UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas
de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7**

Juliana Xavier de Miranda

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE.

Orientador:
Prof. Dr. Thomas Prates Ong.

São Paulo
2012

Juliana Xavier de Miranda

**Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas
de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7**

Comissão Julgadora da Dissertação
para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Thomas Prates Ong
Orientador/Presidente

1o. examinador

2o. examinador

São Paulo, 17 de Setembro de 2012.

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.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação de Nutrição Experimental
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Miranda, Juliana Xavier de.

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7. Juliana Xavier de Miranda; orientador Thomas Prates Ong. - São Paulo, 2012. 118 f.

1. Câncer de Mama. 2 Células MCF-7. 3. Selênio. 4. Marcas Epigenéticas. Ciência dos alimentos. I. Ong, Thomas Prates. II. Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: MIRANDA, Juliana Xavier de

Título: Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP para
obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus,

Aos meus pais José e Julia,

À minha irmã Fabiana,

Ao meu companheiro, noivo e futuro esposo Nuno,

firmando-me com orgulho e alegria no caminho que escolhi.

AGRADECIMENTOS

À Deus por continuar me iluminando e me proporcionando sabedoria diante dos inúmeros obstáculos que enfrentei nesta jornada.

Aos meus pais, pelo amor incondicional me impulsiona para os caminhos que desejo, e sustenta-me nas dificuldades. O meu eterno obrigada!

Ao Nuno, sinônimo de amor, respeito, verdade e cumplicidade. Pessoa que me encorajou nos inúmeros momentos de dificuldades e frustrações. Muitos foram os finais de semanas perdidos e os momentos não vividos ao teu lado. Meu amigo-noivo-amor-companheiro, eu não teria conseguido chegar ao fim sem a tua paciência e amor pleno! Amar-te-ei por toda uma vida!

À Fabiana, minha irmã caçula querida. Você foi mais que essencial em tudo! Sempre presente do início ao fim, nos momentos de alegrias, angústias e nos momentos que mais precisei.

Aos meus avós Adelina e João, que são os meus maiores exemplos de dignidade, amor e simplicidade humana.

À minha ex-orientadora de iniciação científica professora Emília Moreira o meu carinhoso obrigada. Suas palavras “Não pensa Ju! Corra atrás do que quer”! ainda soam continuamente em minhas (in)decisões.

À Marivone Rosa, amiga e educadora: nunca me esquecerei das palavras de incentivo, dos livros emprestados e do carinho incondicional.

À Johana, Akemi, Daniela, Débora, Elisa, Clarisse e amigo Takeo grandes amigas de graduação, pelo exemplo de profissionalismo e de amizade: estarão sempre presentes no meu coração.

A todos do laboratório Dieta, Nutrição e Câncer pela convivência, pela troca de saber e aprendizado, pelos momentos que me acrescentaram conhecimento e uma experiência profissional única.

À Fábria e à Aline de Conti: não tenho palavras para descrever tudo que vocês representaram nessa caminhada. Vocês foram mais que parceiras de trabalho. Foram amigas para todas as dúvidas, angústias e alegrias. Fábria, que me ensinou cultura celular e inúmeras técnicas, me acolheu com todo carinho, disposição, parceira, dedicação, amizade e profissionalismo. Aline, sua alegria, simplicidade e profissionalismo proporcionou-me o que se tem de mais precioso nesta vida: respeito e amizade. Ensinou-me técnicas de biologia molecular, e me mostrou que era preciso ter coragem para fazer de novo. Mostrou-me que eu precisava de um pulso firme e que eu podia chegar onde queria. Abraçou-me diariamente com um sorriso no rosto, com uma sinceridade ao brilho dos olhos, paciência e potencial de educadora-amiga! Deus me presenteou com a amizade de vocês duas, e as levarei sempre comigo! Eu não teria conseguido chegar ao fim sem vocês!

Ao Renato, que não foi “meu” técnico na teoria, mas foi na prática. Parceiro nos cafézinhos, nas piadas e em toda tarefa prática no laboratório. Obrigada por toda ajuda, incentivo e carinho.

Às queridas Mônica e Alessandra, pelos poucos momentos vividos e abraços verdadeiros.

À Professora Maria Lúcia Dagli Zaidan, e a todos do laboratório de Patologia Experimental (FMVZ/USP), principalmente aos seus alunos Márcia e Daniel por todo aprendizado proporcionado; por terem me acolhido e permitido que eu conduzisse grande parte dos meus experimentos de cultivo celular junto aos seus.

À professora Silvia Cozzolino, meu exemplo profissional, e a todos do laboratório de Nutrição e Minerais (FCF/USP), onde estudar selênio foi mais que formação acadêmica e profissional: foi encontrar amigos que levarei para uma vida; foi reconhecer a Nutrição sendo investigada por grandes profissionais.

À professora Ana Paula e ao seu aluno Thiago, pela parceria nas análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

À Renata pela colaboração nas análises de citometria de fluxo.

Ao Professor Eduardo Purgatto, por ter me acrescentado tanto saber e pelo carinho e atenção disponibilizado.

Ao professor Júlio Tirapegui e a todos do seu laboratório, principalmente você Ivanir, pela disponibilidade do laboratório, paciência e ensinamentos.

A todos os profissionais do Departamento de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, principalmente ao Jorge, Edilson, Mônica, Cléo, Lurdinha e meninas da limpeza, por todo auxílio e apoio diário. Lurdinha, você é espetacular. Obrigada por todo carinho!

À Suzana querida, que mesmo com distância permanece como grande amiga! Obrigada por tudo, japita!!

À Janaína, Graziela e Bárbara, minhas e parceiras de laboratório adotivas que vibraram carinhosamente durante esses anos acelerados de encontros em reuniões, esbarrões nos corredores, viagens, congressos. Vocês são especiais!

À Ariana, uma amizade sincera e um presente divino. Foi um prazer te conhecer! Sei que poderei sempre contar contigo como amiga-irmã, onde quer que seja.

À Rita, pela parceria em todos os momentos de angústias, discussões científicas, aulas conjuntas, e na loucura de tudo que vivemos juntas! Foi um prazer e tenho muito orgulho de ti!

Ao professor Fernando Salvador Moreno, que desde a entrevista de inserção no mestrado vem reforçando o meu interesse sobre o que sustenta a “Fome das Batatas”. Questionamentos e aprendizados em reuniões científicas, resultados esperados e

encontrados, e um acolhimento carinhoso no laboratório Dieta, Nutrição e Câncer. Tenho o meu respeitoso e singelo agradecimento pela sua receptividade e dedicação à pesquisa. Foi um grande prazer fazer parte do seu grupo.

Ao professor e orientador Thomas Prates Ong, pois tudo isso não teria sido possível sem o teu consentimento. Obrigada pelo conhecimento ensinado, pelas correções construtivas, pela paciência e compreensão; por ter me acolhido como sua aluna e ter acreditado no meu potencial. O caminho não foi fácil, mas hoje posso dizer que valeu muito a pena. E serei sempre muito grata. Tenho certeza que ainda vamos nos encontrar, e será sempre um grande prazer.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido, sem o qual não seria possível a realização deste estudo.

"...na profissão, além de amar tem de saber. E o saber leva tempo para crescer."

Rubem Alves

RESUMO

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

O câncer de mama representa problema mundial de saúde pública e a causa mais frequente de morte por câncer entre as mulheres. A identificação de agentes moduladores de marcas epigenéticas, tais como metilação global do DNA e modificações pós-tradução em histonas, compreende alternativa promissora para estabelecimento de estratégias de controle da carcinogênese mamária. Dentre os nutrientes, o elemento traço essencial selênio (Se) pode ser destacado como agente dietético com potencial anti-câncer de mama e que poderia atuar modulando processos epigenéticos. Entretanto seus mecanismos de ação são pouco elucidados. Este estudo objetivou, assim, identificar efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7. Células MCF-7, positivas para o receptor de estrógeno, foram tratadas com ácido metilselenínico (MSA) ou selenito de sódio (ST) por diferentes tempos e em diferentes concentrações. Foram avaliados: padrão de proliferação (ensaio cristal violeta) e viabilidade celular (método de exclusão azul de tripan); integridade de membrana plasmática (citometria de fluxo); níveis de fragmentação do DNA (citometria de fluxo), distribuição das fases do ciclo celular (citometria de fluxo); apoptose (citometria de fluxo/ marcação dupla com Anexina V – Iodeto de propídio); níveis de lisina 9 acetilada (H3K9ac) e trimetilada (H3K9me3) em histona H3; níveis de lisina 16 acetilada (H4K16ac) em histona H4 (Western blot); padrão de metilação global do DNA (HPLC-DAD); expressão de gene supressor de tumor (RASSF1a; qPCR) e padrão de metilação da região promotora (RASSF1a e RAR β ; MS-PCR); expressão da enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1) (Western Blotting). Comparado ao grupo controle de células não tratadas (GC), ambos os tratamentos com MSA ou ST inibiram a proliferação e viabilidade de células MCF-7 de forma dose e tempo dependente. Ambas as formas químicas de Se induziram a parada do ciclo celular, aumentando ($p < 0,05$) a proporção de células na fase G2/M e reduzindo ($p < 0,05$) a proporção daquelas nas fases G0/G1 e S. Os tratamentos com MSA favoreceram a morte celular por apoptose, que foi associada com nível de fragmentação de DNA aumentado ($p < 0,05$), e reduzida ruptura da membrana plasmática associada com a exposição aumentada ($p < 0,05$) de fostadilserina. Por outro lado, o ST aumentou ($p < 0,05$) a fragmentação do DNA e ($p < 0,05$) a positividade ao iodeto de propídio associado à indução de necrose ($p < 0,05$). Dentre os mecanismos epigenéticos investigados, 1,6 μ M e 2 μ M reduziram a acetilação de H3K9ac (72h; $p < 0,05$) e aumentaram a de H4K16ac (96h; $p < 0,05$). O tratamento por 96h com 2 μ M de MSA reduziu ($p < 0,05$) a metilação de H3K9me3. Ambos MSA e ST não alteraram o padrão de metilação global do DNA, mas reduziram a expressão de DNMT1, após 96h com 2 μ M de MSA ($p < 0,001$; 88%) e após 120h com 10 μ M de ST ($p < 0,001$; 96%). ST, mas não o MSA, aumentou ($p < 0,05$; 45%) a expressão do gene RASSF1a. Em ambos os grupos tratados com MSA ou ST, bem como no GC, a região promotora dos genes *RASSF1a* e *RAR β* estavam predominantemente metiladas. Estes resultados fornecem evidências de que as ações anti-câncer de mama de compostos do selênio dependem de sua forma química. Além disso, a modulação de processos epigenéticos parecem ser relevantes para as ações inibitórias do MSA em células de câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de Mama. Células MCF-7. Selênio. Marcas epigenéticas.

ABSTRACT

MIRANDA, JX. **Effects of selenium treatment on growth and epigenetic marks of MCF-7 human breast adenocarcinoma cells.** 2012. 118f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Breast cancer is a global public health problem and the most frequent cause of cancer death among women. The identification of agents able to modulate epigenetic marks, such as global DNA methylation and histone post-translational modifications, comprises promising alternative for establishing control strategies on mammary carcinogenesis. Among the nutrients, the essential trace element selenium (Se) can be highlighted as a dietary agent with potential anti-breast cancer and could act by modulating epigenetic processes. However its mechanisms of action are poorly understood. This study aimed, therefore, to identify the effects of selenium treatment on growth and epigenetic marks of MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. MCF-7 cells, positive for estrogen receptor, were treated with methylseleninic acid (MSA) or sodium selenite (ST) for different times and in different concentrations. Evaluated parameters included: cell proliferation (crystal violet assay) and cell viability (trypan blue exclusion assay); plasma membrane integrity (flow cytometry); levels of DNA fragmentation (flow cytometry), apoptosis (flow cytometry - double labeling with Annexin V - propidium iodide); distribution of cell cycle phases (flow cytometry); acetylated (H3K9ac) and trimethylated (H3K9me3) lysine 9 levels on histone H3; acetylated (H4K16ac) lysine 16 level on histone H4 (Western blot); global DNA methylation (HPLC-DAD); tumor suppressor gene expression (*RASSF1a*; qPCR) and promoter methylation (*RASSF1a*, *RARβ*; MS-PCR); DNA methyltransferase 1 (DNMT1) expression (Western blot). Compared to untreated cells (controls), both MSA and ST inhibited ($p < 0.05$) MCF-7 cell proliferation and viability in a dose- and time-dependent manner. Treatments with MSA favored cell death by apoptosis, that was associated with increased ($p < 0.05$) DNA fragmentation level, reduced plasma membrane rupture associated with high ($p < 0.05$) phosphatidylserine exposure. On the other hand, ST increased ($p < 0.05$) DNA fragmentation, enhanced ($p < 0.05$) propidium iodide positivity associated to necrosis induction ($p < 0.05$). Both chemical forms of Se induced cell cycle arrest, increasing ($p < 0.05$) the proportion of cells in G2/M phase and reducing ($p < 0.05$) the proportion of those in G0/G1 and S phases. Among the epigenetic mechanisms investigated, 1.6μM and 2μM of MSA reduced acetylation of H3K9ac (72h, $p < 0.05$) and increased the H4K16ac (96h, $p < 0.05$). The treatment for 96h with 2μM of MSA reduced ($p < 0.05$) the H3K9me3 methylation. Neither MSA nor ST altered ($p > 0.05$) global DNA methylation, while both compounds reduced ($p < 0.05$) DNMT1 protein expression, after 96h with 2μM of MSA ($p < 0.001$; 88%) and after 120h with 10μM of ST ($p < 0.001$; 94%). ST, but not MSA, increased ($p < 0.05$; 45%) *RASSF1a* gene expression. In control and Se-treated cells promoter regions of *RASSF1a* and *RARβ* were predominantly methylated. These results provide evidence that the anti-breast cancer actions of selenium compounds depend on its chemical form. Additionally, modulation of epigenetic processes seems to represent a relevant feature of MSA inhibitory effects in breast cancer cells.

Keywords: Breast cancer. MCF-7 cells. Selenium. Epigenetic Marks.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Progressão da carcinogênese mamária regulada por mecanismos genéticos e/ou epigenéticos.

Figura 2. Esquema ilustrativo da via metabólica e pool de metilação de formas de selênio importantes biologicamente.

Figura 3. Esquema ilustrativo da marcação de células com Iodeto de propídeo (IP) e Anexina V.

Figura 4. Proporção de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular.

Figura 5. Curva de proliferação celular da linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Figura 6. Curva de proliferação de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, determinada pelo método cristal violeta.

Figura 7. Viabilidade celular da linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratada com ácido metilselenínico, determinada pelo método de exclusão Azul de tripan.

Figura 8. Curva de proliferação de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio, determinada pelo método cristal violeta.

Figura 9. Viabilidade celular da linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratada com selenito de sódio, determinada pelo método de exclusão Azul de tripan.

Figura 10. Análise da integridade de membrana plasmática de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, determinada por citometria de fluxo.

Figura 11. Análise da integridade de membrana plasmática de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio, determinada por citometria de fluxo.

Figura 12. Análise dos níveis de fragmentação de DNA de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, determinada por citometria de fluxo.

Figura 13. Análise dos níveis de fragmentação de DNA de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio, determinada por citometria de fluxo.

Figura 14. Análise do tipo de morte celular induzida em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, determinada em citometria de fluxo por dupla marcação de fosfatidilserina-DNA com anexina V- iodeto de propídio.

Figura 15. Análise do tipo de morte celular induzida em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio, determinada em citometria de fluxo por dupla marcação de fosfatidilserina-DNA com anexina V-iodeto de propídio.

Figura 16. Distribuição das fases do ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, determinada em citometria de fluxo.

Figura 17. Distribuição das fases do ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio, determinada em citometria de fluxo.

Figura 18. Análise dos níveis percentuais de metilação global do DNA em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico.

