exposição simultânea, como forma de identificar possíveis interações entre os compostos e a possibilidade da curcumina oferecer alguma forma de proteção contra a citotoxicidade do mercúrio. Para essa etapa foram selecionadas três concentrações de mercúrio (8, 16 e 32 μM), uma não citotóxica e duas com grau crescente de citotoxicidade, e cinco concentrações não citotóxicas de curcumina (4, 8, 16, 32 e 64 μM). Os possíveis efeitos de interação entre a curcumina e o mercúrio foram identificados pela diferença estatística entre os tratamentos de associação e os tratamentos com o mercúrio isolado em concentração correspondente ao tratamento, designados como controle associação (CA).

Nos experimentos de associação entre a curcumina e as duas formas do mercúrio foi observado o aumento da citotoxicidade entre a concentração de 64 μM de curcumina e as

concentrações de 8 μM de MeHg (Figura 12A), 16 μM de MeHg (Figura 12B) e 8 μM de EtHg (Figura 13A).

Figura 12: Avaliação da citotoxicidade da associação entre o MeHg e a curcumina (CMN) em células HepG2 pelo ensaio do MTT. As células foram tratadas com 0-64 μM de curcumina em associação com 8 μM (Fig.12A), 16 μM (Fig.12B) e 32 μM (Fig.12C) de MeHg durante 24 horas, utilizando-se um protocolo de exposição simultânea. CN: controle negativo. CA: controle associação (MeHg). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). # indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle associação ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

v

Figura 13: Avaliação da citotoxicidade da associação entre o EtHg e a curcumina (CMN) em células HepG2 pelo ensaio do MTT. As células foram tratadas com 0-64 μM de curcumina em associação com 8 μM (Fig.13A), 16 μM (Fig.13B) e 32 μM (Fig.13C) de EtHg durante 24 horas, utilizando-se um protocolo de exposição simultânea. CN: controle negativo. CA: controle associação (EtHg). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). # indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle associação ($p < 0,05$). Anova e pós-teste de Tukey.

Dessa forma a curcumina não só não foi capaz de reduzir a citotoxicidade do mercúrio em células HepG2, como, em sua concentração de 64 μM, causou o aumento da citotoxicidade, através da potenciação dos efeitos tóxicos do mercúrio. O fenômeno da potenciação ocorre quando um composto não apresenta toxicidade de forma isolada, no caso a curcumina na concentração de 64 μM, mas causa o aumento na toxicidade de outro composto quando ambos são administrados conjuntamente, sendo um exemplo desse tipo de interação a

potenciação dos efeitos hepatotóxicos do tetracloreto de carbono causada pelo isopropanol (EATON e GILBERT, 2008).

Apesar de vários dados existentes sobre as propriedades antioxidantes da curcumina, foi demonstrado que os seus efeitos podem ser dose-dependentes, com concentrações menores apresentando potencial antioxidante e concentrações maiores apresentando potencial pró-oxidante, associado principalmente com o decréscimo da concentração de GSH (BANERJEE et al., 2008) e a possibilidade de geração de espécies reativas (LÁZARO, 2008), como o radical hidroxila (ARAÚJO, ANTUNES e TAKAHASHI, 2001). Esse comportamento dose-dependente é conhecido também para outros compostos naturais, como a quercetina, o ácido cafeico e a epigallocatequina, com baixas concentrações apresentando propriedades benéficas e concentrações mais altas apresentando propriedades citotóxicas, pró-oxidantes e genotóxicas (BOUAYED e BOHN, 2010).

Na literatura podem ser encontrados possíveis mecanismos pelos quais a curcumina poderia contribuir com o estresse oxidativo e atuar de forma a aumentar a toxicidade quando em associação com o mercúrio, como a conjugação com o GSH (AWASTHI et al., 2000) e a inibição das enzimas GST (VAN IERSEL et al., 1996), e tioredoxina-redutase (TrxR) (FANG; LU e HOLMGREN, 2005), todos importantes componentes do sistema de defesa antioxidante do organismo e conhecidos alvos da toxicidade do mercúrio (BERNHOF, 2012; STOHS e BAGCHI, 1995).

Outros estudos envolvendo a associação de metais com a curcumina já mostraram aumento da toxicidade associada com efeitos pró-oxidantes com o cobre (LEUNG; HARADA e KEE, 2013) e com o cádmio (KARAYTUG; SEVGILER e KARAYAKAR, 2011), além de existirem diversos relatos na literatura sobre a capacidade da curcumina em sensibilizar linhagens tumorais aos efeitos citotóxicos de outros compostos, causando um aumento da citotoxicidade (ARZUMAN et al., 2014; THULASIRAMAN; MCANDREWS e MOHIUDDIN, 2014).

4.2. Ensaio do Cometa

Partindo-se dos resultados obtidos no ensaio do MTT para a avaliação da citotoxicidade dos compostos, foi feita a escolha de três concentrações de MeHg, EtHg e curcumina, 8, 16 e 32 μ M, para a realização do ensaio do cometa como descrito em material e métodos.

O MeHg apresentou um aumento significativo da genotoxicidade em todas as concentrações testadas, além de um efeito dose-dependente, enquanto o EtHg apresentou genotoxicidade apenas na concentração de 32 μM (Figura 14). A curcumina não apresentou genotoxicidade em nenhuma das concentrações analisadas (Figura 15).

Figura 14: Avaliação da genotoxicidade do MeHg e do EtHg em células HepG2 pelo parâmetro *Tail intensity* do ensaio do Cometa. As células foram tratadas com 8-32 μM de cada um dos compostos durante 4 horas. CN: controle negativo. CP: controle positivo (100 μM MMS). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 15: Avaliação da genotoxicidade da curcumina (CMN) em células HepG2 pelo parâmetro *Tail intensity* do ensaio do Cometa. As células foram tratadas com 8, 16 e 32 μM de curcumina durante 4 horas. CN: controle negativo. CS: controle solvente. CP: controle positivo (100 μM MMS). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

Para a associação dos compostos foi selecionada a concentração de 8 μM de MeHg e EtHg, e de 8, 16 e 32 μM de curcumina, de forma a permitir uma comparação posterior com outros ensaios sem prejuízo da viabilidade, já que as concentrações de mercúrio maiores que 8 μM apresentaram redução significativa da viabilidade no ensaio do MTT. Os possíveis efeitos de interação entre a curcumina e o mercúrio foram identificados pela diferença estatística entre os tratamentos de associação e os tratamentos com o mercúrio isolado em concentração correspondente ao tratamento, designados como controle associação (CA).

A associação dos compostos, visando identificar alguma interação que resultasse no aumento ou na diminuição da genotoxicidade, através de um possível efeito protetor, não mostrou nenhum efeito nas concentrações mais baixas de curcumina, entretanto, foi observado um aumento significativo da genotoxicidade na associação do MeHg com 32 μM de curcumina (Figuras 16 e 17).

Figura 16: Avaliação da genotoxicidade do MeHg associado com a curcumina em células HepG2 pelo parâmetro *Tail intensity* do ensaio do Cometa. As células foram tratadas com cada um dos compostos durante 4 horas. CN: controle negativo. CP: controle positivo (100 μ M MMS). CA: controle associação (MeHg 8 μ M). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). # indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle associação ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 17: Avaliação da genotoxicidade do EtHg associado com a curcumina em células HepG2 pelo parâmetro *Tail intensity* do ensaio do Cometa. As células foram tratadas com cada um dos compostos durante 4 horas. CN: controle negativo. CP: controle positivo (100 μ M MMS). CA: controle associação (EtHg 8 μ M). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). # indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle associação ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

A genotoxicidade dos compostos de mercúrio em células da linhagem HepG2 está bem documentada na literatura (BARCELOS et al., 2011a; KAIVALYA; NAGESHWAR RAO e SATISH RAO, 2011; SHETTIGAR et al., 2014), com o MeHg apresentando maior genotoxicidade em relação aos compostos inorgânicos, como o HgCl₂, sendo a genotoxicidade do mercúrio atribuída à sua capacidade de geração de espécies reativas, que podem danificar o material genético, os microtúbulos, e também enzimas do sistema de reparo do DNA, além da possibilidade de interação direta entre o mercúrio e todos esses componentes, comprometendo funções ligadas ao reparo do DNA (CRESPO-LÓPEZ et al., 2009).

A curcumina, apesar de seus efeitos antioxidantes, pode, assim como outros compostos polifenólicos, apresentar atividades pró-oxidante e genotóxica de forma dose-dependente (BOUAYED e BOHN, 2010), com altas concentrações podendo causar o aumento de quebras no DNA (CAO et al., 2006; ROWE et al., 2009) e o aumento na formação de micronúcleos (CAO et al., 2007; MENDONÇA et al., 2009). Entretanto, existem na literatura outros mecanismos pelos quais a curcumina pode exercer atividade genotóxica, com trabalhos

mostrando a diminuição na expressão do gene *TP53* (LÁZARO, 2008), um importante fator de transcrição para a manutenção da estabilidade genômica, o comprometimento da função da enzima topoisomerase II na replicação do DNA, podendo causar um aumento de quebras no material genético e indução de apoptose (KETRON et al., 2013), além da possibilidade de a curcumina em si agir como um agente intercalante do DNA (MENDONÇA et al., 2010). Apesar de a curcumina não ter apresentado genotoxicidade de forma isolada no ensaio do cometa, sua associação com o MeHg levou ao aumento da genotoxicidade. Mendonça et al. (2010) também não observaram aumento na porcentagem de DNA no ensaio do cometa em células tratadas com curcumina de forma isolada, mas sim uma diminuição na migração do DNA, que foi associada com uma possível formação de crosslinks de DNA.

O aumento da genotoxicidade observado na associação poderia ser reflexo da interação da curcumina com mecanismos de defesa importantes para a proteção celular contra o mercúrio, como no caso da diminuição da concentração de GSH (BANERJEE et al., 2008), o que poderia levar ao aumento do estresse oxidativo e consequente aumento da genotoxicidade, como também poderia ser fruto de outros mecanismos, como alterações na expressão de genes importantes para o reparo do DNA e manutenção da sua estabilidade, como o *TP53* (LÁZARO, 2008).

4.3. Determinação de Glutathiona

Com base nos resultados dos ensaios anteriores foram selecionadas as concentrações de 8 μ M de MeHg e EtHg, e 32 μ M de curcumina, para a realização da determinação de GSH/GSSG como descrito em material e métodos.

Como pode ser observado na figura 18, o tratamento das células com MeHg ou EtHg causou um aumento significativo na concentração de GSH intracelular, entretanto quando foi realizada a associação com a curcumina, esse aumento não ocorreu para o MeHg. A concentração de GSSG intracelular sofreu aumento no tratamento com EtHg, e nas associações da Curcumina com o MeHg e com o EtHg (Figura 19). Apesar das diversas variações nas concentrações individuais de GSH e GSSG, quando analisamos a razão GSH/GSSG o único tratamento que sofreu uma alteração significativa foi o MeHg isolado, sendo que o aumento na razão observado não ocorreu em associação com a curcumina (Figura 20).

Figura 18: Concentração de GSH em células HepG2. As células foram tratadas com 8 μ M de MeHg ou 8 μ M de EtHg, de forma isolada ou em associação com 32 μ M de curcumina, durante 24 horas. CN: controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 19: Concentração de GSSG em células HepG2. As células foram tratadas com 8 μ M de MeHg ou 8 μ M de EtHg, de forma isolada ou em associação com 32 μ M de curcumina, durante 24 horas. CN: controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 20: Razão GSH/GSSG em células HepG2. As células foram tratadas com 8 μ M de MeHg ou 8 μ M de EtHg, de forma isolada ou em associação com 32 μ M de curcumina, durante 24 horas. CN: controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * indica os tratamentos estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). ANOVA e pós-teste de Tukey.

O aumento observado na concentração de GSH observado nas células tratadas com mercúrio pode ser considerado um mecanismo inicial de defesa contra o estresse oxidativo, atuando como um mecanismo de compensação celular (CUELLO et al., 2010; DO NASCIMENTO et al., 2008). O estudo realizado por Cuello et al. (2010) mostrou uma variação temporal na concentração de GSH em células HepG2 expostas ao MeHg, com um aumento de cerca de 98% na concentração nas primeiras 8 horas após a exposição, seguido por um declínio gradual até atingir aproximadamente 92% da concentração original 24 horas depois. Outros trabalhos da literatura também mostraram um comportamento semelhante, com um aumento inicial na concentração de GSH ocorrendo no fígado de ratos e camundongos expostos ao mercúrio, mas com uma tendência de diminuição em períodos de exposição prolongados (HUSSAIN et al., 1999; JI et al., 2006).

De forma interessante a associação do MeHg com a curcumina parece ter impedido o aumento da razão GSH/GSSG. Se considerarmos esse aumento na razão GSH/GSSG como um mecanismo de defesa contra a toxicidade do mercúrio, então isso poderia trazer consequências prejudiciais para a célula, como o aumento do estresse oxidativo, e estar implicado no aumento da citotoxicidade e da genotoxicidade observados quando o mercúrio foi associado com a curcumina.

Na literatura são encontrados alguns possíveis mecanismos pelos quais a curcumina poderia comprometer o aumento na concentração de glutathione. Existem dados sobre a capacidade de a curcumina formar ligações com resíduos de cisteína (LÁZARO, 2008), o que poderia limitar a disponibilidade da cisteína como substrato para a síntese de GSH, já que sua concentração é um fator limitante para a atividade da enzima GCL (LU, 2013), responsável pela primeira etapa na síntese de GSH. Outro possível mecanismo envolve a supressão do fator de transcrição NF- κ B pelo tratamento com curcumina (LÁZARO, 2008), que atua aumentando a expressão dos genes das enzimas GCL e GS, responsáveis pela síntese de GSH, em situações de estresse (LU, 2013).