Figura 19. Análise dos níveis percentuais de metilação global do DNA em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio.

Figura 20. Análise quantitativa do padrão de expressão do gene *RASSF1a* em células de adenocarcinoma humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, pelo método quantitativo qPCR.

Figura 21. Análise quantitativa do padrão de expressão do gene *RASSF1a* em células de adenocarcinoma humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio, pelo método quantitativo qPCR.

Figura 22. Análise do padrão de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *RASSF1a* em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, determinada por MS-PCR.

Figura 23. Análise do padrão de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *RARβ* em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, determinada por MS-PCR.

Figura 24. Análise do padrão de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *RASSF1a* em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio determinada por MS-PCR.

Figura 25. Análise do padrão de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *RARβ* em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio determinada por MS-PCR.

Figura 26. Análise do padrão de acetilação (H3K9ac) e trimetilação (H3K9me3) de resíduos de lisina 9 em histona H3 e de acetilação de resíduos de lisina 16 em histona H4 (H4K16ac) em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, determinado por Western Blotting.

Figura 27. Análise do padrão de expressão protéica da enzima DNA metiltransferase 1 (*DNMT1*) em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio, determinado por Western Blotting.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sonda utilizada na PCR em Tempo Real.

Tabela 2: Valores médios percentuais da inibição de proliferação de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com, comparados ao grupo de células não tratadas, no período de 24h a 144h, com diferentes concentrações de ácido metilselenínico (MSA).

Tabela 3: Valores médios percentuais de inibição da proliferação de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas, no período de 24h a 144h, com diferentes concentrações de selenito de sódio.

Tabela 4. Progressão de eventos percentuais dos tipos de morte celular induzida em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 72h ou 96h de tratamento com 8-10 μ M de selenito de sódio, determinada por citometria de fluxo

Tabela 5. Progressão de eventos percentuais dos tipos de morte celular induzida em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 96h ou 120h de tratamento com 8-10 μ M de selenito de sódio, determinada por citometria de fluxo

Tabela 6. Progressão de eventos percentuais de fases do ciclo celular em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 72h ou 96h de tratamento com 1,6-2 μ M de ácido metilselenínico, determinada por citometria de fluxo.

Tabela 7. Progressão de eventos percentuais de fases do ciclo celular em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 96h ou 120h de tratamento com 8-10 μ M de selenito de sódio, determinada por citometria de fluxo.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Histogramas da avaliação da integridade de membrana plasmática de células MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico.

ANEXO 2. Histogramas da Avaliação da integridade de membrana plasmática de células MCF-7 tratadas com selenito de sódio.

ANEXO 3. Histogramas da avaliação das fases ciclo celular e fragmentação do DNA após tratamento de células MCF-7 com ácido metilselenínico.

ANEXO 4. Histogramas da avaliação das fases ciclo celular e fragmentação do DNA após tratamento de células MCF-7 com selenito de sódio.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-mdC / 5-metil-dC	5-metil-2'-desoxicitidina
ATCC	American Type Cell Collection
ADH	Atypical ductal hyperplasia
ALH	Atypical lobular hyperplasia
CBAs	Compostos bioativos de alimentos
CH ₃ -Se-CH ₃	Dimetilselenido
[(CH ₃) ₃ Se ⁺]	Trimetilselenônio
CH ₃ SeO ₂ H	Ácido metilselenínico
CpG	Citosina-fosfodiéster-guanina
DCIS	Ductal carcinoma in situ
DCNTs	Doenças crônicas não-transmissíveis
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNMT1	DNA metiltransferase 1
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GSH	Tripeptídeo glutationa
HRP	Horseradish peroxidase
MS-PCR	Methylation-specific Polymerase chain reaction
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
Na ₂ SeO ₃	Selenito de Sódio
H ₂ Se	Seleneto de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HDACs	Histone deacetylases
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMT	Histone methylase

HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection
IBC	Invasive breast cancer
IOM	Institute of Medicine
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Hidrogenofosfato de potássio
LCIS	Lobular carcinoma <i>in situ</i>
MET	Breast cancer metastasis
MeSeOH	Metilselenol
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MSA	Ácido Metilselenínico
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de sódio
NPC	Nutritional Prevention of Cancer
PDE1	Fosfodiesterase 1
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
qPCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
TDLU	Terminal ductal lobular units
IP	Iodeto de propídio
<i>RARβ</i>	Receptor de ácido retinóico β
RDA	Recommended Dietary Allowance
<i>RASSF1a</i>	RAS-association domain 1 isoform A
SAH	S-adenosylhomocysteine
SAM	S-adenosylmethionine
SELECT	Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial
SeO ₄ ⁻²	Selenato
SeO ₃ ⁻²	Selenito
TDLU	Terminal ductal lobular units
UL	Tolerable Upper Intake Level
WHO	World Health Organization
ΔCt	Delta Ct
ΔΔCt	Delta Delta Ct

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Nutrição, Epigenética e Câncer.....	25
2.2 Câncer de mama.....	27
2.2.1 Aspectos gerais.....	27
2.2.2 Nutrição, Epigenética e câncer de mama.....	30
2.3 Selênio.....	35
2.3.1 Aspectos nutricionais e câncer.....	35
2.3.2 Metabolismo do selênio.....	37
2.3.3 Selênio e câncer de mama.....	40
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	43
4. OBJETIVOS.....	44
4.1 Objetivo geral.....	44
4.2 Objetivos específicos.....	44
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5.1 Cultura celular.....	45
5.2 Proliferação de células de adenocarcinoma mamário MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.....	45
5.3 Viabilidade de células de adenocarcinoma mamário MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.....	46
5.4 Análise da integridade de membrana plasmática, fragmentação do DNA, ciclo celular e apoptose em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.....	47
5.5 Análise do padrão de metilação global do DNA de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.....	51
5.6 Análise da expressão dos genes que codificam para <i>RASSF1A</i> em células MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.....	53

5.7	Análise do padrão de metilação dos promotores dos genes que codificam para <i>RASSF1A</i> e <i>RARβ</i> de células MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico.....	56
5.8	Avaliação do padrão de acetilação de histona H3 no resíduo de lisina K9 (H3K9) e resíduo de lisina K16 em histona H4 (H4K16) e da expressão protéica de <i>DNMT1</i> de células MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico.....	58
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
7.	RESULTADOS.....	62
7.1	Padrão de proliferação de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.....	62
7.2	Curva de proliferação e viabilidade de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico	63
7.3	Curva de proliferação e viabilidade de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio.....	66
7.4	Análise da integridade de membrana plasmática e níveis de fragmentação de DNA de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.....	69
7.5	Caracterização do tipo de morte celular por análise em citometria de fluxo com marcação dupla de anexina e IP.....	73
7.6	Efeitos dos compostos de selênio sobre a distribuição das fases do ciclo celular de células MCF-7.....	77
7.7	Selênio e mecanismos epigenéticos.....	81
7.7.1	Avaliação do padrão de metilação global do DNA de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.....	81
7.7.2	Expressão quantitativa do gene supressor de tumor <i>RASSF1A</i> de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.....	83

7.7.3	Padrão de metilação das regiões promotoras dos genes para <i>RASSF1A</i> e <i>RARβ</i> após tratamento de células MCF-7 com ácido metilselenínico.	84
7.7.4	Padrão de metilação de histona H3K9; acetilação de histonas H3K9 e H4K16 de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico	87
7.7.5	Padrão de expressão de enzimas DNA metiltransferases 1 (<i>DNMT1</i>) de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio	89
8.	DISCUSSÃO	91
9.	CONCLUSÕES	100
10.	REFERÊNCIAS	101
11.	ANEXOS	115
	ANEXO 1. Histogramas da avaliação da integridade de membrana plasmática de células MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico	115
	ANEXO 2. Histogramas da Avaliação da integridade de membrana plasmática de células MCF-7 tratadas com selenito de sódio	116
	ANEXO 3. Histogramas da avaliação das fases ciclo celular e fragmentação do DNA após tratamento de células MCF-7 com ácido metilselenínico	117
	ANEXO 4. Histogramas da avaliação das fases ciclo celular e fragmentação do DNA após tratamento de células MCF-7 com selenito de sódio	118

1. INTRODUÇÃO

Dieta e Nutrição representam fatores ambientais de destaque na modificação do estado de saúde e/ou risco de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), incluindo-se as neoplasias (ROCK; LAMPE; PATTERSON, 2000; BOWEN; BERESFORD, 2002; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2004; THUN *et al.*, 2010). Em 2030 estima-se que o número de pessoas diagnosticadas com câncer dobre e atinja 20 milhões de novos casos (WHO, 2012).

Nutrientes e constituintes bioativos de alimentos (CBAs) podem interferir em processos celulares como proliferação, diferenciação e morte celular, frequentemente alterados na carcinogênese. Em nível molecular, esses constituintes químicos dos alimentos são capazes de modular a expressão de genes, como àqueles que codificam para oncogenes e genes supressores de tumor, envolvidos com o controle do ciclo celular (WATSON; CAI, 2000; MILNER, 2004).

Importantemente, fatores dietéticos e nutrientes específicos são capazes ainda de modular marcas epigenéticas e alterar a susceptibilidade ao câncer (HO; DASHWOOD, 2010). Entranto, apesar de nutrientes e CBAs serem capazes de modular a expressão gênica por meio de processos epigenéticos, pouco se conhece a respeito da influência da nutrição no padrão de metilação gênica bem como na acetilação e metilação de histonas em neoplasias (JOHANNING *et al.*, 2002; GARFINKEL; RUDEN, 2004; MUTCH; WAHLI; WILLIAMSON, 2005; FANG *et al.*, 2005; FEIL, 2006; FIALHO E *et al.*, 2008; KONDO, 2009).

O câncer de mama, considerado um importante problema de Saúde Pública representa o tipo mais comum morte por câncer dentre as mulheres em nível mundial (MENSE *et al.*, 2008; HOWLADER *et al.*, 2012; BYER, 2010). De caráter multifatorial, os fatores de risco envolvidos incluem tanto mutações em genes supressores de tumor BRCA1 e BRCA2, exposição à terapia hormonal, menarca precoce, nuliparidade e estilo de vida; bem como hábitos alimentares com consumo reduzido de frutas e hortaliças, e aumentado em ácidos graxos saturados [(World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (WCRF/AIRC, 2007; MICHAELS *et al.*, 2007).

O silenciamento transcricional por hipermetilação do promotor dos genes para o receptor de ácido retinóico β (*RAR β*) e *RASSF1a* (*RAS-association domain 1 isoform A*), envolvidos em vias de sinalização de controle do ciclo celular, representa alteração epigenética freqüente no câncer de mama (YANG *et al.*, 2001; YEO *et al.*, 2005; DONNINGER *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos, experimentais e celulares ressaltam o papel importante do selênio no contexto da redução do risco de câncer de mama (LOPEZ-SAEZ; SENRA-VARELA; POUSA-ESTEVEZ, 2003; LEE *et al.*, 2005; WARRI *et al.*, 2008; SUZUKI *et al.*, 2010). A metabolização do selênio dietético gera metabólitos intermediários, como os monometilados, que têm sido apontados como os mais efetivos biologicamente no contexto do câncer (IP *et al.*, 2000). Sugere-se que o metilselenol seja o metabólito crítico para as ações anticarcinogênicas do selênio (IP *et al.*, 1991; GANTHER, 1999; IP *et al.*, 2000; RIKIISHI, 2007). Entretanto, por ser altamente reativo, não pode ser testado experimentalmente nesta forma química (IP; DONG, GANTHER, 2002).

O ácido metilselenínico compreende um composto de selênio orgânico monometilado e precursor direto do metilselenol (MeSeOH) (IP *et al.*, 2000; RIKIISHI, 2007). A vantagem de sua investigação em modelos *in vitro* é que atua rapidamente em linhagens celulares, por não requerer enzimas para sua conversão em MeSeOH (SHAH *et al.*, 2005). Nesse contexto, aventa-se que compostos de selênio monometilados e precursores diretos do metilselenol sejam mais eficazes na inibição da gênese tumoral comparados aos compostos de selênio orgânico (selenometionina) e inorgânico (selenito) (LI *et al.*, 2008).

Apesar de se apontar a inibição do crescimento celular como aspecto crítico das ações anticarcinogênicas do selênio, os mecanismos exatos envolvidos não são claros, justificando-se a importância de se identificar quais alvos moleculares são modulados pelo micronutriente durante suas ações inibitórias (SUZUKI *et al.*, 2010). Nesse contexto, aventa-se a hipótese de que a modulação de processos epigenéticos represente mecanismo relevante das ações inibitórias do selênio no câncer de mama.

A proposta deste estudo, então, é identificar alvos epigenéticos do selênio em células de adenocarcinoma mamário humano das linhagens MCF-7, que apresentam expressão do gene para o receptor de estrógeno, mas não de *RARβ* e *RASSF1A*, cujos promotores se encontram hipermetilados (YANG *et al.*, 2001; LIN; NELSON, 2003; YEO *et al.*, 2005; DONNINGER *et al.*, 2007).

Em células MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio, foram avaliadas padrão de proliferação e viabilidade celular, efeito citotóxico, distribuição das fases de ciclo celular, apoptose pelos níveis de fragmentação do DNA e exposição de fosfatidilserina, padrão de metilação global do DNA; acetilação e metilação de histonas H3 e H4; expressão protéica de *DNMT1*, padrão de metilação das regiões promotoras dos genes para *RARβ* e *RASSF1A*; expressão dos gene *RASSF1A*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nutrição, epigenética e câncer

No contexto pós-genoma, o ambiente associado a fatores genéticos atuam importantemente na determinação do fenótipo e estado de saúde humana. Apesar dos esforços e avanços substanciais para as estratégias de prevenção e tratamento, o câncer ainda lidera como principal causa de mortes no mundo (LEE *et al.*, 2011; WHO, 2011). Em 2008 o número de mortes por câncer atingiu 7,6 milhões no mundo (WHO, 2012).

Dieta e Nutrição, neste contexto, destacam-se como importantes fatores ambientais na modificação do risco de DCNTs, que incluem além de doenças cardiovasculares e diabetes, as neoplasias [World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (WCRF/AIRC, 2007); ROSS, 2010].

A Organização Mundial da Saúde revela que 30% a 40% de todos os tipos de mortes por câncer sejam preveníveis (WHO, 2011). Desde as análises quantitativas realizadas por Doll e Peto (1981) há mais de duas décadas, dados epidemiológicos apontam que cerca de 30% dos casos de câncer estejam associados à alimentação, podendo ser evitados por alterações protetoras na dieta (MATHERS, 2007; WCRF/AIRC, 2007; MARTINEZ, MARSHALL, GIOVANNUCCI, 2008).

No estudo coorte prospectivo *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC), por exemplo, que envolveu cerca de 520.000 pessoas de 10 países europeus, importante redução da incidência de neoplasias foi associada à adesão de um padrão de dieta mediterrânea (COUTO *et al.*, 2011). O reduzido consumo de frutas, hortaliças, cereais integrais e peixes, bem como a ingestão dietética aumentada de ácidos graxos saturados e trans, sódio e carboidratos refinados compreendem, assim, modificações dietéticas propiciadoras ao aumento do risco de diversos tipos de câncer (MANSON, 2003; WCRF/AICR, 2007; MARTINEZ, MARSHALL, GIOVANNUCCI, 2008; ROODENBURG *et al.*, 2011).

Dentre os mais de 25.000 compostos bioativos diferentes presentes naturalmente nos alimentos, apenas cerca de 2% destes já foram identificados por modificar positiva ou negativamente o risco de câncer (MILNER, 2008; LI; TOLLEFSBOL, 2010). Entre os protetores, incluem-se retinóides, vitaminas D3, E e C, polifenóis, fibras, fitoestrógenos, ácidos graxos ômega 3 e 6, ácido retinóico e folato, assim como os micronutrientes cálcio, zinco e selênio (BOHNSACK; HIRSCHI, 2004; DIVISI *et al.*, 2006; WCRF/AIRC, 2007). A exposição do metabolismo humano a um número amplo de nutrientes/ CBAs presentes na dieta diariamente, entretanto, acaba dificultando definir qual o componente alimentar é fundamental para promover uma mudança fenotípica tumoral (KRIS-ETHERTON, 2004; MILNER, 2008).