4.4. Análise de expressão gênica por PCR-Array

Com base nos resultados dos ensaios anteriores, com as alterações significativas causadas pelo MeHg nos testes de genotoxicidade e de determinação da razão GSH/GSSG, foram selecionadas as concentrações de 8 μ M de MeHg e 32 μ M de curcumina para a realização da análise de expressão gênica como descrito em material e métodos.

A análise da expressão gênica mostrou um total de 26 genes modulados nos tratamentos com MeHg isolado e MeHg associado com curcumina, sendo que 3 genes tiveram aumento na expressão, *DDIT3*, *GADD45A* e *PPP1R15A*, relacionados principalmente com o bloqueio do ciclo celular e o processo de apoptose, e 23 genes tiveram sua expressão reduzida, relacionados com diversas vias de reparo do DNA, checkpoints do ciclo celular e apoptose (Tabela 1). As células tratadas apenas com curcumina não exibiram nenhuma alteração significativa na expressão dos genes investigados, fato que concorda com os resultados do ensaio do MTT e do cometa, no quais não foram observadas alterações significativas.

Tabela 1. Expressão relativa de genes significativamente alterados em células HepG2 tratadas com metilmercúrio (**MeHg**) ou metilmercúrio associado com curcumina (**MeHg+CMN**). A tabela traz os genes, seus respectivos valores de fold change nos diversos tratamentos e as vias das quais fazem parte.

Genes	MeHg	MeHg+CMN	Via Celular
<i>ATM</i>	Na	-2,32	Reparo do DNA
<i>ATRX</i>	-2,05	-2,31	Reparo do DNA
<i>BRCA1</i>	-2,89	-2,04	Apoptose, Reparo do DNA, Checkpoint
<i>DDB1</i>	Na	-2,76	Reparo do DNA
<i>DDIT3</i>	+2,19	Na	Bloqueio do ciclo celular
<i>DMC1</i>	-5,70	-5,48	Reparo do DNA
<i>ERCC2</i>	-2,73	Na	Reparo do DNA
<i>GADD45A</i>	+3,68	+6,06	Apoptose, Bloqueio do ciclo celular
<i>XRCC6BP1</i>	-2,24	-2,50	Reparo do DNA
<i>LIG1</i>	-2,25	-2,03	Reparo do DNA
<i>MAP2K6</i>	-3,10	-3,54	Bloqueio do ciclo celular
<i>MAPK12</i>	-2,73	-2,33	Bloqueio do ciclo celular
<i>MUTHY</i>	-2,01	-2,03	Reparo do DNA
<i>NTHL1</i>	-2,99	-2,06	Reparo do DNA
<i>PCBP4</i>	-2,78	-2,55	Apoptose, Bloqueio do ciclo celular
<i>PMS2</i>	-2,20	Na	Reparo do DNA
<i>PPP1R15A</i>	Na	+2,46	Apoptose, Bloqueio do ciclo celular
<i>RAD1</i>	-2,01	-2,59	Checkpoint, Reparo do DNA
<i>RAD50</i>	-2,71	Na	Reparo do DNA
<i>RAD51B</i>	-2,99	-2,99	Reparo do DNA
<i>RPA1</i>	Na	-2,36	Reparo do DNA
<i>TP53</i>	Na	-2,28	Apoptose, Checkpoint
<i>UNG</i>	-2,29	-2,62	Reparo do DNA
<i>XPA</i>	-2,85	-3,47	Reparo do DNA
<i>XRCC1</i>	-4,32	-2,21	Reparo do DNA
<i>XRCC2</i>	Na	-2,68	Reparo do DNA

Os resultados foram normalizados pela expressão dos genes de referência *B2M*, *HRPT* e *RPL13A*. Os valores representam a média referente a quantas vezes o gene foi alterado em relação ao controle negativo, n=3. Aumento da expressão (+), diminuição da expressão (-) ou ausência de alteração (Na). $p < 0,05$, Teste *t* de Student.

De forma geral, as células tratadas com MeHg apresentaram diminuição na expressão de genes envolvidos com vias de reparo do DNA, apoptose, checkpoints e bloqueio do ciclo celular, e aumento na expressão de genes envolvidos com apoptose e checkpoints/bloqueio do ciclo celular. A associação da curcumina com o mercúrio não foi capaz de aumentar de forma significativa a expressão dos genes envolvidos com vias de reparo do DNA e causou um grande aumento na expressão dos genes *GADD45A* e *PPP1R15A*, envolvidos com situações de estresse genotóxico e vias de morte celular.

Em relação aos genes envolvidos com o processo de apoptose, nas células tratadas com MeHg houve a diminuição na expressão de dois genes, *BRCA1* e *PCBP4*, e aumento na expressão de um gene, *GADD45A*. Nas células tratadas com MeHg associado com curcumina, houve a diminuição na expressão de três genes, *BRCA1*, *PCBP4* e *TP53*, e o aumento na expressão de dois genes, *GADD45A* e *PPP1R15A*. Os genes que apresentaram a maior diferença entre os tratamentos foram o *GADD45A* e o *PPP1R15A*, ambos com o maior fold change nas células tratadas com MeHg associado com curcumina, e o *TP53*, com a menor expressão nesse mesmo tratamento.

Os genes da família *GADD45* codificam pequenas proteínas de localização nuclear que, através da interação com outras proteínas, funcionam como uma espécie de sensor de estresse celular (LIEBERMANN e HOFFMAN, 2008), controlando o destino celular através do balanço entre processos como parada do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose e senescência (MOSKALEV et al., 2012). A expressão dos genes da família *GADD45* é estimulada por uma série de insultos genotóxicos como: radiação UV, raios X, radicais livres e xenobióticos como a cisplatina e o metilmetanossulfonato (MOSKALEV et al., 2012). Diante dessas várias agressões, os genes *GADD45* podem atuar no reparo do DNA, na parada do ciclo celular e nos processos de senescência celular e apoptose.

Na ocorrência de dano no DNA os genes *GADD45* podem atuar na parada do ciclo celular em suas fases G1 ou G2/M, de forma a permitir o reparo do dano ou, na sua impossibilidade, encaminhar a célula para o processo apoptose (ZHANG et al., 2010). O aumento na expressão de *GADD45A* também está relacionado com a indução da senescência celular por diversos fatores, como no estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (DUAN et al., 2005), com a concomitante diminuição do reparo do DNA. Dessa forma, o aumento observado na expressão de *GADD45A* pode estar relacionado com o estresse oxidativo causado pelos compostos testados e com o subsequente dano ao DNA, como observado no ensaio do cometa.

O gene *PPP1R15A*, assim como o *GADD45A*, está envolvido com o processo de apoptose associado com situações de estresse celular, parada do ciclo celular e insultos genotóxicos. O aumento na sua expressão pode ser induzido por fatores genotóxicos, como exposição à radiação ionizante, de forma independente da proteína p53 (HOLLANDER et al., 1997). O *PPP1R15A* também parece estar envolvido no processo de apoptose mediado pelo estresse do retículo endoplasmático, causado principalmente pela perturbação no processo de enovelamento de proteínas (BRUSH; WEISER e SHENOLIKAR, 2003).