Nutrientes e CBAs dietéticos, neste contexto, além de essenciais ao metabolismo energético e regulação de atividades biológicas específicas (estado de estresse oxidativo; sistema imune e inflamação), atuam como anticarcinogênicos. Modulam etapas frequentemente alteradas na carcinogênese, como proliferação, diferenciação e apoptose (DAVIS, 2007; XIANG *et al.*, 2008; NIAN *et al.*, 2009). Também são capazes de modificar eventos epigenéticos, que compreendem alterações moleculares interessantemente herdáveis e reversíveis (WATSON; CAI, 2000; MILNER, 2004; BARNES, 2008; VAISSIÈRE *et al.*, 2008; HO; DASHWOOD, 2010; JOVANOVIĆ *et al.*, 2010; MCKAY; MATHERS, 2011; RODRÍGUEZ-PAREDES; ESTELLER, 2011).

O caráter reversível de eventos epigenéticos envolvidos na biologia e desenvolvimento do câncer e modulados por fatores dietéticos, justifica o interesse de investigação da atividade de nutrientes e/ou CBAS presentes naturalmente nos

alimentos ou sinteticamente na dieta. Uma vez que a informação da exposição dietética seja registrada no genoma, será lembrada através das gerações celulares sucessivas (MCKAY; MATHERS, 2011; COLACINO *et al.*, 2012). Descreve-se que nutrientes e CBAs atuam na indução de alterações epigenéticas por três mecanismos principais: ativação/ inibição da maquinaria transcricional da cromatina; ativação de receptores nucleares por ligantes e cascatas sinalizatórias por receptores de membrana (MCKAY; MATHERS, 2011). A consequência destas exposições geram alterações na expressão gênica, função e fenótipo celular (MCKAY; MATHERS, 2011).

No câncer de mama alterações epigenéticas são frequentemente encontradas, onde esforços consideráveis são focados na compreensão de como certos fatores dietéticos podem promover a resistência de células epiteliais mamárias à desregulação no seu crescimento e progressão (RODRÍGUEZ-PAREDES; ESTELLER, 2011; SU *et al.*, 2011).

2.2 CÂNCER DE MAMA

2.2.1 Aspectos gerais

O câncer de mama destaca-se como importante problema de saúde pública, sendo a principal causa de morte entre as mulheres no mundo, tanto em países emergentes quanto em países desenvolvidos (WHO, 2011). Cerca de 1,4 milhões de casos novos dessa neoplasia foram esperados mundialmente para o ano de 2008, o que representa 23% de todos os tipos de câncer (INCA, 2012). Dados estatísticos divulgados pelo *National Cancer Institute* (NCI) revelaram que cerca de 207 mil novos casos de adenocarcinoma mamário foram diagnosticados em mulheres norte americanas e cerca de 20% destas foram a óbito (HOWLADER *et al.*, 2012; NCI, 2011). No Brasil, sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente. Estima-se ainda que em 2012 sejam diagnosticados cerca de 53mil casos novos, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012). De caráter multifatorial, os fatores de riscos envolvidos são desde mutações em genes supressores de tumor BRCA1 e BRCA2; história familiar; exposição à terapia hormonal; nuliparidade; menarca precoce e estilo de vida; aos hábitos alimentares não saudáveis (MICHAELS *et al.*, 2007; WCRF/AIRC, 2007).

A glândula mamária atinge seu desenvolvimento máximo durante a gravidez e lactação. Constitui-se de dois compartimentos celulares maiores: um epitélio dinâmico onde ocorre ciclos de proliferação, diferenciação e apoptose em resposta a sinalização local e endócrina; e o estroma adjacente formado por fibroblastos, células endoteliais e adipócitos, que coletivamente formam o tecido adiposo mamário (SU *et al.*, 2011). O adenocarcinoma de mama humano, por sua vez, corresponde a nomenclatura dada à neoplasia maligna em glândulas da mama, podendo ocorrer nos lóbulos ou ductos mamários. As etapas iniciação, promoção e progressão celulares, classicamente alteradas na carcinogênese (PITOT; DRAGAN, 1994), estão ilustradas no contexto do câncer de mama, na Figura 1 e descritas a seguir.

A unidade lobular ductal terminal da mama (TDLU, *terminal ductal lobular units*) contém lóbulos e ductos que consistem de um epitélio estratificado em células luminais e mioepiteliais. Uma vez que alterações genéticas e epigenéticas iniciem alterações anormais genômicas destas células, uma hiperplasia ductal ou lobular atípica de células anormais pode ocorrer dentro de ductos (ADH, *Atypical ductal hyperplasia*) e lóbulos (ALH, *Atypical lobular hyperplasia*), compreendendo esta uma lesão pré-maligna (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2010).

Os estágios subseqüentes podem evoluir para uma lesão não invasiva com células transformadas, caracterizando o carcinoma lobular *in situ* (LCIS, *lobular carcinoma in situ*) e/ou carcinoma ductal *in situ* (DCIS, *ductal carcinoma in situ*) (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2010).

A progressão tumoral subseqüente é dirigida pelo acúmulo de alterações genéticas adicionais combinadas com a expansão e seleção clonal (POLYAK, 2007). A cada estágio, aumenta-se o risco de se desenvolver um câncer de mama invasivo (IBC, *invasive breast cancer*), sendo os linfonodos o sítio primário para metástase (MET, *breast cancer metastasis*) (WEIGELT *et al.*, 2005; VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007). Isto envolve, então, a progressão através de estágios patológicos e clínicos definidos, iniciando-se pela hiperproliferação, com conseqüente evolução a carcinomas *in situ*, invasivos e finalmente a doença metastática (POLYAK, 2007).

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Figura 1. Progressão da carcinogênese mamária regulada por mecanismos genéticos e/ou epigenéticos. TDLU (terminal ductal lobular unit); ADH (Atypical ductal hyperplasia); DCIS (ductal carcinoma *in situ*); IBC (Invasive breast cancer); MET (breast cancer metastasis). Adaptado de VARGO-GOGOLA T; ROSEN J. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature cancer reviews*.7: 659-72, 2007.

Tem sido demonstrado que a apoptose está envolvida em vários estágios de desenvolvimento da mama normal, tais como a formação do lúmen intraductal, ao término do ciclo menstrual e durante a involução das glândulas mamárias após o cessamento da lactação (YANG, 2006). Apoptose, processo de morte celular programada autônomo, desempenha um importante papel na manutenção de renovação tecidual, bem como na eliminação de células anormais, mantendo um balanço entre a proliferação e morte celular nos tecidos mamários normais. Morfologicamente esse processo é caracterizado pelo condensamento da cromatina, fragmentação de DNA e alterações na membrana plasmática celular, que inclui a perda de volume celular e externalização de fosfatidilserina; seguido por empacotamento do conteúdo celular em estruturas denominadas corpos apoptóticos (KERR *et al*, 1977; KERR, 2002; YANG, 2006).

É bem estabelecido, entretanto, que a maioria das células neoplásicas de mama seja derivada de células epiteliais ductais. Algumas lesões de DCIS desenvolvem-se,

por um lado, em cânceres de mama invasivos se não tratados devidamente. Por outro, podem permanecer por mais de 30 anos sem a progressão da doença. Entretanto, o acúmulo de células epiteliais mamárias em áreas lumbais ocorre somente quando as células estão co-expressando genes que estimulam a proliferação e inibição da apoptose. Sugere-se assim que no desenvolvimento do câncer de mama, esteja presente um estresse proliferativo provocado por inibição apoptótica, bem como alterações genéticas e epigenéticas (YANG L, 2006), que serão aqui discutidos.

2.2.3 Nutrição, epigenética e câncer de mama.

O câncer compreende uma doença heterogênea, de caráter multifatorial e modulado por fatores ambientais que interagem com aspectos mutagênicos hereditários, bem como anormalidades no genoma e epigenoma (WADDINGTON, 1942; PORTELLA; ESTELLER, 2010; LECHNER; BOSHOF; BECK, 2010; RODRÍGUEZ-PAREDES; ESTELLER, 2011).

A compreensão de alterações epigenéticas e sua contribuição para a carcinogênese mamária é importante no contexto que envolve a investigação de estratégias que possam intervir no seu avanço e progressão (JOVANOVIĆ *et al.*, 2010). Isto pelo fato de regulação dinâmica do processo de metilação no empacotamento do DNA refletir, em particular, no equilíbrio da atividade transcricional e repressão gênica (TING; MCGARVEY; BAYLIN, 2006)

O termo epigenética foi descrito pela primeira vez, na década de 1940, por Conrad Waddington, como sendo uma interação casual entre genes e seus produtos na determinação fenotípica e ao que chamou de Panorama Epigenético (WADDINGTON, 1942; ESTELLER, 2008). Em 1975, Holiday e Pugh propuseram que modificações químicas covalentes do DNA, incluindo a metilação de dinucleotídeos citosina-guanina, eram os mecanismos envolvidos na hipótese de Conrad (JIRTLE; SKINNER, 2007). Seguiu-se então com os achados que demonstraram que a inativação do cromossomo X e imprinting genômico em mamíferos eram regulados por mecanismos epigenéticos, o que norteou o conceito de seu caráter herdável (JIRTLE; SKINNER, 2007).

Na atual era pós genoma humano, o conceito mais consistente do termo epigenética pode ser assim definido como alterações herdáveis na expressão gênica, diante da modificação do perfil de metilação e remodelamento da cromatina, mas não devido à alterações na sequência de nucleotídeos no DNA (JIRTLE; SKINNER; 2007; ESTELLER, 2008; RODRÍGUEZ-PAREDES; ESTELLER, 2011).

Durante a carcinogênese, a hipometilação do DNA genômico aumenta conforme a lesão progride de uma proliferação celular benigna a uma neoplasia invasiva, inclusive em mama. (ESTELLER, 2008). Isto parece ser explicado pela conseqüente geração de instabilidade cromossômica; ativação de oncogenes; reativação de elementos transponíveis desencadeadores de mutações e perda do imprinting genômico (ESTELLER, 2008; DEVINOY; RIJNKELS, 2010; BROWER; 2011).

Em vários tipos de tumor, inclusive o de mama, enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) encontram-se superexpressas, e são responsáveis pelo processo de metilação do DNA (VEECK; ESTELLER, 2010). Entre as 5 enzimas DNMTs descritas na literatura, somente DNMT1, DNMT3a e DNMT3b apresentam atividade catalítica (GUIL; ESTELLER, 2009). Em ilhas CpG (citosina-fosfodiéster-guanina), preferencialmente, DNMTs catalizam a transferência covalente de um grupo metil de seus domínios C-terminais, da enzima doadora *S-adenosylmethionine* (SAM), com remanescência de *S-adenosylhomocysteine* (SAH), para o carbono na posição 5' de um resíduo de citosina, que precede uma guanina de dinucleotídeo CpG (VALERI *et al.*, 2009; BAYLIN; OHM, 2006).

A enzima DNMT1, responsável por manter o padrão de metilação do DNA durante a replicação do DNA (GUIL; ESTELLER, 2009), possui afinidade bioquímica por regiões hemimetiladas, ao mesmo tempo em que a preferência do momento de replicação seja o alvo para permitir que a cópia do padrão de metilação da fita parental seja transmitida para a nova fita-filha de DNA sintetizada (PATRA *et al.*, 2008; GUIL; ESTELLER, 2009). Na maquinaria de replicação, ocorre a incorporação de citosinas desmetiladas em fitas recentemente sintetizadas. Os locais resultantes hemimetilados são assim convertidos a locais totalmente hipermetilados pela DNMT1 (PATRA *et al.*, 2008). A família DNMT3, por sua vez, consiste de membros catalíticos, DNMT3a e

DNMT3b, que ao contrário da DNMT1, apresentam atividade metiltransferase aumentada sobre regiões desmetiladas (VEECK; ESTELLER, 2010)

Em estudo que avaliou a expressão de enzimas metiladoras do DNA em mulheres com carcinoma de mama positiva ou negativa ao receptor de estrógeno, por exemplo, aproximadamente 30% das pacientes demonstraram expressão significativamente aumentada de DNMT3b no tecido tumoral comparado à mama normal (GIRAULT *et al.*, 2003). Interessantemente, DNMT1 e DNMT3a estavam superexpressos em 5% e 3% dos carcinomas mamários, respectivamente. Estes achados apontam que a DNMT3b pareça demonstrar um papel importantemente maior do que DNMT1 e DNMT3a na tumorigênese mamária (GIRAULT *et al.*, 2003).

Recentes técnicas epigenômicas apontam ainda que de 100 a 400 ilhas CpG estejam hipermetiladas nas regiões promotoras, com especificidade a cada tipo de tumor (ESTELLER, 2008). No câncer de mama, observa-se que mais de 100 genes estão silenciados transcricionalmente pela hipermetilação de suas regiões promotoras, visto que o condensamento da heterocromatina inviabiliza que os genes sejam expostos e transcritos (GUIL; ESTELLER, 2009). Muitos destes genes desempenham atividades de destaque na regulação do ciclo celular, apoptose, invasão tecidual e metástase, angiogênese e sinalização hormonal (ESTELLER, 2008; JOVANOVIC *et al.*, 2010).

Regiões promotoras de genes envolvidos com o reparo do DNA (BRCA1); na apoptose (APC; HOXA5); invasão celular/ metástase (CDH1; SYK); bem como *RAR-β* e *RASSF1a* na regulação do ciclo celular, encontram-se comumente hipermetilados no câncer de mama (JOVANOVIC *et al.*, 2010). A metilação do gene supressor de tumor regulador *RAR-β* compreende um evento epigenético precoce na carcinogênese, e é encontrado em lesões *in situ* de ambos os tipos de câncer lobulares e ductais (JOVANOVIC *et al.*, 2010).

O *RASSF1a* representa uma das mais importantes isoformas do gene supressor de tumor *RASSF1*, localizado no cromossomo 3p21.3 (VAN DER WEYDEN; ADAMS, 2007). Com propriedades compatíveis às funções de supressor de tumor, está silenciado epigeneticamente em mais de 37 tipos de tumores, incluindo o câncer de mama onde

sua região promotora encontra-se frequentemente hipermetilada (DONNINGER, 2007; VAN DER WEYDEN; ADAMS, 2007; JOVANOVIĆ *et al.*, 2010)

No câncer de mama, a hipermetilação do *RASSF1a* parece estar envolvida também em eventos iniciais da tumorigênese mamária, estando sua expressão silenciada epigeneticamente tanto em hiperplasias epiteliais e papilomas intraductais da mama, bem como em células epiteliais neoplásicas, seja em DCIS ou LCIS (VAN DER WEYDEN; ADAMS, 2007)

Estudos têm demonstrado que a superexpressão de *RASSF1a* promove apoptose, parada do ciclo celular e reduz a tumorigenicidade em linhagens celulares de câncer (DONNINGER, 2007). Entre suas funções destacam-se a organização de microtúbulos, manutenção da estabilidade genômica; regulação do ciclo celular, nas fase G1-S e modulação dos níveis de ciclina D1 (DONNINGER, 2007; VAN DER WEYDEN; ADAMS, 2007; DWORKIN; HUANG; TOLAND, 2009).

A hipermetilação de genes supressores de tumor bem como a hipometilação global do DNA, neste contexto, representam alguns dos importantes eventos na origem e avanço do câncer de mama (GUIL; ESTELLER, 2009). Modificação covalente pós-tradução de histonas compreende outro mecanismo epigenético de destaque no contexto do câncer. Modificações em resíduos de aminoácidos de histonas, tais como os processos de acetilação e metilação podem estar conectados com a maquinaria que coordena o padrão de metilação do DNA, estado da cromatina e atividade transcricional (BALLESTAR, ESTELLER, 2005; GUIL; ESTELLER, 2009).