O gene *TP53* codifica uma série de isoformas da proteína p53 que atuam na manutenção da estabilidade genômica como proteínas supressoras de tumor (SURGET; KHOURY e BOURDON, 2013). A expressão do gene *TP53* pode ser induzida por diversas situações de estresse celular, como dano no DNA, hipóxia, estresse oxidativo e ativação de oncogenes, e sua função fisiológica está ligada principalmente a impedir a proliferação de células que apresentem danos no DNA. Esse controle é exercido através da regulação do ciclo celular, do reparo do DNA e do desencadeamento do processo de morte celular (OREN, 2003).

A proteína p53 atua como um fator de transcrição, se ligando diretamente a sítios no DNA, controlando a expressão de mais de 3600 genes (LI et al., 2013). Sua função é de grande importância para o processo de reparo do DNA e manutenção da estabilidade genômica. Após a ocorrência de dano no DNA, a proteína p53 pode mediar a parada do ciclo celular através da interação com outras proteínas, como a p21 e proteínas da família GADD45, permitindo o reparo do dano ao DNA, ou na sua impossibilidade, encaminhar a célula para a morte celular, principalmente através da interação com fatores da via intrínseca de apoptose (SURGET; KHOURY e BOURDON, 2013).

Dessa forma, o aumento observado na expressão dos genes *GADD45A* e *PPP1R15A* em células tratadas com a associação de mercúrio e curcumina concorda com os dados do ensaio do cometa, que mostram um aumento da genotoxicidade, e com outros dados da literatura, que associam a diminuição da expressão do *GADD45A* com situações opostas às encontradas nesse trabalho, com a diminuição do estresse oxidativo e da genotoxicidade (LIU et al., 2013). A diminuição na expressão do gene *TP53* também poderia estar ligada ao aumento da genotoxicidade pelo comprometimento de suas funções relacionadas ao reparo do DNA e a manutenção da estabilidade genômica.

No que se refere aos genes envolvidos com checkpoints e bloqueio do ciclo celular, o tratamento com MeHg apresentou dois genes com a expressão aumentada, *DDIT3* e *GADD45A*, e cinco genes com a expressão diminuída, *BRCA1*, *MAP2K6*, *MAPK12*, *PCBP4* e *RAD1*. O tratamento com MeHg associado com curcumina apresentou dois genes com a expressão aumentada, *GADD45A* e *PPP1R15A*, e seis com expressão diminuída, *BRCA1*, *MAP2K6*, *MAPK12*, *PCBP4*, *RAD1* e *TP53*. Os genes que apresentaram maior diferença entre os tratamentos foram *DDIT3* e *TP53*, ambos com maior expressão nas células tratadas com MeHg, e *GADD45A* e *PPP1R15A*, com maior expressão nas células tratadas com a associação de MeHg com curcumina.

O gene *DDIT3*, de forma similar ao *PPP1R15A*, parece estar envolvido no processo de parada do ciclo celular e indução de apoptose mediada pelo estresse do retículo endoplasmático (MARCINIAK et al., 2004).

De forma geral, os genes envolvidos com a sinalização de dano no DNA apresentaram diminuição da expressão em ambos os tratamentos, com quinze genes com a expressão diminuída no tratamento com MeHg e dezesseis genes no tratamento com MeHg associado com curcumina. Os genes que apresentaram maior diferença de fold change entre os tratamentos foram: *ATM*, *DDB1*, *ERCC2*, *PMS2*, *RAD50*, *RPA1*, *XRCC1*, *XRCC2* e *XPA*.

A desregulação de genes relacionado com o reparo do DNA já foi demonstrada em outros estudos com mercúrio. A análise do hepato-transcriptoma de zebrafish exposto ao HgCl mostrou, entre outras alterações, a desregulação de genes relacionados com o dano no DNA, embora tenha sido observado o aumento na expressão desses genes apenas cerca de 96 horas após a exposição, não tendo sido encontradas diferenças com 24 horas de exposição (UNG et al., 2010). Os autores desse mesmo estudo encontraram resultados similares quando realizaram a comparação dos dados de expressão do zebrafish com células HepG2 também expostas ao HgCl, e tomaram os padrões de expressão encontrados como indicativo dos alvos iniciais da toxicidade do HgCl, sendo esses genes relacionados com processos mitocondriais, apoptose, sistema do complemento e proteossomo.

A diminuição do reparo do DNA sugerida pelo perfil de expressão gênica encontrada nesse trabalho é indicada como um provável mecanismo de getonoxidade do mercúrio (CRESPO-LÓPEZ et al., 2009). A expressão diminuída apresentada por alguns desses genes de reparo poderia também sensibilizar as células HepG2, tornando-as mais susceptíveis a outros insultos genotóxicos, como radiação UV, radiação gama e estresse oxidativo, sendo esse um fenômeno já documentado na literatura para diversos desses genes, como o *ATM* (JACQUEMIN et al., 2012), *DDB1* (LI et al., 2006), *RPA1* (DODSON; SHI e TIBBETTS, 2004), *XRCC2* (JOHNSON; LIU e JASIN, 1999) e *XPA* (DE VRIES et al., 1998), podendo ter participação no aumento da genotoxicidade causado pela exposição conjunta das células ao MeHg e a curcumina.

Dessa forma, a exposição das células ao mercúrio causou o aumento na expressão de genes relacionados com dano ao DNA, parada do ciclo celular e apoptose, conjuntamente com a diminuição na expressão de genes relacionados com o reparo do dano no DNA. A associação com a curcumina levou ao aumento na expressão de genes relacionado com dano no DNA e apoptose, principalmente o *GADD45A* e o *PPP1R15A*, e não demonstrou recuperação significativa na expressão de genes ligados ao reparo do DNA, fato que concorda

com os resultados obtidos em outros ensaios, como o aumento da genotoxicidade observado no ensaio do cometa e da citotoxicidade no ensaio do MTT.

5 Conclusões

Foi realizado, nesse estudo, a avaliação dos efeitos da curcumina, do etilmercúrio e do metilmercúrio, de forma isolada ou combinada, em células da linhagem HepG2. A avaliação contemplou a citotoxicidade, a genotoxicidade, o estresse oxidativo e alteração na expressão gênica causados pelos compostos. Conforme os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os compostos orgânicos de mercúrio apresentaram citotoxicidade em concentrações iguais ou maiores que 16 μM .
- A associação entre os compostos de mercúrio e a curcumina apresentou um efeito de potenciação da citotoxicidade na concentração de 64 μM de curcumina.
- O MeHg apresentou genotoxicidade significativa nas concentrações de 8, 16 e 32 μM , sendo essa maior em relação ao EtHg, que só apresentou genotoxicidade significativa na concentração de 32 μM .
- A associação do MeHg ou do EtHg com a concentração de 32 μM de curcumina apresentou um aumento da genotoxicidade .
- O MeHg, mas não o EtHg, causou um aumento na razão GSH/GSSG das células HepG2. Entretanto essa alteração não foi encontrada quando o MeHg foi associado com a curcumina.
- A análise de expressão gênica por PCR-array de 84 genes relacionados com vias de dano no DNA encontrou alteração de 26 genes, sendo que 3 genes tiveram aumento na expressão, *DDIT3*, *GADD45A* e *PPP1R15A*, relacionados principalmente com o bloqueio do ciclo celular e o processo de apoptose, e 23 genes tiveram sua expressão reduzida, relacionados com diversas vias de reparo do DNA, checkpoints do ciclo celular e apoptose. A exposição das células ao mercúrio causou o aumento na expressão de genes relacionados com dano ao DNA, parada do ciclo celular e apoptose, conjuntamente com a diminuição na expressão de genes relacionados com o reparo do dano no DNA. A associação com a curcumina levou ao aumento na expressão de genes relacionado com dano no DNA e apoptose, principalmente o *GADD45A* e o *PPP1R15A*, e não demonstrou recuperação significativa na expressão de genes ligados ao reparo do DNA.

Dessa forma, a associação com a curcumina não foi capaz de proteger as células HepG2 da toxicidade do mercúrio, levando ao aumento da citotoxicidade e da genotoxicidade do mercúrio.

6 Referências

AARDEMA, M. J.; MACGREGOR, J. T. Toxicology and genetic toxicology in the new era of toxicogenomics. **Mutation research**, Amsterdam, v. 499, n. 1, p. 13–25, 2002.

AGARWAL, R.; GOEL, S. K.; BEHARI, J. R. Detoxification and antioxidant effects of curcumin in rats experimentally exposed to mercury. **Journal of applied toxicology**, Chichester, v. 30, p. 457–68, 2010.

ANTUNES, L. M.G.; DARIN, J. D.; BIANCHI, M. L.P. Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 465, p. 131–137, 2000.

ANTUNES, L. M.G.; DARIN, J. D.; BIANCHI, M. L.P. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. **Pharmacological research**, London, v. 43, p. 145–150, 2001.

ARAÚJO, M. C. P.; ANTUNES, L. M. G.; TAKAHASHI, C. S. Protective effect of thiourea, a hydroxyl-radical scavenger, on curcumin-induced chromosomal aberrations in an in vitro mammalian cell system. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 21, n. 2, p. 175–180, 2001.

ARNAL, N.; TACCONI DE ALANIZ, M. J.; MARRA, C. A. Natural polyphenols may ameliorate damage induced by copper overload. **Food and chemical toxicology**, Exeter, v. 50, p. 415–22, 2012.

ARZUMAN, L.; BEALE, P.; CHAN, C.; YU, J.Q.; HUQ, F. Synergism from Combinations of tris (benzimidazole) monochloroplatinum (II) Chloride with Capsaicin , Quercetin , Curcumin and Cisplatin in Human Ovarian Cancer Cell Lines. **Anticancer research**, Greece, v. 5464, p. 5453–5464, 2014.

AWASTHI, S.; PANDYA, U.; SINGHAL, SS.; THIVIYANATHAN, V.; SEIFERT, JR.; AWASTHI, YC.; ANSARI, GA. Curcumin-glutathione interactions and the role of human glutathione S-transferase P1-1. **Chemico-biological interactions**, Amsterdam, v. 128, p. 19–38, 2000.

AYENSU, W. K.; TCHOUNWOU, P. B. Microarray analysis of mercury-induced changes in gene expression in human liver carcinoma (HepG2) cells: importance in immune responses. **International journal of environmental research and public health**, v. 3, n. 2, p. 141–73, 2006.

BALSTAD, T. R.; CARLSEN, H.; MYHRSTAD, M.C.; KOLBERG, M.; REIERSEN, H.; GILEN, L.; EBIHARA, K.; PAUR, I.; BLOMHOFF, R. Coffee, broccoli and spices are strong inducers of electrophile response element-dependent transcription in vitro and in vivo - studies in electrophile response element transgenic mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 55, Weinheim, p. 185–97, 2011.

BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K.I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-biological interactions**, Amsterdam, v. 174, p. 134–9, 2008.

BARCELOS, G.; GROTTTO, D.; SERPELONI, J.M.; AISSA, A.F.; ANTUNES, L.M.G.; KNASMÜLLER, S.; BARBOSA, F. J.R.. Bixin and norbixin protect against DNA-Damage and alterations of redox status induced by methylmercury exposure in vivo. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 53, p. 535–541, 2012.

BARCELOS, G.; ANGELI, J.P.; SERPELONI, J.M.; GROTTTO, D.; ROCHA, B.A.; BASTOS, J.K.; KNASMÜLLER, S.; BARBOSA, F. J.R. Quercetin protects human-derived liver cells against mercury-induced DNA-damage and alterations of the redox status. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 726, p. 109–115, 2011a.

BARCELOS, G.; GROTTTO, D.; SERPELONI, J.M.; ANGELI, J.P.; ROCHA, B.A.; OLIVEIRA SOUZA, V.C.; VICENTINI, J.T.; EMANUELLI, T.; BASTOS, J.K.; ANTUNES, L.M.; KNASMÜLLER, S.; BARBOSA, F. J.R. Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. **Archives of toxicology**, Berlin, v. 85, p. 1151–7, 2011b.

BARCELOS, G.R.; SOUZA, M.F.; OLIVEIRA, A.Á.; LENGERT, A.V.; OLIVEIRA, M.T.; CAMARGO, R.B.; GROTTTO, D.; VALENTINI, J.; GARCIA, S.C.; BRAGA, G.Ú.; CÓLUS, I.M.; ADEYEMI, J.; BARBOSA, F. JR. Effects of genetic polymorphisms on antioxidant status and concentrations of the metals in the blood of riverside Amazonian communities co-exposed to Hg and Pb. **Environmental Research**, v. 138, p. 224–232, 2015.

BERNHOF, R. A. Mercury toxicity and treatment: a review of the literature. **Journal of environmental and public health**, New York, v. 2012, p. 460-508, 2012

BERRIDGE, M. V; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, Amsterdam, v. 11, p. 127–152, 2005.

BERRIDGE, M. V; TAN, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in {MTT} Reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 303, p. 474–482, 1993.

BORSARI, M. Curcuminoids as potential new iron-chelating agents: spectroscopic, polarographic and potentiometric study on their Fe(III) complexing ability. *Inorganica Chimica Acta*, Lausanne, v. 328, p. 61–68, jan. 2002.

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. *Oxidative medicine and cellular longevity*, New York, v. 3, n. 4, p. 228–237, 2010.

BRANCO, V; RAMOS, P; CANÁRIO, J; LU, J; HOLMGREN, A; CARVALHO, C. Biomarkers of adverse response to mercury: histopathology versus thioredoxin reductase activity. **Journal of biomedicine & biotechnology**, Akron, v. 2012, p. 359-879, 2012.

BRUSH, M. H.; WEISER, D. C.; SHENOLIKAR, S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. **Molecular and cellular biology**, Washington, v. 23, n. 4, p. 1292–1303, 2003.