Estas identificações de conexões entre a metilação alterada do DNA com o processo de acetilação e metilação de histonas têm contribuído não somente para a compreensão de como a desregulação epigenética acontece no câncer, mas também para o desenvolvimento de novas terapias que possam reverter defeitos epigenéticos em células neoplásicas (BALLESTAR, ESTELLER, 2005; TING; MCGARVEY; BAYLIN, 2006; VALERI *et al.*, 2009).

A subunidade básica da cromatina é representada pelo nucleossomo, que consiste de 146 pb de DNA genômico envoltos por um octâmero de histonas, incluindo um dímero de H2A-H2B e um tetrâmero de H3-H4 (ESTELLER, 2008; HUANG; ESTELLER, 2010). Descreve-se ainda a H1, histona ligante que fecha o DNA e permite a formação de uma estrutura em grande escala (ESTELLER, 2008).

Histonas representam, assim, os principais componentes protéicos de cromatina, que além de proteínas empacotadoras do DNA, atuam na regulação da expressão gênica (ESTELLER, 2008). Seus sítios N-terminais específicos propiciam as reações que favorecem ativação ou inativação da cromatina (TING; MCGARVEY; BAYLIN, 2006; VALERI *et al.*, 2009). Elas armazenam informações epigenéticas que podem ser ativadas pós-traducionalmente, como acetilação de resíduos de aminoácidos lisina, bem como metilação de resíduos de arginina e lisina, fosforilação, entre outros mecanismos (ESTELLER, 2008).

A acetilação resíduos de aminoácidos lisina em histonas é frequentemente associado com ativação transcricional, podendo modular a transcrição gênica em dois níveis: acetilação global de histonas e acetilação específica das regiões promotoras gênicas (ESTELLER, 2008; VAISSIÈRE *et al.*, 2008). No câncer, uma vez que promotores gênicos estejam hipermetilados, a desacetilação de histonas local será ativada por meio das enzimas desacetilases de histonas (HDACs). Estas atuam na remoção de grupos acetil de resíduos de lisina K9 na histona H3 (H3K9) ou resíduos de lisina K16 em histona H4 (H4K16ac), por exemplo, levando a compactação da cromatina e repressão da transcrição gênica (MYZAK; DASHWOOD, 2006; VAISSIÈRE *et al.*, 2008). Por outro lado, acetilases de histonas (HATs) promovem a acetilação de resíduos de aminoácidos como o de lisina K9 em histonas H3 ou de lisina K16 em histona H4, resultando na abertura da cromatina. Isso possibilita o acesso de fatores de transcrição a regiões promotoras nos genes e início de sua expressão (VAISSIÈRE *et al.*, 2008; LO; SUKUMAR, 2008).

Assim como a acetilação, a metilação de resíduos de aminoácidos em histonas compreende processo também reversível que desempenha importante papel na carcinogênese (TING; MCGARVEY; BAYLIN, 2006; VALERI *et al.*, 2009; KONDO, 2009). Participam dessa modificação epigenética da cromatina as enzimas metiltransferases de histona (HMT) e desmetilases (KONDO, 2009). Entretanto o nível de modulação da expressão gênica depende do tipo de resíduo de aminoácido metilado. Por exemplo, a metilação de resíduo K4 em histona H3 promove ativação transcricional, enquanto a sua inibição é promovida pela metilação de resíduos K9, K27 ou K20 em H3 (VAISSIÈRE *et al.*, 2008).

A trimetilação do resíduo de lisina na histona H3 (H3K9me3), por exemplo, tem sido associada à configuração inativa da cromatina (heterocromatina), enquanto que a dimetilação desse resíduo associa-se com a cromatina ativa (eucromatina) (KONDO, 2009).

A identificação de agentes moduladores de marcas epigenéticas, tais como metilação global do DNA e modificações pós-tradução em histonas, neste contexto, compreende alternativa promissora para estabelecimento de estratégias de controle da carcinogênese mamária. Estima-se que cerca de 30% dos casos de câncer estejam associados à alimentação, podendo ser evitados por alterações na dieta como, por exemplo, aumento do consumo de frutas e hortaliças, cereais integrais e peixes. Nesse contexto, destaca-se a necessidade de se identificar quais componentes dos alimentos apresentariam ações anticarcinogênicas. Além disso, a elucidação de suas ações em nível celular e molecular merece destaque.

Nutrientes e compostos bioativos de alimentos são capazes de modular a expressão gênica por meio de processos epigenéticos, mas pouco se conhece a respeito da influência da nutrição no padrão de metilação gênica, bem como na acetilação e metilação de histonas. Especificamente, nutrientes que agem como cofatores na via do metabolismo do carbono, tais como betaína, vitamina B12 e colina, são necessários para estabelecer e manter marcas de metilação no DNA, bem como modificações pós-tradução de histonas (COLACINO *et al.*, 2012).

O elemento traço essencial selênio tem recebido considerável atenção na comunidade científica por estar presente naturalmente nos alimentos e exercer atividade anticarcinogênica. Nesse contexto, aventa-se a hipótese de que a modulação de processos epigenéticos represente mecanismo relevante das ações inibitórias do selênio no câncer de mama.

2.3 SELÊNIO

2.3.1 Aspectos nutricionais e câncer

A essencialidade do elemento traço selênio foi definida ao final da década de 1950 por Schwarz e Foltz (SCHRAUZER; SURAI, 2009). Segundo a *Dietary Reference*

Intakes (DRIs) [Institute of Medicine (IOM, 2005)], o valor recomendado da RDA (*Recommended Dietary Allowance*) para ingestão de selênio em homens ou mulheres adultas saudáveis, entre 19 e 70 anos de idade, compreende 55µg/ dia (IOM, 2005), não devendo exceder o seu limite máximo de ingestão tolerável (*Tolerable Upper Intake Level*, UL) em 400µg/ dia (IOM, 2005).

Na dieta, os alimentos que se destacam pela maior biodisponibilidade em compostos de selênio são representados principalmente por àqueles de origem vegetal, tais como cereais grãos e leguminosas, com destaque para a oleaginosa castanha-do-Brasil, principalmente na forma de selenometionina; alimentos acumuladores de selênio, como crucíferos e organosulfurados (cebola, brócolis, alho), na forma de Selenometilselenocisteína; carnes, ovos e leite, na forma de selenocisteína; assim como peixes, grão de trigo, sementes de girassol, (RIKIISHI, 2007; WCRF/AIRC, 2007).

Entre as funções protetoras atribuídas ao selênio, destaca-se além da atuação no funcionamento do centro catalítico de proteínas (selenoproteínas), capacidade antioxidante, participação da síntese de hormônios tireoidianos; manutenção e fortalecimento do sistema imunológico; proteção contra ação nociva de metais pesados e xenobióticos, sua atividade anticarcinogênica (FINLEY, 2006). O consumo diário de 200µg/ dia de selênio dietético é apontado por sua atividade quimiopreventiva e redução do risco de diversos tipos de câncer (RIKIISHI, 2007). Há décadas, correlações inversamente significantes foram encontradas, comparando-se taxas de mortalidades entre diferentes tipos de câncer humano em diferentes países e ingestão dietética de selênio (SCHRAUZER *et al.*, 1977; SU *et al.*, 2011).

A maioria das investigações nutricionais envolvendo a quimioprevenção do câncer por selênio tem usado selenito de sódio ou selenometionina como o composto de alimento sintético diante da sua disponibilidade comercial (ABDULAH *et al.*; 2005).

No *Nutritional Prevention of Cancer* (NPC), por exemplo, a suplementação com selênio, na forma de selenito de sódio, diminuiu o risco de câncer entre indivíduos com importante deficiência nutricional deste micronutriente, mas não entre os que ingeriam selênio em quantidades recomendadas (WCRF/AICR, 2007). Entretanto, no estudo *Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial* (SELECT), foi observado um aumento razoável para o risco ao câncer de próstata entre os participantes saudáveis suplementados somente com vitamina E (D,L α-tocoferol sintético), bem como

desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2 no grupo tratado com selênio (L-selenometionina) (WCRF/AICR, 2007).

2.3.2 Metabolismo do selênio

O selênio pode estar presente na natureza e alimentação nas formas orgânicas e inorgânicas. Estas últimas, menos frequentemente e em menor quantidade na dieta, comparada às formas orgânicas de selênio (RIKIISHI, 2007). A via metabólica e papel do pool de metilação de formas de selênio importantes biologicamente são ilustrados na Figura 2.

O selênio é primariamente retomado do solo pelos vegetais nas suas formas inorgânicas, selenato (SeO_4^{-2}) ou selenito (SeO_3^{-2}). Uma vez incorporadas nos vegetais, são transformadas em formas orgânicas, representadas principalmente por selenocisteína, Se-metilselenocisteína e selenometionina (XIANG *et al.*, 2008; VALDIGLESIAS *et al.*, 2009).

A forma inorgânica selenito pode ser obtida diretamente a partir da alimentação ou suplementação, ou indiretamente pela redução de selenato de sódio, outra forma inorgânica de selênio. Na presença do tripeptídeo glutathiona (GSH), o selenito é reduzido ao metabólito intermediário seleneto de hidrogênio (H_2Se). Este normalmente é preservado como o precursor que fornece o selênio na sua forma ativa, selenocisteína, para a síntese de selenoproteínas (ABDULAH *et al.*; 2005), bem como no *pool* de metilação do selênio a metabólitos monometilados, dimetilados e trimetilados.

Por via distinta, compostos de selênio orgânicos geram o mesmo intermediário H_2Se formado a partir da metabolização de compostos inorgânicos. A selenometionina, por exemplo, pode ser incorporada em proteínas no lugar da metionina pela acilação do RNAt (RNA transportador) para metionina. Alternativamente pode ser convertida pelo mecanismo de transsulfuração a selenocisteína, que é degradada H_2Se pela ação da enzima β -liase. (ABDULAH *et al.*; 2005)

O metabolismo subsequente de H_2Se envolve a metilação do selênio dietético gerando metabólitos intermediários menos tóxicos, como os monometilados, que têm sido apontados como os mais efetivos biologicamente no contexto do câncer (IP *et al.*,

2000; ABDULAH *et al.*; 2005), principalmente por apresentar menos efeitos tóxicos comparados a outras formas de selênio, como o selenito (ABDULAH *et al.*; 2005).

O processo de metilação de compostos de selênio é determinado pela atividade de enzimas S-tióis metiltransferases com especificidade para transferência de grupos metil, particularmente pela atividade da SAM. H_2Se é então metilado sequencialmente a metilselenol, dimetilseleneto ($\text{CH}_3\text{-Se-CH}_3$) e trimetilselenônio [$(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$], sendo esses dois últimos metabólitos a forma de excreção do selênio pela respiração e urina, respectivamente (IP *et al.*, 2000; ABDULAH *et al.*; 2005).

Sugere-se que o metilselenol seja o metabólito crítico para as ações anticarcinogênicas do selênio (IP *et al.*, 1991; GANTHER, 1999; IP *et al.*, 2000; RIKIISHI, 2007). Entretanto, por ser altamente reativo, não pode ser testado experimentalmente nesta forma química (IP; DONG, GANTHER, 2002).

O ácido metilselenínico é gerado a partir da remoção do grupamento aminoácido da molécula de Se-metilselenocisteína, por ação da β -liase, compreende um composto de selênio orgânico monometilado e precursor direto do metilselenol, não requerendo enzimas para esta conversão (IP *et al.*, 2000; RIKIISHI, 2007). Uma vez que seja incorporado pelas células, é facilmente reduzido a formas de selênio monometiladas por uma reação enzimática envolvendo o tripeptídeo GSH e a co-enzima NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) (ABDULAH *et al.*; 2005). Portanto, bioquimicamente, serve como um agente pronto para gerar selênio monometilado assim que entra na célula (ABDULAH *et al.*; 2005); atuando rapidamente em linhagens celulares (SHAH *et al.*, 2005).

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Figura 2. Esquema ilustrativo da via metabólica e *pool* de metilação de formas de selênio importantes biologicamente. Abreviações: SAM = *S*-adenosylmethionine.

2.2.3 Selênio e câncer de mama

Em estudos epidemiológicos, experimentais com modelos *in vivo* e *in vitro*, é enfatizado o papel importante do micronutriente selênio, essencial a saúde humana, incluindo o contexto da redução do risco do câncer de mama (LOPEZ-SAEZ; SENRA-VARELA; POUSA-ESTEVEZ, 2003; LEE *et al.*, 2005; WARRI *et al.*, 2008; SUZUKI *et al.*, 2010).

Selenometionina e selenito são as formas químicas mais frequentemente testadas em cultura celular, bem como em estudos pré-clínicos e clínicos (BROZMANOVA' *et al.*, 2010). Entretanto, algumas investigações demonstraram que a selenometionina em linhagens celulares humanas não demonstraram atividade anti-carcinogênica (DONG *et al.* 2002; JACKSON; COMBS, 2008). A selenometionina é primariamente metabolizada no fígado pela enzima β -liase ao intermediário monometilado metilselenol para expressar sua atividade anti-câncer. Entretanto, tecidos epiteliais, como os de mama, geralmente apresentam uma capacidade reduzida para geração de metabólitos de selênio monometilados a partir da selenometionina, limitando sua atividade anticarcinogênica (BROZMANOVA' *et al.*, 2010). Além disso, as células não distinguem entre metionina e selenometionina durante a síntese protéica, fazendo com que a selenometionina seja incorporada inespecificamente em proteínas corporais totais no lugar da metionina (JACKSON AND COMBS, 2008).

Já o selenito parece ser a forma de selênio mais ofensiva e deletéria, devido ao seu potencial pró-oxidante, mediado por seus efeitos citotóxicos. Sua citotoxicidade envolve a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem induzir danos celulares, no DNA e resultando consequentemente em apoptose (BROZMANOVA' *et al.*, 2010)

Fundamenta-se que os compostos de selênio que entram diretamente no *pool* de metilação sejam mais eficazes (GANTHER, 1999; IP *et al.*, 2002), e que os compostos de selênio monometilados sejam efetivos *in vitro* e em células transformadas em muito baixas concentrações para promover efeitos quimiopreventivos (apoptose e parada do ciclo celular) (ABDULAH *et al.*; 2005).

O ácido metilselenínico, metabólito estável de selênio monometilado, parece ser mais apropriado que a selenometionina e selenito como suplemento dietético, por sustentar a produção de intermediários de selênio com atividades anticarcinogênicas tais como H_2Se e/ou metilselenol, sem exercer atividade citotóxica quando administrada em baixas concentrações (BROZMANOVA' *et al.*, 2010).

Entre os mecanismos quimiopreventivos do ácido metilselenínico, estão inclusos: ação inibitória da proliferação celular, modulação da expressão de genes para receptores de hormônios e indução da defesa de carcinógenos. Além disso, o ácido metilselenínico tem a capacidade de modular biomarcadores regulatórios do ciclo celular em lesões pré-malignas de glândulas mamárias de ratas (ABDULAH *et al.*; 2005).

Especificamente em células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7, verificou-se atividades inibitórias por parte do ácido metilselenínico e selenito de sódio (REDMAN *et al.*, 1998; SHAH *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2010). O ácido metilselenínico inibiu o crescimento dessas células a partir da concentração de 2,5 μM . Tal efeito foi relacionado à redução da expressão do gene para o receptor de estrógeno α (LEE *et al.*, 2005; SHAH *et al.*, 2005). Compararam-se as ações do selenito e selenometionina na inibição do crescimento de células MCF-7 (SUZUKI *et al.*, 2010). Nesse caso, a forma inorgânica do selênio apresentou ações nesse sentido a partir da concentração de 10 μM , enquanto que no caso da forma orgânica, tais ações se deram a partir da concentração de 1.000 μM (SUZUKI *et al.*, 2010).

Poucos estudos, entretanto, exploram a capacidade de compostos de selênio, sejam eles orgânicos ou inorgânicos, modularem mecanismos e alvos moleculares epigenéticos no câncer. Tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro*, não há estudos que descrevam os mecanismos epigenéticos modulados por selênio no câncer de mama.

Já foi demonstrado, entretanto, que a deficiência dietética de selênio, em sua forma inorgânica selenito de sódio provoque a hipometilação global do DNA, tanto no fígado e cólon de modelos animais, quanto em linhagem celular neoplásica de cólon humano (DAVIS; UTHUS; FINLEY, 2000). Recentemente, foi demonstrado em linhagem humana de células neoplásicas de próstata que o selênio, na forma de selenito de sódio, desmetilou parcialmente o promotor do gene que codifica para a enzima

GSTP1, reativando sua expressão. Mais especificamente, o micronutriente inibiu nessas células tumorais a expressão dos genes para DNMT 1 e 3A, bem como a atividade da enzima HDAC, verificando-se redução do padrão de metilação global do DNA e aumento da acetilação e redução da metilação do resíduo K9 em histona H3 (XIANG *et al.*, 2008).

Esses resultados sugerem que a capacidade do selênio de modular processos epigenéticos representa aspecto relevante de seus mecanismos anticarcinogênicos (ZENG *et al.*, 2006; XIANG *et al.*, 2008; NIAN *et al.*, 2009). Insere-se nesse contexto a hipótese de que o selênio possa atuar como aceptor de grupo metil transferido por DNMT, por modificar a utilização de grupos metil e atividade enzimática de DNMTs, interferindo consequentemente na metilação do DNA (GANTHER, 1999; UTHUS; ROSS; DAVIS, 2006)

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Apesar de se apontar a inibição da proliferação e crescimento celular como aspecto crítico das ações anticarcinogênicas do selênio, os mecanismos exatos envolvidos não são claros. Ressalta-se a importância de se identificar quais alvos celulares e moleculares são modulados pelo micronutriente durante suas ações inibitórias (SUZUKI *et al.*, 2010). Considera-se ainda que compostos de selênio monometilados e precursores diretos do metilselenol sejam mais eficazes na inibição da gênese tumoral comparado ao composto de selênio inorgânico selenito (LI *et al.*, 2008). O seu papel em eventos epigenéticos e capacidade modulatória de alvos moleculares alterados na carcinogênese, entretanto, ainda é pouco esclarecido (GERHAUSER, 2013). Nesse contexto, aventa-se a hipótese de que a modulação de processos epigenéticos represente mecanismo relevante das ações inibitórias do selênio no câncer de mama.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Identificar efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

4.2 Objetivos específicos

Em células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio, avaliar:

- Padrão de proliferação celular e viabilidade de celular
- Citotoxicidade pela integridade de membrana plasmática celular
- Apoptose pelos níveis de fragmentação de DNA e exposição de fosfatidilserina.
- Distribuição das fases do ciclo celular
- Padrão de metilação global do DNA
- Expressão do gene *RASSF1A*
- Padrão de metilação das regiões promotoras dos genes para *RASSF1A* e *RARβ*
- Padrão de acetilação e metilação de resíduos de lisina 9 em histona H3 (H3K9ac; H3K9me3)
- Padrão de acetilação de resíduos de lisina 16 em histona H4 (H4K16ac)
- Padrão de expressão protéica da enzima *DNMT1*

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cultura celular

Foram utilizadas células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7, positivas para o receptor de estrógeno, adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA). Com o intuito de se evitar alterações nas características fenotípicas e genéticas da linhagem, foram mantidas em passagem 3 à 6. O cultivo das células foram conduzidos em frascos de cultura com meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de soro fetal bovino e tampão HEPES (3g/l) com pH final de 7,2; acondicionadas em incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO₂ à 37°C. O inóculo inicial foi subcultivado a cada três ou cinco dias e mantido em fase log de crescimento celular, de acordo com Holandino *et al.* (2001). Esse controle foi realizado para se manter a confluência das células próximo de 70% e evitar a ocorrência de alterações na proliferação celular que pudessem, consequentemente, mascarar os efeitos dos compostos de selênio testados. Células de fases 3 a 6 foram também congeladas em tubos de criocongelamento a uma concentração de 2×10^6 células/mL com 10% de DMSO para utilização durante a execução dos experimentos previstos no projeto.

5.2 Curvas de proliferação de células de adenocarcinoma mamário MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.

Para se avaliar o efeito dos diferentes compostos de selênio sobre a proliferação das células de adenocarcinoma mamário MCF-7, estas foram tratadas com a forma orgânica, ácido metilselenínico (*methaneseleninic acid*, CH₃SeO₂H, 95%, Sigma, E.U.A), ou com a forma inorgânica de selênio, selenito de sódio (Na₂SeO₃, 98%, Sigma, E.U.A). No tratamento das células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 com ácido metilselenínico, as concentrações testadas foram padronizadas entre 1μM e 2μM (LEE *et al.*, 2005). Para o tratamento com selenito de sódio as concentrações de tratamento foram padronizadas entre 1μM e 10μM (SUZUKI *et al.*, 2010).

Como controle, utilizou-se um grupo de células da linhagem MCF-7 não tratadas (GC), tendo meio de cultura DMEM como veículo, visto que os compostos selenito de sódio e ácido metilselenínico foram dissolvidos também em meio de cultura. A padronização das curvas de proliferação celular dos tratamentos de compostos de selênio, bem como a do grupo de células não tratadas, foi obtida a partir do plaqueamento com 2×10^5 células/mL, em sextuplicata e três experimentos independentes, em placas de 96 poços de fundo chato estéril. Após o período de incubação, as células foram coradas com 0,5% (10µL para 100 µL de meio/poço) de cristal violeta, incubadas por 10 minutos e lavadas cuidadosamente em água corrente. Após secas à temperatura ambiente, foram adicionados 100µL de metanol em cada poço e a leitura da densidade óptica foi feita a 570nm em leitor ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay/ Universal Microplate Reader EL800). Com a padronização das faixas de concentrações respectivas de cada composto de selênio, foram então conduzidas as diferentes análises celulares e moleculares, como se descreve a seguir.

5.3 Viabilidade celular da linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7 tratada com ácido metilselenínico ou selenito de sódio

O ensaio colorimétrico por exclusão foi utilizado para determinar o número de células viáveis presentes em uma suspensão celular. Baseia-se no princípio de que células vivas apresentem a membrana celular íntegra, excluindo certos corantes, como o azul de tripan e iodeto de propídio (STROBER, 2001; STODDART, 2011).

Viabilidade celular pelo método de exclusão azul de tripan

Nos ensaios conduzidos pelo método de exclusão azul de tripan, 10µL do corante azul de tripan 0,4% foram adicionados à 10µL de suspensão celular. Em hematocitômetro, realizou-se a contagem das células, examinando-se as células que incorporaram o corante de exclusão. Considerou-se como células viáveis àquelas de coloração branca, enquanto as células mortas apresentaram coloração azul escura (STROBER, 2001). Na contagem das células para caracterização do percentual de células viáveis, considerou-se:

- ✓ **Número total de células viáveis/ ml da alíquota** = número total de células viáveis/4 (número total de quadrantes da câmara de Neubauer) x 2 (fator de diluição do método azul de tripan) x 10^4 .
- ✓ **Número total de células/ml de alíquota** = (número total de células viáveis + número total de células não viáveis)/4 (número total de quadrantes da câmara de Neubauer) x 2 (fator de diluição do método azul de tripan) x 10^4 .

$$\text{Células viáveis (\%)} = \frac{\text{Número total de células viáveis/ ml da alíquota}}{\text{Número total de células/ml de alíquota}} \times 100$$

5.4 Análises da integridade de membrana plasmática; fragmentação do DNA e fases do ciclo celular, por citometria de fluxo, em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.

Em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio determinou-se a integridade de membrana plasmática, distribuição das fases do ciclo celular, fragmentação do DNA e tipo de morte celular por citometria de fluxo. Esta técnica baseia-se no princípio de captação e emissão de fluorescência por células individuais marcadas com anticorpos ou corantes vitais, como o iodeto de propídio (IP) e/ou o conjugado anexina V-FITC, como descrito por Lima et al (2007) e ilustrado na figura 3. O IP se intercala as duplas-fitas de DNA, e após a incidência do laser do citômetro sobre a amostra, a excitação do IP leva a uma emissão de fluorescência proporcional ao conteúdo de DNA na célula (REGGETI & BIENZLE, 2011). Já a Anexina V é uma proteína ligada a fosfolípidios que tem alta afinidade a fosfatidilserina.

É possível quantificar o DNA intracelular, e definir a proporção de células com DNA diplóide (2N), correspondendo ao estágio G0/G1 do ciclo celular; a proporção de células na fase S que possuem quantidade intermediária de DNA e a proporção de células na fase G2/M, período em que a síntese de DNA está completa e a células são tetraplóides (4N) (REGGETI & BIENZLE, 2011), como apresentado na Figura 4.

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Figura 3: Esquema ilustrativo da marcação de células com Iodeto de propídeo (IP) e Anexina V. Células viáveis não são marcadas, células apoptóticas externalizam fosfatidilserina que são reconhecidas e marcadas por Anexina V e células mortas podem ser marcadas com Anexina V e IP, pois com a destruição da célula, o IP pode entrar e se ligar ao DNA. Figura obtida de ANDRADE FO; MIRANDA JX; MORENO FS ; ONG TP. Modelos Neoplásicos *in Vitro* para Estudo de Compostos Bioativos de Alimentos. In: Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte; Raquel Alves dos Santos; Helio Vannucchi. (Org.). Nutrição e Metabolismo - NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL, 2012.

Figura 4. Proporção de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular. Figura obtida de ANDRADE FO; MIRANDA JX; MORENO FS; ONG TP. Modelos Neoplásicos *in Vitro* para Estudo de Compostos Bioativos de Alimentos. In: Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte; Raquel Alves dos Santos; Helio Vannucchi. (Org.). Nutrição e Metabolismo - NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL, 2012.

5.4.1 Tratamentos: Integridade de membrana plasmática, ciclo celular; fragmentação do DNA e morte celular [externalização de fosfatidilserina (FS)].

Para a análise concomitante da integridade de membrana plasmática, ciclo celular e fragmentação do DNA, células de adenocarcinoma mamário humano da

linhagem MCF-7 foram plaqueadas em triplicata, em placas de 6 poços na densidade de 5×10^5 células/ml por poço ou 2×10^5 células/mL (ensaio de morte celular – externalização de FS). Após 24h de adesão celular, as células foram tratadas com ácido metilselenínico (1,6 μ M ou 2 μ M) ou selenito de sódio (8 μ M ou 10 μ M). Como controle, células MCF-7 foram incubadas apenas com o veículo (meio de cultura). Após 72h e 96h de tratamento com ácido metilselenínico e após 96h e 120h de tratamento com selenito de sódio, o meio de cultura foi retirado e descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e tripsinizadas (800 μ L/poço). Após 3 minutos de contato em incubadora, a tripsina foi removida e foram adicionados 4ml de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB. As células foram homogeneizadas, centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos, e o sobrenadante descartado.

Na análise de integridade de membrana plasmática, as células foram coletadas no mesmo dia de análise de citometria de fluxo, em seus respectivos tempos e concentrações de tratamento de cada composto de selênio testado. Células não marcadas com IP foram utilizadas como branco, onde o pellet de células foi ressuspensionado somente em PBS. Para as amostras marcadas com IP, o pellet foi ressuspensionado em 200 μ L de solução de PBS contendo IP (10 μ g/mL), 5 minutos antes do momento de análise.

Nos ensaios conduzidos para análise de fragmentação do DNA e distribuição das fases do ciclo celular, as células foram fixadas em 3 mL de metanol 100% (gelado) e 1ml de PBS. As amostras foram agitadas cuidadosamente e a seguir incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, foram centrifugadas a 1200rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e as células foram lavadas com 1mL de PBS; centrifugadas novamente a 1200rpm por minutos, sendo o sobrenadante desprezado. O pellet foi ressuspensionado em 200 μ L de solução de PBS contendo iodeto de propídeo (10 μ g/mL) e RNase (15mg/mL). As amostras foram incubadas por 60 minutos no gelo e analisadas. Os dados obtidos para integridade de membrana plasmática, ciclo celular e fragmentação do DNA foram determinados em citômetro FACS CANTO II (BD Biosciences, USA). Foi avaliada a intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo ligado ao DNA de 10.000 eventos por amostra, monitorados no canal PEA ($_{exc.} = 488$

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

nm; $\text{emi.} = 695 \text{ nm}$). A representação gráfica dos dados obtidos foi determinada a partir da análise em *Software Flow Jo*.

5.4.2 Morte celular pela externalização de fosfatidilserina

A externalização de fosfatidilserina foi determinada por citometria de fluxo com o kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). Seguiram-se as instruções do kit para os ensaios de morte celular pela externalização de fosfatidilserina. Utilizou-se como controle positivo para apoptose o tratamento de células MCF-7 com DMSO (dimetilsulfóxido) diluído a 5% em meio de cultura DMEM. As células coletadas foram lavadas duas vezes com PBS (1x) gelado e então ressuspensas em tampão de ligação 1x na concentração de 1×10^6 células/mL. Transferiu-se 100 μL da solução (1×10^5 células/mL) a um tubo de ensaio de cultura de 5ml. Adicionou-se 5 μL de FITC (Isotiocianato de fluoresceína) - Anexina V e 5 μL de IP. As células foram vortexadas cuidadosamente e incubadas por 15min a temperatura ambiente (25°C) no escuro. E logo em seguida analisou-se em citômetro de fluxo. Os dados obtidos foram determinados em citômetro FACS CANTO II (BD Biosciences, USA). Foi avaliada a intensidade de fluorescência da Anexina V – FITC de 10.000 eventos por amostra, monitorados no canal PerCp (AnexinaV-FITC: canal FL1 fluorescência verde 530/30 nm; IP: canal FL2 fluorescência vermelho-laranja 585/42nm). A representação gráfica dos dados obtidos foi determinada a partir da análise em *Software Flow Jo*. Abaixo segue a ilustração de como os histogramas obtidos com os tratamentos foram interpretados.

5.5 Análise do padrão de metilação global do DNA de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.

A metilação do DNA pode ser compreendida pela adição de um grupo metil à citosina de um dinucleotídeo CpG, formando 5-metil-2'-desoxicitidina (5-mdC). Neste sentido, no DNA de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio, o padrão de metilação global foi determinado pela mensuração dos níveis de 5-mdC através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography/HPLC*).

5.5.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 dos grupos controle, selenito e ácido metilselenínico por método clássico utilizando-se fenol-clorofórmio e álcool isoamílico. Cerca de 5×10^6 células/mL MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm, incubadas por 24 horas e então tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio, nas respectivas concentrações padronizadas.

Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas e coletadas das placas de petri e então transferidas para um tubo e incubadas com 1mL de solução de lise TES (Tris HCL pH=8.0 10 mM, EDTA 50 mM, SDS 0,5%), 5 µL de RNase (10 mg/mL) e 15 µL de proteinase K (20 mg/mL) sob agitação, por aproximadamente 17 horas a 55°C. Após esta etapa, foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), sendo a mistura levada à agitação por 15 minutos. O homogenato foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e foi realizada outra extração com 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após nova centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionando-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2,5X do volume de etanol absoluto gelado. Essa solução foi mantida a -20°C por 2 dias para precipitação do DNA. Após este período, foi realizada centrifugação por 30 minutos a 12000 rpm e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Por fim o DNA foi ressuspenso em 50 µL de TE (Tris 100 mM, EDTA 10 mM, pH=8,0) e quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop1000,

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

ThermoScientific). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 2%.