BUSTIN, S. A. Developments in real-time PCR research and molecular diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, London, v. 10, p. 713–715, 2010.

CAO, J; JIA, L; ZHOU, HM; LIU, Y; ZHONG, L.F. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G2 cells. **Toxicological sciences**, Orlando, v. 91, n. 2, p. 476–483, 2006.

CAO, J; JIANG, L.P; LIU, Y; YANG, G; YAO, X.F; ZHONG, L.F. Curcumin-induced genotoxicity and antigenotoxicity in HepG2 cells. **Toxicon**, Oxford, v. 49, n. 8, p. 1219–22, 2007.

CHEN, J.; WANG, F.-L.; CHEN, W.-D. Modulation of apoptosis-related cell signalling pathways by curcumin as a strategy to inhibit tumor progression. **Molecular biology reports**, Dordrecht, 2014.

CLARKSON, T. W. The Three Modern Faces of Mercury Methyl Mercury in Fish History of Human Exposure. v. 110, n. February, p. 11–23, 2002.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Critical reviews in toxicology**, v. 36, London, p. 609–62, 2006.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V.L.; DUSINSKÁ, M.; KENNEDY, G.; STĚTINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation research**, Amsterdam, v. 375, p. 183–93, 1997.

COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; MØLLER, P.; ROJAS, E.; DHAWAN, A.; BENZIE, I.; COSKUN, E.; MORETTI, M.; SPEIT, G.; BONASSI, S1. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutation research**, Amsterdam, v. 759, p. 27–39, 2014.

COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1840, p. 794–800, 2014.

COSTANTINI, S.; DI BERNARDO, G.; CAMMAROTA, M.; CASTELLO, G.; COLONNA, G. Gene expression signature of human HepG2 cell line. **Gene**, Amsterdam, v. 518, n. 2, p. 335–345, 2013.

CRESPO-LÓPEZ, M. E. Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacological research**, London, v. 60, p. 212–20, 2009.

CUELLO, S.; GOYA, L.; MADRID, Y.; CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; BRAVO, L.; CÁMARA, C.; RAMOS, S. Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. **Food and chemical toxicology**, Oxford, v. 48, p. 1405–11, 2010.

DANIEL, S.; LIMSON, J.L.; DAIRAM, A.; WATKINS, G.M.; DAYA, S. Through metal binding, curcumin protects against lead- and cadmium-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and against lead-induced tissue damage in rat brain. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 98, p. 266–275, 2004.

DE VRIES, A.; BERG, R.J.; WIJNHOFEN, S.; WESTERMAN, A.; WESTER, P.W.; VAN KREIJL, C.F.; CAPEL, P.J.; DE GRUIJL, F.R.; VAN KRANEN, H.J.; VAN STEEG, H. XPA-deficiency in hairless mice causes a shift in skin tumor types and mutational target genes after exposure to low doses of U.V.B. **Oncogene**, Hampshire, v. 16, p. 2205–2212, 1998.

DO NASCIMENTO, J. L. M.; OLIVEIRA, K.R.; CRESPO-LOPEZ, M.E.; MACCHI, B.M.; MAUÉS, L.A.; SILVEIRA, L.C.; HERCULANO, A.M. Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. **The Indian journal of medical research**, New Delhi ,v. 128, p. 373–82, out. 2008.

DODSON, G. E.; SHI, Y.; TIBBETTS, R. S. DNA replication defects, spontaneous DNA damage, and ATM-dependent checkpoint activation in replication protein A-deficient cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 32, p. 34010–34014, 2004.

DÓREA, J. G.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. T. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): A comparison with methylmercury. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 700–711, 2013.

DUAN, J.; DUAN, J.; ZHANG, Z.; TONG, T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Amsterdam, v. 37, p. 1407–1420, 2005.

DUTCZAK, W. J.; BALLATORI, N. Transport of the glutathione-methylmercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 9746–51, 1994.

EATON, L. D.; GILBERT, S. G. Principles of Toxicology. In: KLASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. United States: McGraw-Hill, 2008. 1309p.

ERSSON, C.; MÖLLER, L. The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments. **Mutagenesis**, Oxford, v. 26, p. 689–695, 2011.

FANG, J.; LU, J.; HOLMGREN, A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 280, p. 25284–90, 1 jul. 2005.

GANDHY, S. U.; KIM, K.; LARSEN, L.; ROSENGREN, R.J.; SAFE, S. Curcumin and synthetic analogs induce reactive oxygen species and decreases specificity protein (Sp) transcription factors by targeting microRNAs. **BMC cancer**, London, v. 12, p. 564, 2012.

GESCHER, A. Editorial. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 57, p. 1509, 2013.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 30, n. 6, p. 503–512, 2002.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 75, p. 787–809, 2008.

GROTTO, D.; VALENTINI, J.; FILLION, M.; PASSOS, C.J.; GARCIA, S.C.; MERGLER, D.; BARBOSA, F. J.R. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **The Science of the total environment**, Amsterdam ,v. 408, p. 806–11, 2010.

GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; AGGARWAL, B. B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. **The AAPS journal**, Arlington, v. 15, p. 195–218, 2013.

GUTZKOW, K. B.; LANGLEITE, T.M.; MEIER, S.; GRAUPNER, A.; COLLINS, A.R.; BRUNBORG, G. High-throughput comet assay using 96 minigels. **Mutagenesis**, Oxford, v. 28, p. 333–40, maio 2013.

GYORI, B. M.; VENKATACHALAM, G.; THIAGARAJAN, P.S.; HSU, D.; CLEMENT, M.V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. **Redox biology**, Amsterdam, v. 2, p. 457–65, 2014.

HARRIES, H. M.; FLETCHER, S.T.; DUGGAN, C.M.; BAKER, V.A. The use of genomics technology to investigate gene expression changes in cultured human liver cells. **Toxicology in vitro**, Oxford , v. 15, p. 399–405, 2001.

HO, W. Y. Development of multicellular tumor spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay. **PloS one**, San Francisco, v. 7, p. e44640, 2012.

HOLLANDER, M.C.; ZHAN, Q.; BAE, I.; FORNACE, A.J. JR. Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 21, p. 13731–13737, 1997.

HONG, Y.S.; KIM, Y.M.; LEE, K.E. Methylmercury exposure and health effects. **Journal of preventive medicine and public health**, Seoul, v. 45, p. 353–63, 2012.

HUSSAIN, S1; ATKINSON, A; THOMPSON, SJ; KHAN, AT. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. **Journal of environmental science and health**, New York, v. 34, p. 645–660, 1999.

HYBERTSON, B.M; GAO, B; BOSE, S.K; MCCORD J.M. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 32, n. 4-6, p. 234–246, 2011.

JACQUEMIN, V.; RIEUNIER, G.; JACOB, S.; BELLANGER, D.; D'ENGHIEN, C.D.; LAUGÉ, A.; STOPPA-LYONNET, D.; STERN, M.H. Underexpression and abnormal localization of ATM products in ataxia telangiectasia patients bearing ATM missense mutations. **European Journal of Human Genetics**, New York, v. 20, n. January 2011, p. 305–312, 2012.