5.5.2. Determinação dos níveis de 5– metil– 2’– desoxicitidina em DNA de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

5.5.2.1 Solução padrão

O padrão de 5–metil–2’–desoxicitidina (5– metil– dC) foi obtido por purificação a partir de DNA de timo de bezerro (Sigma) hidrolizado enzimaticamente, utilizando– se um sistema de HPLC. Sua identidade foi confirmada pelas seguintes características espectroscópicas: espectro de absorvância em H₂O: CH₃OH (6:1, v/v), $\lambda_{\max}$ 277 nm; espectro de absorvância em ácido fórmico 0.1% : CH₃OH (19:1, v/v), $\lambda_{\max}$ 286 nm; ESI– MS (modo positivo): m/z 242 [M + H]⁺, m/z 126 [M – 2’– desoxirribose + H]⁺.

As concentrações das soluções de 5– metil– dC e dC foram calculadas através da determinação da absorvância em água, utilizando– se os respectivos coeficientes de extinção molar (ϵ): 5– metil– dC, $\epsilon = 8500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em $\lambda = 277 \text{ nm}$; dC, $\epsilon = 9000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em $\lambda = 271 \text{ nm}$.

5.5.2.2 Hidrólise enzimática do DNA

Para a reação de hidrólise enzimática, alíquotas contendo 10 μg de DNA em desferroxamina (0,1 mM) foram adicionadas a 1 μL de tampão Tris– HCl/MgCl₂ 200 mM (pH 7,4) e 1,2 unidade de DNase 1. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Após a incubação foram adicionados 0,0005 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) e 1,2 unidade de fosfatase alcalina. As amostras foram novamente incubadas a 37°C por 1 hora com agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora o volume final da incubação (20 μL) foi centrifugado por 10 minutos a 9.300 x g e o sobrenadante foi coletado. Alíquotas de 10 μL (5 μg de DNA) foram injetadas e analisadas em sistema analítico de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography* - DAD).

5.5.3. Sistema analítico: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC–DAD)

As análises e purificações realizadas com UV/VIS foram conduzidas em um equipamento da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC–20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA– 20AV, um auto–injetor (Proeminence SIL– 20AC) e um forno para colunas (CTO– 10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM– 20A. Os dados foram processados pelo software LC– Solution 1.21. (Shimadzu, Japão). Os sistemas com as condições cromatográficas são descritos no decorrer da metodologia específica.

A seguinte condição cromatográfica foi utilizada para as análises:

Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm ID, 5 μ m, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré– coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH₃OH (0 – 25 min, 0 – 18% de CH₃OH; 25 – 27 min, 18 – 0% de CH₃OH; 27 – 37min, 0% de CH₃OH), com um fluxo de 1 mL/min, 30°C. O detector de DAD foi fixado em 260 nm para a quantificação da dC e 286 nm para a quantificação da 5– metil– dC. Curvas de calibração foram feitas no intervalo de 0,05 – 6 nmol para dC e de 0,005 – 0,4 nmol para 5– metil– dC.

5.6 Análise da expressão do gene que codifica para RASSF1A em células MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.

Avaliou-se a expressão do gene que codifica para *RASSF1A* em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 não tratadas, tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio, pela técnica PCR em tempo real quantitativo (qPCR).

5.6.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir de uma concentração de 5×10^6 células/ml plaqueadas em placas de petri de 100mm, incubadas por 24horas e então tratadas com ácido metilselenínico (1,6 μ M ou 2 μ M; 72h e 96h) ou selenito de sódio (8 μ M ou 10 μ M; 96h e 120h).

As células foram obtidas por centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, foram homogeneizadas com 100 µL de solução desnaturante (Clontech) em agitador mecânico por 2 minutos e em seguida, incubadas no gelo por 5 minutos. O homogenato foi centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para novo tubo e adicionado de 200 µL de fenol saturado. Este foi levado à agitação por 1 minuto e incubado em gelo por 5 minutos. Logo após, foi adicionado 60 µL de clorofórmio e incubado em gelo por 1 minuto. A fase aquosa contendo o RNA foi separada por centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C e então transferida para novo tubo. A extração foi repetida com 160 µL de fenol saturado e 60 µL de clorofórmio. Por fim, foi adicionado 200 µL de isopropanol, incubado em gelo por 10 minutos e novamente centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 80%, ressuspenso em água livre de RNase, armazenado em -20°C e quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop1000, ThermoScientific). A integridade do RNA foi avaliada através eletroforese com gel de agarose a 0,8%.

5.6.2 Conversão do RNA para cDNA.

A transcrição reversa foi realizada a partir de RNA total obtido de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas ou não com ácido metilselenínico ou selenito, de acordo com instruções do kit Super Script™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, EUA).

5.6.3 Amplificação do cDNA do gene RASSF1A por PCR em tempo real (RT-PCR).

A quantificação da expressão de mRNA do gene RASSF1A, através de seus respectivos cDNAs, foi realizada por qPCR utilizando-se o sistema de amplificação TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA). O gene GAPDH foi utilizado como controle (DAMMANN; YANG; PFEIFER, 2001). A escolha do primer e sonda marcada com fluoróforo FAM para o gene foi selecionado de acordo com o assay disponibilizado pela Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com.br) (Tabela 1).

Tabela 1: Sonda utilizada na PCR em Tempo Real.

Gene	Assay ID
<i>RASSF1A</i>	Hs00200394_m1

A reação de PCR foi realizada em termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), iniciada a 50°C por 2 minutos, seguida de 95°C por 10 min. A amplificação foi conduzida por 50 ciclos de 15s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão).

O sinal de fluorescência captada pelo programa 7000 System SDS Software gerou o parâmetro ciclo, denominado ciclo threshold (Ct), momento em que a amplificação acontece de forma exponencial. Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene foi registrado e comparado com o do gene controle *GAPDH*, que foi utilizado como controle endógeno.

A quantidade de cDNA utilizada nos ensaios foi determinada a partir de curva-padrão que permitiu avaliar a linearidade da amplificação bem como a eficiência da mesma. Para essa finalidade foram utilizadas 6 diferentes concentrações de cDNA (23ng 11,5ng 5,75ng 2,5ng 1,4ng e 0,7ng) de amostras de células de mama normal provenientes de mamoplastia (HB4a) usadas apenas para testes no ensaio de PCR em tempo real. Com os dados gerados pela curva padrão, foi calculada a eficiência da reação através da inclinação da curva. Para um ensaio de PCR em tempo real ter sido considerado de alta eficiência (90% a 110%), a inclinação (slope) da curva-padrão foi considerada próxima de -3,3 (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Os valores de Ct obtidos nos ensaios foram utilizados para determinar a expressão relativa de RNAm do gene alvo em relação à do *GAPDH* (controle endógeno), através da relação Delta Ct (ΔCt): $\Delta Ct = (Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ controle negativo})$. Para se verificar se houve variação da expressão do gene *RASSF1a* em células tratadas com ácido metilselenínico ou selenito em relação às células controle, os dados foram normalizados de acordo com o parâmetro Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$): $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ tratamento} - \Delta Ct \text{ controle})$. E por último, os resultados foram transformados em escala logarítmica ($2^{\Delta\Delta Ct}$).

5.7 Análise do padrão de metilação dos promotores dos genes que codificam para *RASSF1A* e *RARβ* de células MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico.

A técnica de MS-PCR (“methylation-specific PCR” – PCR metilação específica) foi utilizada para se analisar o padrão de metilação dos promotores dos genes *RARβ* e *RASSF1A* em células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7 dos grupos controle e ácido metilselenínico. A técnica MS-PCR baseia-se no princípio de que o tratamento do DNA com bissulfito converte os resíduos de citosinas não metiladas em uracilas, enquanto que os resíduos de citosinas metiladas permanecem inalterados. Assim, após a conversão com bissulfito, seqüências do DNA metiladas e não metiladas podem ser distinguidas por “primers” específicos (HERMAN *et al.*, 1996; COTTRELL; LAIRD, 2003).

5.7.1 Modificação do DNA com Bissulfito de Sódio.

Cerca de 2 µg do DNA genômico extraídos de células de adenocarcinoma humano MCF-7 tratadas com as respectivas concentrações padronizadas de ácido metilselenínico ou selenito de sódio, juntamente com DNA de esperma de salmão (Ci-10mg/ml) (Eppendorf, Alemanha) em volume final de 17µL, foram desnaturados com NaOH (concentração final de 0,2M) por 20 minutos a 50°C. Paralelamente, foi preparada uma solução de bissulfito de sódio 2,5M/hidroquinona 1M, pH=5 que foi adicionada à amostra e incubada a 70°C por 3 horas, no escuro. O DNA modificado foi purificado com o sistema Wizard DNA-Clean-up System (Promega, EUA), tratado com NaOH 0,3M por 10 minutos e então precipitado com acetato de amônio 5M, etanol gelado e 1 µL de glicogênio (20 mg/ml) durante uma noite à -20°C. Após esse período, foi centrifugado por 15 minutos a 20.817 g e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol a 70%. O DNA precipitado seco foi ressuspendido em 50 µL de TE e, em seguida, armazenado a -80°C até o momento de seu uso.

5.7.2 Amplificação por PCR da região promotora dos genes *RASSF1A* e *RARβ*

Foram construídos os “primers” específicos para as regiões promotoras dos genes para *RASSF1A* (BURBEE *et al.*; 2001) e *RARβ* (ESTELLER *et al.*, 2002).

- ✓ Gene que codifica para gene *RASSF1A*

Sequência não metilada

5'-GGT TGT ATT TGG TTG GAG TG-3' (sentido)

5'-CTA CAA ACC TTT ACA CAC AAC A-3' (anti-sentido)

Sequência metilada

5'-GTT GGT ATT CGT TGG GCG C-3' (sentido)

5'-GCA CCA CGT ATA CGT AAC G -3' (anti-sentido)

- ✓ Gene que codifica para o gene *RARβ*

Sequência não-metilada

5'TTGGGATGTTGAGAATGTGAGTGATTT 3' (sentido)

5'CTTACTCAACCAATCCAACCAAAACAA 3' (anti-sentido)

Sequência metilada

5' TGTCGAGAACGCGAGCGATTC 3' (sentido)

5' CGACCA ATCCAACCGAAACGA 3' (anti-sentido)

5.7.3 Controle positivo dos primers para as sequências metiladas e não metiladas.

Os seguintes controles positivos dos primers para as sequências metiladas e não metilada modificadas ou não com bissulfito foram utilizados:

Controles positivos
DNA desmetilado sem tratamento com bissulfito (<i>EPItech humana control DNA 10ng/μL Unmethylated - Qiagen</i>)
DNA metilado convertido com bissulfito (<i>EPItech methylated human control DNA- Qiagen</i>)
DNA desmetilado convertido com bissulfito (<i>EPItech methylated human control DNA - Qiagen</i>)

Já é bem estabelecido que a 5-azacitidina compreenda um agente desmetilante agente desmetilante de diversos genes supressores de tumor. Esta foi utilizada como possível controle positivo desmetilante da região promotora dos genes de interesse

(*RASSF1a* e *RARβ*). O composto 5-azacitidina foi diluído em PBS 1x. Células MCF-7 foram tratadas com 10μM de azacitidina por 72h e 96h, para comparação dos tratamentos com ácido metilselenínico; e por 96h e 120h, para comparação dos tratamentos com selenito de sódio.

5.8 Avaliação do padrão de acetilação de histona H3 no resíduo de lisina K9 (H3K9) e resíduo de lisina K16 em histona H4 (H4K16) e da expressão protéica de DNMT1 de células MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico.

A técnica de “western blot” foi utilizada para se avaliar o padrão de acetilação de histonas H3K9 e K4K16, bem como a trimetilação de H3K9me3, em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 dos grupos células tratadas com ácido metilselenínico comparadas ao grupo controle.

4.8.1 Extração ácida de histonas

Para extração de histonas, cerca de 8×10^6 células/mL de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm, incubadas por 24 horas e então tratadas com ácido metilselenínico, nas respectivas concentrações padronizadas. Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas e coletadas das placas de petri e então transferidas para um tubo falcon. As células foram então, homogeneizadas com 500μL de tampão de lise (10mM HEPES, pH7,9; 1% Triton X-100; 1,5mM $MgCl_2$; 10mM KCl; 5mM butirato de sódio; 0,5mM DTT; 1,5mM PMSF; Protease 1μg/μL; inibidor de fosfatase 1μg/μL) e centrifugados por 5 minutos a 5000g e 4°C. O sobrenadante foi coletado e descartado. Adicionou-se mais 500μL de tampão de lise ao pellet e foi centrifugado por 5 minutos a 5000g e 4°C. O pellet foi homogeneizado com 200 μL de 0.2N HCl, vortexado incubado overnight a (KUROIWA-TRZMIELINA *et al.*, 2009).

Após este período, foi vortexado de 30 em 30 minutos por 3 vezes, centrifugado por 15 minutos a 15.000g e 4°C, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 25 μL de NaOH 2M (pH 7,0).

4.8.2 Extração de proteínas

Para extração de histonas, cerca de 8×10^6 células/mL de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm, incubadas por 24 horas e então tratadas com ácido metilseleninico, nas respectivas concentrações padronizadas. Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas e coletadas das placas de petri e então transferidas para um tubo falcon.

As amostras de histonas e proteínas extraídas foram normalizadas de acordo com o método de quantificação de proteína por Bradford (1976), utilizando-se o reagente Bradford (BioRad) e a curva padrão de albumina (0 a 5000 $\mu\text{g/mL}$). Todos os pontos de concentração de cada grupo foram realizados em duplicata e os dados geraram uma curva padrão para cada concentração analisada foram determinados em triplicata. Utilizou-se cerca de 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína total ou histonas para cada canal. A quantificação foi realizada em leitor de Elisa, no comprimento de onda de 595nm e as amostras armazenadas a -80°C .

4.8.2 'Western Blot' de H3K9 acetilada; H4K16 acetilada ou H3K9 trimetilada (H3K9me3) e DNMT1.

Os extratos de histonas das células MCF-7 tratadas com ácido metilseleninico foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 15% e tampão Tris-glicina 1X, utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (Mini PROTEAN®System, Bio Rad, EUA). Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose Hybond-ECLTM (Amersham Biosciences, EUA), com poro de diâmetro de 0,20 μm , no decorrer de 35 minutos. Para verificar a eficácia da transferência, a membrana foi corada com Ponceau-S (USB, EUA) e em seguida, lavada com PBS (NaCl 137mM; Na_2HPO_4 10mM; KCl 2,68 mM; KH_2PO_4 1,76 mM e água ultra-pura, pH=7,4) e água.

O bloqueio da membrana foi realizado com reagente próprio presente no sistema de quimioluminescência ECL (Enhanced Chemiluminescence, GE Healthcare, Reino Unido), diluído em PBS (1mL de PBS para cada 20mg de ECL) e incubada por 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação.

Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-acetil histona H3K9; ou anti-acetil H4K16 ou anti-trimetil H3K9 (Upstate, EUA) (1:2500); ou anti-DNMT1, diluído em reagente ECL, por uma noite a 4°C. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP anti-imunoglobulina de coelho (GE Healthcare, Reino Unido) na diluição 1:10000 em reagente ECL por 1 hora.

A membrana foi então incubada com anticorpo primário anti-histona H1 (Upstate, EUA) na diluição de 1:500 em reagente ECL por 1 h à 37°C e sob agitação, a qual serviu como controle da técnica. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP anti-imunoglobulina de rato (GE Healthcare, Reino Unido) na diluição 1:10000 em ECL por 1 h, a 37°C e sob agitação. A imunodeteção foi feita utilizando-se o sistema de quimioluminescência ECL. O sinal foi captado utilizando o sistema de aquisição de imagens ImageQuant 400 (GE Healthcare, Reino Unido).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste Brown-Forsythe). Quando analisados dois grupos, foi utilizado o teste paramétrico t student (integridade de membrana plasmática). Quando analisados mais de dois grupos, as comparações foram realizadas com o teste paramétrico de Análise de Variância Unidimensional (One-Way-ANOVA), seguida de teste de Duncan (curvas de proliferação celular) ou Tukey (viabilidade celular ou mecanismos epigenéticos, análises de ciclo celular ou fragmentação de DNA). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 ou 4 experimentos independentes e o nível de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa STATISTICA 8.0 (StatSoft).

7. RESULTADOS

7.1 Padrão de proliferação de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Na Figura 5 ilustra-se a padronização da curva de proliferação celular com diferentes concentrações de células MCF-7 plaqueadas: 1×10^4 ; 2×10^4 ; 5×10^4 ; 1×10^5 ; 2×10^5 e 5×10^5 células/ml. Verificou-se que a concentração de 2×10^5 células/ml, dentre as diferentes concentrações testadas, demonstrou melhor perfil de proliferação das células.

Figura 5. Curva de proliferação celular da linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 (American Type Culture Collection, EUA), em passagem 3. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços em sextuplicata e incubadas nas concentrações de 1×10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 células/mL. Após cada período de incubação (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h), a densidade de células aderidas foi corada com o corante vital cristal violeta e mensurada em leitor de Elisa no comprimento de onda 570nm. A concentração de 2×10^5 células/mL foi padronizada como sendo a melhor concentração para cultivo celular. Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão.

Sendo assim, avaliou-se o efeito inibitório das formas químicas de selênio ácido metilselenínico (MSA) ou selenito de sódio em diferentes doses e tempos de tratamentos, sobre o padrão de proliferação e viabilidade celular da linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

7.2 Curva de proliferação e viabilidade de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico.

Na Figura 6 ilustra-se a curva de proliferação celular obtida com o tratamento de células MCF-7 com MSA. As concentrações de MSA testadas foram padronizadas na faixa entre 1 μ M - 2 μ M (1,0 μ M, 1,3 μ M, 1,6 μ M e 2 μ M) no período de 24h-144h (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h). Uma ação anti-proliferativa dose-tempo dependente do MSA sobre células MCF-7 foi observada. Comparado ao grupo de células não tratadas (GC), 72h de tratamento com 1,6 μ M de MSA inibiu ($p=0,002$) em 35% a proliferação celular, diferindo ($p=0,004$) da concentração de 1,3 μ M após 120h de tratamento. Ao se aumentar estreitamente a concentração de tratamento para 2,0 μ M de MSA, verificou-se uma inibição ($p=0,001$) da proliferação celular em 57% (72h), 51% (96h) e 48,5% (120h), que diferiu ($p=0,002$) apenas da concentração 1,3 μ M de MSA após 96h de tratamento. Comparado ao grupo de células não tratadas, as concentrações de 1,6 μ M ou 2 μ M de MSA nos tempos 24h, 48h ou 144h, bem como as concentrações de 1,0 μ M ou 1,3 μ M, não inibiram significativamente a proliferação de células MCF-7 ($p >0,05$) (Figura 6).

Figura 6. Curva de proliferação de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 (American Type Culture Collection, EUA), em passagem 3, tratadas com ácido metilselenínico (Sigma). Foram plaqueadas 2×10^5 células em placas de 96 poços, incubadas por 24h e então tratadas em 6 tempos (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h) em concentrações distintas: 1,0µM; 1,3µM; 1,6µM e 2,0µM. Como controle, células MCF-7 foram cultivadas com o veículo meio de cultura. Após cada período de incubação, a densidade de células aderidas foi corada com o corante vital cristal violeta e mensurada em leitor de Elisa no comprimento de onda 570nm. Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão; correspondem a quatro experimentos independentes, em sextuplicata. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações de tratamento de 2µM e controle ($p = 0,001$) nos tempos de 72h, 96h e 120h; entre 2µM e 1,3µM ($p = 0,002$) no tempo de 96h; entre 1,6 µM com controle ($p = 0,002$) e 1,3 µM ($p = 0,004$) no tempo de 120h. O tratamento estatístico foi realizado de acordo com o teste ANOVA seguido pelo teste de Duncan.

As distintas concentrações de tratamento de células MCF-7 com MSA no período de 24h – 144h induziu uma ação inibitória dose-dependente, com os percentuais médios de inibição descritos na Tabela 2. Verificou-se ainda um efeito inibitório decrescente das concentrações 1,0µM; 1,3µM e 1,6µM após 96h de tratamento, comparado às 72h de exposição das células com MSA. O efeito inibitório do composto MSA foi reduzido após 120h (19,5%) e 144h (11%) de tratamento com 1,6µM de MSA bem como após 144h (39%) de tratamento com 2µM de MSA. No tratamento por 144h com 1µM de MSA, os valores de proliferação das células MCF-7 apresentaram-se maiores em 4,5%, comparado ao grupo de células não tratadas.

Tabela 2: Valores médios percentuais da inibição de proliferação de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas, comparados ao grupo de células não tratadas, no período de 24h a 144h, com diferentes concentrações de ácido metilselenínico (MSA).

% inibição da proliferação de células MCF-7 após 24h – 144h de tratamento com MSA, comparado ao grupo de células não tratadas						
Concentração	24h	48h	72h	96h	120h	144h
1,0µM	4,5	11,0	10,0	6,0	5,5	-4,5
1,3µM	24,0	23,0	18,0	12,5	9,0	1,5
1,6µM	24,0	35,5	32,0	27,0	19,5	11,0
2,0µM	53,0	59,0	57,0	51,0	48,5	39,0

Foram plaqueadas 2×10^5 células MCF-7 em placas de 96 poços, incubadas por 24h e então tratadas em 6 tempos (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h) em concentrações distintas: 1,0µM; 1,3µM; 1,6µM e 2,0µM. Correspondem a quatro experimentos independentes, em sextuplicata. Valores (-) expressam percentual de proliferação celular maior que o do grupo controle.

Identificou-se assim que após 72h e 96h tratamento, as concentrações dose-tempo dependentes que melhor demonstraram inibição da proliferação de células MCF-7 em cerca de 50% foram 1,6µM ou 2,0µM de MSA, respectivamente.

Assim, com o intuito de melhor caracterizar os seus efeitos inibitórios, avaliou-se o efeito destes compostos nestas concentrações e tempos sobre a viabilidade celular. Na Figura 5 observa-se que pela exclusão de células mortas a partir da incorporação do corante azul de tripan, reafirmou-se a atuação inibitória dose-dependente do composto MSA sobre a viabilidade de células MCF-7. Após 96h de tratamento, a concentração 2µM de MSA reduziu ($p=0,04$) em cerca de 50% o número de células viáveis, mas sem alterações significativas no tempo de 72h. A concentração de 1,6µM não alterou a viabilidade celular nos tempos de 72h ou 96h. No número de células mortas, não foram verificadas diferenças após 72h ($p=0,2$) ou 96h ($p=0,4$) de tratamento com 1,6µM ou 2µM de MSA (Figura 7).

Figura 7. Viabilidade celular da linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratada com ácido metilselenínico e avaliada pelo método de exclusão Azul de tripan. Células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, após 72h e 96h de tratamento com 1,6 μM e 2 μM de ácido metilselenínico. Experimentos realizados em três experimentos independentes. Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise estatística pelo teste ANOVA, seguido do teste de Tuckey. Considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

7.3 Curva de proliferação e viabilidade de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio.

Na Figura 8 ilustra-se a curva de proliferação celular obtida com o tratamento de células MCF-7 com selenito de sódio. As concentrações de selenito testadas foram padronizadas na faixa entre 1 μM - 20 μM (1,0 μM, 2 μM, 5 μM, 8 μM, 10 μM e 20 μM), no período de 24h-144h (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h).

Assim como o MSA, a forma química inorgânica de selênio selenito desempenhou uma ação anti-proliferativa sobre as células MCF-7. Comparado ao grupo de células não tratadas, verificou-se que dentre as concentrações e tempos de tratamentos testados, 8 μM ou 10 μM de selenito de sódio inibiram a proliferação celular em cerca de 50% após 120h e 96h de tratamento, respectivamente (Figura 8). A concentração de 8 μM de selenito de sódio inibiu ($p < 0,05$) em 58% (120h) a proliferação celular (Figura 6), sem diferenças significativas de inibição nos demais tempos de tratamentos.

O tratamento com 10 μ M inibiu a proliferação celular em 46% (96h; $p = 0,001$) e 73% (120h; $p < 0,001$), sem diferenças significativas após 24h, 48h, 72h ou 144h de tratamento. O percentual de inibição da proliferação de células MCF-7 após 96h de tratamento com 10 μ M de selenito diferiu ($p = 0,0001$) dos tratamentos com 1 μ M; 2 μ M; 5 μ M ou 8 μ M.

A concentração de 20 μ M de selenito de sódio não inibiu significativamente a proliferação celular nos tempos de 24h e 48h, mas inibiu a proliferação celular de forma citotóxica em cerca de 66% a partir do tempo de 72h de tratamento, atingindo cerca 90% de inibição no tempo de 144h. As concentrações 1,0 μ M, 2 μ M ou 5 μ M não inibiram significativamente a proliferação celular no período de tratamento de 24h-144h.

Figura 8. Curva de proliferação de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 (*American Type Culture Collection*, EUA), em passagem 3, tratadas com selenito de sódio (*Sigma*). Foram plaqueadas 2×10^5 células em placas de 96 poços, incubadas por 24h e então tratadas em 6 tempos (24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h), com concentrações distintas de selenito de sódio: 1,0 μ M; 2,0 μ M; 5,0 μ M; 8,0 μ M, 10,0 μ M e 20 μ M. Como controle, células MCF-7 foram cultivadas com veículo meio de cultura. Após cada período de incubação, a curva de crescimento celular foi determinada pelo método cristal violeta, com leitura do comprimento de onda 570nm em leitor de Elisa. Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão; correspondem três experimentos independentes, em sextuplicata. *Diferença estatisticamente significante entre a concentração de 10 μ M com o controle; 1 μ M; 2 μ M; 5 μ M e 8 μ M no tempo de 96h ($p = 0,001$); entre a concentração de 8 μ M de selenito de sódio com o controle no tempo de 120h ($p < 0,005$). O mesmo foi observado para o tempo de 120h ($p < 0,001$), não tendo tido diferença entre 10 μ M comparado a 8 μ M. O tratamento estatístico foi realizado de acordo com o teste ANOVA seguido pelo teste de Duncan; $p < 0,05$.

Na Tabela 3 descrevem-se os valores percentuais médios inibitórios de proliferação de células MCF-7 pelas as distintas concentrações de selenito no período de 24h – 144h. As concentrações de 1µM, 2µM e 5µM de selenito apresentaram valores de proliferação de células MCF-7 maiores que os do grupo controle após 48h, 72h e 96h de tratamento.

Tabela 3: Valores médios percentuais de inibição da proliferação de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas, no período de 24h a 144h, com diferentes concentrações de selenito de sódio.

% inibição da proliferação de células MCF-7 após 24h-144h de tratamento com selenito de sódio, comparado ao grupo de células não tratadas.						
Concentração	24h	48h	72h	96h	120h	144h
1µM	-0,2	-4,5	-2,3	-1,7	1,2	3,7
2µM	4,4	-5,0	-3,0	-4,0	4,0	5,3
5µM	3,2	-5,0	-6,5	-6,0	6,7	34,0
8µM	0,8	-4,1	-6,7	14,0	58,0	79,0
10µM	-0,09	-3,9	-5,0	46,0	73,0	80,0
20µM	-4,7	38,5	65,6	77,5	87,0	89,0

Foram plaqueadas 2×10^5 células MCF-7 em placas de 96 poços, incubadas por 24h e então tratadas em 6 tempos (24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h), com concentrações distintas de selenito de sódio: 1,0µM; 2,0µM; 5,0µM; 8,0µM, 10,0µM e 20 µM. Correspondem a três experimentos independentes, em sextuplicata. Valores (-) expressam percentual de proliferação celular maior que o do grupo de células não tratadas.

Identificou-se, assim, que no intervalo de tratamento entre 96h e 120h, as concentrações 8µM ou 10µM de selenito de sódio demonstraram melhor perfil de inibição da proliferação de células MCF-7 em cerca de 50%. Com a avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão de células mortas a partir da incorporação do corante azul de tripan, reforçou-se a atuação inibitória dose-dependente do composto selenito sobre a viabilidade de células MCF-7 (Figura 7). Comparado ao grupo de células não tratadas, 96h de tratamento com 10µM reduziu ($p= 0,03$) o número de células viáveis em 45%.

Após 120h de tratamento com 8 μ M ou 10 μ M o número de células viáveis foi reduzido ($p= 0,001$) em 58,5 e 81,5%, respectivamente. Não foram observadas diferenças no número de células mortas após 96h ($p= 0,3$) ou 120h ($p= 0,08$) de tratamento com 8 μ M ou 10 μ M de selenito de sódio (Figura 9).

Figura 9. Viabilidade celular da linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratada com selenito de sódio e avaliada pelo método de exclusão Azul de tripan. Células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, após 96h e 120h de tratamento com 8 μ M e 10 μ M de selenito de sódio. Experimentos realizados em três experimentos independentes. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise estatística pelo teste ANOVA, seguido do teste de Tuckey. Considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

7.4 Análise da integridade de membrana plasmática e níveis de fragmentação de DNA de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.

A atividade citotóxica dos compostos de selênio investigados em células MCF-7 foi determinada, em citometria de fluxo, pela análise da integridade de membrana plasmática (IMP), utilizando-se o corante permeável à membrana iodeto de propídio (IP). Nos ensaios de avaliação da IMP, consideraram-se as maiores concentrações de tratamento de cada composto de selênio testado: 2 μ M de MSA ou 10 μ M de selenito de sódio.

Na Figura 10 verifica-se que após 72h de tratamento de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 com 2 μ M de MSA, não foi verificada alterações no perfil de integridade de membrana com iodeto de propídio no grupo tratado ($18,55 \pm 2,9$; $p > 0,05$), comparado ao grupo de células não tratadas (GC) ($12,50 \pm 3,15$). Entretanto, após 96h de tratamento com 2 μ M de ácido metilselenínico, verificou-se um aumento ($p = 0,03$) da intensidade de fluorescência de iodeto de propídio ligado ao DNA ($14,73 \pm 0,55$), comparado ao GC ($11,42 \pm 0,89$) (Figura 10). Os resultados sugerem que após 96h de tratamento de células MCF-7 com 2 μ M de MSA, os danos na integridade da membrana plasmática sejam maiores comparado ao tempo de 72h (Figura 10). No Anexo 1 estão apresentados os histogramas obtidos para análise de integridade de membrana plasmática de células MCF-7 tratadas ou não com ácido metilselenínico, por citometria de fluxo.

Figura 10. Análise da integridade de membrana plasmática de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, determinada por citometria de fluxo. Nos experimentos realizados em três experimentos independentes, células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 foram tratadas com 2 μ M de MSA, tendo como controle células MCF-7 tratadas com veículo (meio de cultura). Como branco, células MCF-7 não foram marcadas com iodeto de propídio (IP); e o grupo marcado foi exposto ao corante IP. As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal PEA ($\text{exc.} = 488 \text{ nm}$; $\text{emi.} = 695 \text{ nm}$). Analisados estatisticamente pelo teste t student, considerando-se significativo quando $p < 0,05$.

Nos ensaios conduzidos para análise dos efeitos dos tratamentos com selenito de sódio sobre a integridade de membrana plasmática de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 (Figura 11), não foram verificadas diferenças na integridade de membrana das células MCF-7 após 96h de tratamento com 10 μ M (15,03 $\pm$ 1,6), comparado ao grupo de células não tratadas (13,07 $\pm$ 1,9). Entretanto, após 120h de tratamento com 10 μ M de selenito de sódio, verificou-se um aumento ($p= 0,0007$) da intensidade de fluorescência de iodeto de propídio ligado ao DNA (48,7 $\pm$ 3,75), comparado ao grupo de células não tratadas (12,7 $\pm$ 0,22). Estes dados corroboram os resultados encontrados na análise de proliferação e viabilidade celular, sugerindo que o tratamento de células MCF-7 por 120h com 10 μ M de selenito de sódio apresente propriedades pró-citotóxicas, gerando maiores danos à integridade da membrana plasmática quando comparado às 96h de tratamento com 10 μ M, ou comparado à concentração de 8 μ M no tempo de 120h (Figura 11).