DEHGHAN ESMATABADI, M.J, FARHANGI, B.; SAFARI, Z.; KAZEROONI, H.; SHIRZAD, H.; ZOLGHADR, F.; SADEGHIZADEH, M. Dendrosomal Curcumin Inhibits Metastatic Potential of

Human SW480 Colon Cancer Cells through Down-regulation of Claudin1 , Zeb1 and Hef1-1 Gene Expression. *Asian Pac J Cancer Prev*, Bangkok, v. 16, p. 2473–2481, 2015.

JENNEN, D. G. J.; MAGKOUFOPOULOU, C.; KETELSLEGERS, H.B.; VAN HERWIJNEN, M.H.; KLEINJANS, J.C.; VAN DELFT, J.H. Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. **Toxicological sciences**, Orlando, v. 115, p. 66–79, 2010.

JI, X; WANG, W; CHENG, J; YUAN, T; ZHAO, X; ZHUANG, H; QU, L. Free radicals and antioxidant status in rat liver after dietary exposure of environmental mercury. **Environmental toxicology and pharmacology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 309–14, 2006.

JIAO, Y.; WILKINSON, J. 4TH.; CHRISTINE, P. E.; BUSS, J.L.; WANG, W.; PLANALP, R.; TORTI, F.M.; TORTI, S.V. Iron chelation in the biological activity of curcumin. **Free radical biology & medicine**, New York, v. 40, p. 1152–60, 2006.

JOHNSON, R. D.; LIU, N.; JASIN, M. Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. **Nature**, London, v. 401, n. 1997, p. 397–399, 1999.

KAIVALYA, M.; NAGESHWAR RAO, B. N.; SATISH RAO, B. S. Mangiferin: A xanthone attenuates mercury chloride induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, New York, v. 25, p. 108–116, 2011.

KARAYTUG, S.; SEVGILER, Y.; KARAYAKAR, F. Comparison of the Protective Effects of Antioxidant Compounds in the Liver and Kidney of Cd- and Cr-Exposed Common Carp, *Environmental toxicology*, New York, p. 1–9, 2011.

KAWATA, K.; SHIMAZAKI, R.; OKABE, S. Comparison of gene expression profiles in HepG2 cells exposed to arsenic, cadmium, nickel, and three model carcinogens for investigating the mechanisms of metal carcinogenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 50, p. 46–59, 2009.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 402, p. 185–202, 1998.

KETRON, A.; GORDON, O.; SCHNEIDER, C.; OSHEROFF, N. Oxidative Metabolites of Curcumin Poison Human Type II Topoisomerases. **Biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 221–7, 8 jan. 2013.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, Oxford, p. 95–125, 2006.

LÁZARO, L. M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: Considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. SUPPL. 1, p. 103–127, 2008.

LEUNG, M. H. M.; HARADA, T.; KEE, T. W. Delivery of curcumin and medicinal effects of the copper(II)-curcumin complexes. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 19, p. 2070–83, 2013.

LI, J.; WANG, Q.E.; ZHU, Q.; EL-MAHDY, M.A.; WANI, G.; PRAETORIUS-IBBA, M.; WANI, A.A. DNA damage binding protein component DDB1 participates in nucleotide excision repair through DDB2 DNA-binding and cullin 4a ubiquitin ligase activity. **Cancer Research**, Baltimore, v. 66, n. 17, p. 8590–8597, 2006.

LI, MANGMANG, YUNLONG HE, WENDY DUBOIS, XIAOLIN WU, JIANXIN SHI, J. H. Distinct Regulatory Mechanisms and Functions for p53-Activated and p53-Repressed DNA Damage Response Genes in Embryonic Stem Cells. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 46, n. 1, p. 30–42, 2013.

LIAO, C.Y.; FU, J.J.; SHI, J.B.; ZHOU, Q.F.; YUAN, C.G.; JIANG, G.B. Methylmercury accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. **Environmental toxicology and pharmacology**, Amsterdam, v. 22, p. 225–33, 2006.

LIEBERMANN, D. A; HOFFMAN, B. Gadd45 in stress signaling. **Journal of molecular signaling**, London, v. 3, p. 15, 2008.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature reviews. Genetics**, London, v. 8, n. May 2007, p. 353–367, 2007.

LIU, J.; GOYER, R. A.; WAALKES, M. P. Toxic effects of metals. In: KLASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. United States: McGraw-Hill, 2008. 1309p

LIU, W; LU, X; HE, G; GAO, X; XU, M; ZHANG, J; LI, M; WANG, L; LI, Z; WANG, L; LUO, C. Protective roles of Gadd45 and MDM2 in blueberry anthocyanins mediated DNA repair of fragmented and non-fragmented DNA damage in UV-irradiated HepG2 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, p. 21447–21462, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143–3153, 2013.

MARCINIAK, S.J.; YUN, C.Y.; OYADOMARI, S.; NOVOA, I.; ZHANG, Y.; JUNGREIS, R.; NAGATA, K.; HARDING, H.P.; RON, D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. **Genes and Development**, New York, v. 18, n. 24, p. 3066–3077, 2004.

MEISTER, A; TATE, S. S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 45, p. 559–604, 1976.

MENDONÇA, L. M.; DOS SANTOS, G.C.; ANTONUCCI, G.A.; DOS SANTOS, A.C.; BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L.M.G. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 675, p. 29–34, 2009.

MENDONÇA, L. M.; DOS SANTOS, G.C.; DOS SANTOS, R.A.; TAKAHASHI, C.S.; BIANCHI, M. L. P., ANTUNES, L.M.G. Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay. **Human experimental toxicology**, London, v. 29, p. 635–643, 2010.

MENDONÇA, L. M.; MACHADO C. DA S.; TEIXEIRA, C.C.; DE FREITAS, L.A.; BIANCHI, M. DE L. P., ANTUNES, L.M.G. Curcumin reduces cisplatin-induced neurotoxicity in NGF-differentiated PC12 cells. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 34, p. 205–211, 2 out. 2013.

MOSKALEV, A.A; SMIT-McBRIDE, Z; SHAPOSHNIKOV, M.V; PLYUSNINA, E.N; ZHAVORONKOV, A; BUDOVSKY, A; TACUTU, R; FRAIFELD, V.E. Gadd45 proteins: Relevance to aging, longevity and age-related pathologies. **Ageing Research Reviews**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 51–66, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55–63, 1983.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell death and differentiation**, London, v. 10, n. 4, p. 431–442, 2003.

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

PHAN, T. T.; SEE, P.; LEE, S.T.; CHAN, S.Y. Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. **The Journal of trauma**, Baltimore, v. 51, p. 927–31, 2001.

PRIYADARSINI, K. I. Chemical and structural features influencing the biological activity of curcumin. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 19, p. 2093–100, 2013.

RAEYMAEKERS, L. Basic principles of quantitative PCR. **Molecular biotechnology**, v. 15, p. 115–122, 2000.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 6, p. 3159–3165, 2006.

RANA, C.; PIPLANI, H.; VAISH, V.; NEHRU, B.; SANYAL, S.N. Downregulation of telomerase activity by diclofenac and curcumin is associated with cell cycle arrest and induction of apoptosis in colon cancer. **Tumor Biology**, Tokyo, 2015.

ROWE, D.L; OZBAY, T; O'REGAN, R.M; NAHTA, R. Modulation of the BRCA1 protein and induction of apoptosis in triple negative breast cancer cell lines by the polyphenolic compound curcumin. **Breast Cancer**, Auckland, v. 3, p. 61–75, 2009.

SAHA, A.; KUZUHARA, T.; ECHIGO, N.; FUJII, A.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H. Apoptosis of human lung cancer cells by curcumin mediated through up-regulation of “growth arrest and DNA damage inducible genes 45 and 153”. **Biological & pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v. 33, n. 8, p. 1291–1299, 2010.

SAIKI, R.K; GELFAND, D.H; STOFFEL, S; SCHARF, S.J; HIGUCHI, R; HORN, G.T; MULLIS, K.B; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, New York, v. 239, n. 4839, p. 487–491, 1988.

SHEHZAD, A.; LEE, J.; LEE, Y. S. Curcumin in various cancers. **BioFactors**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 56–68, 2013.

SHEHZAD, A.; LEE, Y. S. Molecular mechanisms of curcumin action: Signal transduction. **BioFactors**, Oxford, v. 39, p. 27–36, 2013.

SHETTIGAR, N. B.; DAS, S.; RAO, N.B.; RAO, S.B. Thymol, a monoterpene phenolic derivative of cymene, abrogates mercury-induced oxidative stress resultant cytotoxicity and genotoxicity in hepatocarcinoma cells. **Environmental Toxicology**, New York, 2014.

SINGH, N. P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 175, p. 184–191, 1988.

STODDART, M. **Mammalian Cell Viability**. 1.ed. Humana Press, 2011. p. 740

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology & Medicine**, Tarrytown, v. 18, p. 321–336, 1995.

SUN, J.; ZHAO, Y.; JIN, H.; HU, J. Curcumin relieves TPA-induced Th1 inflammation in K14-VEGF transgenic mice. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 25, p. 235–241, 2015.

SURGET, S.; KHOURY, M. P.; BOURDON, J. C. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: A clinical perspective. **OncoTargets and Therapy**, v. 7, p. 57–67, 2013.

THULASIRAMAN, P.; MCANDREWS, D. J.; MOHIUDDIN, I. Q. Curcumin restores sensitivity to retinoic acid in triple negative breast cancer cells. **BMC cancer**, London, p. 1–14, 2014.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell

gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, p. 206–221, 2000.

TOKAÇ, M.; TANER, G.; AYDIN, S.; OZKARDEŞ, A.B.; DÜNDAR, H.Z.; TAŞLIPINAR, M.Y.; ARIKÖK, A.T.; KILIÇ, M.; BAŞARAN, A.A.; BASARAN, N. Protective effects of curcumin against oxidative stress parameters and DNA damage in the livers and kidneys of rats with biliary obstruction. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, Oxford, 2013.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, New York, v. 57, p. 145–155, 2003.

TSUBOY, M. S.; ANGELI, J.P.; MANTOVANI, M.S.; KNASMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBEIRO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in vitro an international journal published in association with BIBRA**, v. 21, Oxford, p. 1650–1655, 2007.

TYAKHT, A.V.; ILINA, E.N.; ALEXEEV, D.G.; ISCHENKO, D.S.; GORBACHEV, A.Y.; SEMASHKO, T.A.; LARIN, A.K.; SELEZNEVA, O.V.; KOSTRYUKOVA, E.S.; KARALKIN, P.A.; VAKHRUSHEV, I.V.; KURBATOV, L.K.; ARCHAKOV, A.I.; GOVORUN, V.M. RNA-Seq gene expression profiling of HepG2 cells: the influence of experimental factors and comparison with liver tissue. **BMC genomics**, London, v. 15, p. 1108, 2014.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 441, p. 215–224, 1999.

UNG, C. Y.; LAM, S.H.; HLAING, M.M.; WINATA, C.L.; KORZH, S.; MATHAVAN, S.; GONG, Z. Mercury-induced hepatotoxicity in zebrafish: in vivo mechanistic insights from transcriptome analysis, phenotype anchoring and targeted gene expression validation. **BMC genomics**, London, v. 11, p. 212, 2010.

UTTARA, B; SINGH, A.V; ZAMBONI, P; MAHAJAN, R.T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current neuropharmacology**, San Francisco, v. 7, p. 65–74, 2009

IERSEL, M.L.; PLOEMEN, J.P.; STRUIK, I.; VAN AMERSFOORT, C.; KEYZER, A.E.; SCHEFFERLIE, J.G.; VAN BLADEREN, P.J. Inhibition of glutathione S-transferase activity in human melanoma cells by α,β -unsaturated carbonyl derivatives. Effects of acrolein, cinnamaldehyde, citral, crotonaldehyde, curcumin, ethacrynic acid, and trans-2-hexenal. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 102, p. 117–132, 1996.

VAN SUMMEREN, A.; RENES, J.; BOUWMAN, F.G.; NOBEN, J.P.; VAN DELFT, J.H.; KLEINJANS, J.C.; MARIMAN, E.C. Proteomics investigations of drug-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. **Toxicological sciences**, Orlando, v. 120, p. 109–22, 2011.

VIRGILI, F.; MARINO, M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. **Free radical biology & medicine**, Tarrytown, v. 45, p. 1205–16, 2008.

WALKER, N. J. Real-time and quantitative PCR: Applications to mechanism-based toxicology. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, New York, v. 15, p. 121–127, 2001.

WASEEM, M.; PARVEZ, S. Mitochondrial dysfunction mediated cisplatin induced toxicity: Modulatory role of curcumin. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, Oxford, v. 53, p. 334–42, 2013.

WU, G.; FANG, Y.Z.; YANG, S.; LUPTON, J.R.; TURNER, N.D. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of nutrition**, v. 134, Rockville, p. 489–492, 2004.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. L. Methylating Agents and DNA Repair Responses: Methylated Bases and Sources of Strand Breaks. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 19, p. 1580–1594, 2006.

ZHANG, W; LI, T; SHAO, Y; ZHANG, C; WU, Q; YANG, H; ZHANG, J; GUAN, M; YU, B; WAN, J. Semi-quantitative detection of GADD45-gamma methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers using methylation-sensitive high-resolution melting analysis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v. 136, p. 1267–1273, 2010.

ZITKA, O.; SKALICKOVA, S.; GUMULEC, J.; MASARIK, M.; ADAM, V.; HUBALEK, J.; TRNKOVA, L.; KRUSEOVA, J.; ECKSCHLAGER, T.; KIZEK, R. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. **Oncology Letters**, Athens, v. 4, p. 1247–1253, 2012.

ZHOU H.; BEEVERS, C.; HUANG, S. Targets of curcumin. **Curr Drug Targets**, v. 12, n. 3, p. 332–347, 2012.