Figura 11. Análise da integridade de membrana plasmática de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio, determinada por citometria de fluxo. Nos experimentos realizados em três experimentos independentes, células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 foram tratadas com 10 μ M de selenito de sódio, tendo como controle células MCF-7 tratadas com veículo (meio de cultura). Como branco, células não foram marcadas com iodeto de propídio (IP); o grupo marcado foi exposto ao corante IP. As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal PEA ($\lambda_{exc.}= 488$ nm; $\lambda_{emi.}=695$ nm). Analisados estatisticamente pelo teste t, considerando-se significativo quando $p < 0,05$.

Na Figura 12, observou-se que após 72h de tratamento com ácido metilselenínico, houve um aumento da fragmentação do DNA ($p= 0,001$), tanto na concentração de $1,6\mu\text{M}$ quanto na concentração de $2\mu\text{M}$, indicando características pró-apoptóticas do MSA na sua ação anti-câncer de mama (Figura 12). Após 96h de tratamento com $1,6\mu\text{M}$ ou $2\mu\text{M}$ de MSA, não foi verificada diferença no padrão de fragmentação do DNA, comparado ao grupo de células não tratadas (valor de $p= 0,07$) (Figura 12). No Anexo 3 estão apresentados os histogramas obtidos por citometria de fluxo para análise de fragmentação do DNA de células MCF-7, tratadas ou não com ácido metilselenínico.

Figura 12. Análise dos níveis de fragmentação de DNA de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas ácido metilselenínico, determinada por citometria de fluxo. Os níveis de fragmentação de DNA foram determinados a partir da mensuração da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (IP) ligado ao DNA, obtidos por citometria de fluxo, em células de adenocarcinoma mamário humano após 72h e 96h de tratamento com $1,6\mu\text{M}$ e $2\mu\text{M}$ de ácido metilselenínico. Dados de três experimentos independentes. As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal PEA ($\text{exc.} = 488 \text{ nm}$; $\text{emi.} = 695 \text{ nm}$). Analisados estatisticamente pelo teste ANOVA seguido de Tuckey, considerando-se significativo quando $p < 0,05$.

Na Figura 13 verifica-se que comparado ao grupo de células não tratadas, 96h de tratamento de células MCF-7 com 10 μ M de selenito de sódio aumentou ($p= 0,01$) a fragmentação do DNA, indicando que a apoptose possa estar envolvida em sua atividade anticarcinogênica. Já no tempo de 120h 8 μ M ou 10 μ M de selenito não alteraram os níveis de fragmentação do DNA ($p= 0,4$) (Figura 13). No Anexo 4 estão apresentados os histogramas obtidos por citometria de fluxo para análise de fragmentação do DNA de células MCF-7, tratadas ou não com selenito de sódio.

Figura 13. Análise dos níveis de fragmentação de DNA de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas selenito de sódio, determinada por citometria de fluxo. Os níveis de fragmentação de DNA foram determinados a partir da mensuração da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (IP) ligado ao DNA, obtidos por citometria de fluxo, em células de adenocarcinoma mamário humano após 96h e 120h de tratamento com 8 μ M e 10 μ M de selenito de sódio. Dados de três experimentos independentes. As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal PEA ($\text{exc.} = 488 \text{ nm}$; $\text{emi.} = 695 \text{ nm}$). Analisados estatisticamente pelo teste ANOVA seguido de Tuckey, considerando-se significativo quando $p < 0,05$.

Logo, com o intuito de se caracterizar o tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com MSA ou selenito em células MCF-7, conduziram-se as análises por citometria de fluxo com marcação dupla em anexina V e IP, apresentados a seguir.

7.5 Caracterização do tipo de morte celular por análise em citometria de fluxo com marcação dupla de anexina e IP.

Ilustra-se a seguir o tipo de morte celular induzida em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico (Figura 14) ou selenito de sódio (Figura 15), determinada em citometria de fluxo por dupla marcação (anexina V-iodeto de propídio). Verificou-se que as formas químicas de Se foram capazes de influenciar a distribuição das fases do ciclo celular, aumentando a proporção de células na fase G2/M e reduzindo a proporção delas nas fases G0/G1 e S. O tratamento por 96h com 1,6 μ M ou 2 μ M de MSA induziu a parada ($p=0,001$) na fase S e aumentou a proporção de células na fase G2/M. Após 120h com 10 μ M de SS, verificou-se indução de parada na fase G0/G1 e aumento da proporção de células na fase G2/M.

Figura 14. Análise do tipo de morte celular induzida em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, determinada em citometria de fluxo por dupla marcação de fosfatidilserina-DNA com anexina V-iodeto de propídio. Porcentagem de células viáveis (Anexina e IP negativas); células apoptóticas iniciais (anexina positivas); células apoptóticas tardias (anexina e IP positiva); necrose (IP positiva) após análise por citometria de fluxo. Células foram analisadas após 72h ou 96h de tratamento com 1,6 μ M ou 2 μ M de ácido metilselenínico. Canal PerCP-A/FITC-A (530/30 nm; 585/42nm). Dados de três experimentos independentes, expressos com média $\pm$ desvio padrão, analisados por ANOVA seguido de Tuckey; nível de significância $p < 0,05$.

Figura 15. Análise do tipo de morte celular induzida em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio, determinada em citometria de fluxo por dupla marcação de fosfatidilserina-DNA com anexina V-iodeto de propídio. Porcentagem de células viáveis (Anexina e IP negativas); células apoptóticas iniciais (anexina positivas); células apoptóticas tardias (anexina e IP positiva); necrose (IP positiva) após análise por citometria de fluxo. Células foram analisadas após 96h ou 120h de tratamento com 8µM ou 10µM de selenito de sódio. Como controle positivo para apoptose, células foram tratadas por 96h e 120h com 5% de DMSO em meio de cultura. Canal PerCP-A/FITC-A (530/30 nm; 585/42nm). Dados de três experimentos independentes, expressos com média $\pm$ desvio padrão, analisados por ANOVA seguido de Tuckey; nível de significância $p < 0,05$.

Na tabela 4 estão descritos os valores eventos percentuais de células marcadas com FITC-anexinaV e/ou IP, caracterizando a viabilidade e os tipos de mortes celulares induzidas em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 72h ou 96h de tratamento com 1,6-2µM de ácido metilselenínico.

Tabela 4. Progressão de eventos percentuais dos tipos de morte celular induzida em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 72h ou 96h de tratamento com 1,6-2 μ M de ácido metilselenínico, determinada por citometria de fluxo.

Células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 72h de tratamento com ácido metilselenínico								
Grupo	Células Viáveis		Apoptose inicial		Apoptose tardia		Necrose	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
CTR	95,2	8,13	0,9	0,2	0,8	0,1	0,8	0,3
1,6 μ M	78,6	0,10	5,6	1,9	7,7	1,4	7,9	3,0
2 μ M	80,8	1,12	7,1	1,7	7,2	0,78	5,4	3,5
Células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 96h de tratamento com ácido metilselenínico								
Grupo	Células Viáveis		Apoptose inicial		Apoptose tardia		Necrose	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
CTR	86,2	1,8	0,05	0,02	7,4	0,8	7,4	0,8
1,6 μ M	62,9	0,9	0,1	0,01	22,0	1,3	22,0	1,3
2 μ M	69,1	3,2	0,3	0,03	18,0	3,5	18,0	3,5
DMSO 5%	0,9	0,2	69,9	2,3	0,3	1,0	0,3	1,0

Células viáveis (Anexina e IP negativas); Apoptose inicial (anexina positivas); Apoptose tardia (anexina e IP positiva); Necrose (IP positiva). DMSO 5%: controle positivo para apoptose.

Na Tabela 5 estão descritos os valores eventos percentuais de células marcadas com FITC-anexinaV e/ou IP, caracterizando a viabilidade e os tipos de mortes celulares induzidas em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 96h ou 120h de tratamento com 1,6-2 μ M de ácido metilselenínico.

Tabela 5. Progressão de eventos percentuais dos tipos de morte celular induzida em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 96h ou 120h de tratamento com 8-10 μ M de selenito de sódio, determinada por citometria de fluxo.

Células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 96h de tratamento com selenito de sódio								
Grupo	Viáveis		Apoptose inicial		Apoptose tardia		Necrose	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
CTR	86,2	2,47	0,05	0,02	7,4	0,8	6,2	1,2
8 μ M	62,6	3,78	0,1	0,07	14,6	8,5	22,7	8,1
10 μ M	62,5	3,47	0,1	0,01	8,4	8,4	29,0	5,0
DMSO 5%	59,2	2,4	19,0	1,2	0,6	0,2	21,3	4,3
Células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 120h de tratamento com selenito de sódio								
Grupo	Viáveis		Apoptose inicial		Apoptose tardia		Necrose	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
CTR	92,4	3,5	0,02	0,01	0,2	0,02	1,6	0,3
8 μ M	82,3	4,7	0,1	0,1	2,8	1,5	14,8	3,6
10 μ M	83,0	3,0	0,2	0,1	2,4	0,6	14,3	3,7
DMSO 5%	0,9	0,1	70,0	0,6	0,3	0,8	28,8	1,6

Células viáveis (Anexina e IP negativas); Apoptose inicial (anexina positivas); Apoptose tardia (anexina e IP positiva); Necrose (IP positiva). DMSO 5%: controle positivo para apoptose.

7.6 Efeitos dos compostos de selênio sobre a distribuição das fases do ciclo celular de células MCF-7.

Para se avaliar possíveis alterações promovidas pelos compostos ácido metilselenínico ou selenito de sódio na progressão do ciclo celular em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, conduziu-se os experimentos de citometria de fluxo.

Após 72h de tratamento de células MCF-7 com 2 μ M de MSA, a proporção de células tratadas aumentou na fase G2/M (22,2% x 19,1% controle; $p=0,02$), mas não foram encontradas alterações nas fases G0/G1 (69,9% x 72,1% controle; $p=0,06$) e S (7,6% x 8,6% controle; $p=0,18$). O tratamento por 72h com 1,6 μ M de MSA não alterou a distribuição das fases do ciclo celular ($p>0,05$).

Após 96h de tratamento com MSA, 2 μ M reduziu a proporção de células nas fases G0/G1 e S (8,7% x 11,2% controle; $p = 0,01$), e aumentou na fase G2/M (23,2% x 16,3% controle; $p = 0,04$). A concentração de 1,6 μ M reduziu (8,2% x 11,2% controle; $p = 0,01$) a proporção de células na fase S; sem alterações na distribuição das fases G1/0 e S (Figura 16).

Figura 16. Distribuição das fases do ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, determinada em citometria de fluxo. Dados de 3 experimentos independentes. Após 72h e 96h de tratamento com 1,6 μ M e 2 μ M de ácido metilselenínico, o percentual de eventos de células nas respectivas fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) foram determinadas pela marcação com iodeto de propídio. As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal PEA ($\text{exc.} = 488 \text{ nm}$; $\text{emi.} = 695 \text{ nm}$). Analisados estatisticamente por ANOVA seguido de Tukey, considerando-se significativo quando $p < 0,05$.

Na Tabela 6 estão descritos os valores de eventos percentuais de fases do ciclo celular em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 72h ou 96h de tratamento com 1,6-2 μ M de ácido metilselenínico, determinados por citometria de fluxo.

Tabela 6. Progressão de eventos percentuais de fases do ciclo celular em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 72h ou 96h de tratamento com 1,6-2 μ M de ácido metilselenínico, determinada por citometria de fluxo.

<i>Fases (Ciclo celular)</i>	<i>Tratamentos de células MCF-7 com Ácido Metilselenínico</i>					
	72h			96h		
	Controle	1,6μM	2μM	Controle	1,6μM	2μM
<i>Sub</i>	4,3 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 0,6*	8,3 $\pm$ 0,6*	7,0 $\pm$ 0,3	5,6 $\pm$ 1,3	8,6 $\pm$ 0,7
<i>GI[#]</i>						
<i>G0/G1</i>	72,1 $\pm$ 0,7	73,5 $\pm$ 1,3	69,9 $\pm$ 1,2	75 $\pm$ 1,6	71,9 $\pm$ 1,3	67,7 $\pm$ 2,2*
<i>S</i>	8,6 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,3	7,6 $\pm$ 0,9	11,2 $\pm$ 0,6	8,2 $\pm$ 0,8*	8,7 $\pm$ 0,8*
<i>G2/M</i>	19,1 $\pm$ 0,6	19 $\pm$ 1,3	22,2 $\pm$ 0,3*	16,3 $\pm$ 1,7	19,7 $\pm$ 2,0	23,2 $\pm$ 1,7*

*Dados estatisticamente significantes, comparados aos grupos controle. [#] Fragmentação de DNA.

Após 96h de tratamento de células MCF-7 com 10 μ M de selenito de sódio, verificou-se uma redução na proporção de células tratadas na fase G0/G1 (70% x 75% controle; $p=0,01$), e aumento na fase G2/M (17,9% x 13,7% controle; $p=0,02$); sem alterações significativas na fase S (11,8% x 11,2% controle; $p=0,13$). Os tratamentos por 96h com 8 μ M de selenito de sódio não alteraram ($p>0,05$) a distribuição das fases do ciclo celular, comparado ao grupo de células não tratadas. Entretanto, após 120h de tratamento com 10 μ M de selenito de sódio, a proporção de células manteve-se reduzidas em G0/G1 (70,3% x 75% controle; $p=0,01$) e aumentadas G2/M (17,9% x 13,7% controle; $p=0,03$) (Figura 17).

Figura 17. Distribuição das fases do ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio, determinada em citometria de fluxo. Dados de três experimentos independentes. Após 96h e 120h de tratamento com 8µM e 10µM de selenito de sódio, o percentual de eventos de células nas respectivas fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) foram determinadas pela marcação com iodeto de propídio em citômetro. As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal PEA ($\text{exc.} = 488 \text{ nm}$; $\text{emi.} = 695 \text{ nm}$). Analisados estatisticamente por ANOVA seguido de Tukey, considerando-se significativo quando $p < 0,05$.

Na Tabela 7 estão descritos os valores de eventos percentuais de fases do ciclo celular em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 96h ou 120h de tratamento com 8-10µM de selenito de sódio, determinados por citometria de fluxo.

Tabela 7. Progressão de eventos percentuais de fases do ciclo celular em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 após 96h ou 120h de tratamento com 8-10µM de selenito de sódio, determinada por citometria de fluxo.

<i>Tratamentos de células MCF-7 com Selenito de sódio</i>						
<i>Fases (Ciclo celular)</i>	96h			120h		
	Controle	8uM	10uM	Controle	8uM	10uM
<i>Sub G1[#]</i>	4,6 ± 0,6	5,0 ± 0,4	6,6±0,2*	3,7 ± 0,3	3,4 ± 0,5	5,9 ± 3,0
<i>G0/G1</i>	75 ± 0,5	72 ± 1,4	70 ± 0,7*	79,5 ± 0,5	82,8 ± 4,8	80,4 ± 9,3
<i>S</i>	11,2 ± 0,6	12,3 ± 0,3	11,8 ± 0,1	7,8 ± 2,2	8,8 ± 0,9	10 ± 2,8
<i>G2/M</i>	13,7 ± 0,9	15,3 ± 1,4	17,9 ± 0,7*	38,2 ± 2,5	38,7 ± 2,6	31,6 ± 1,4*

*Dados estatisticamente significantes, comparados aos grupos controle. [#] Fragmentação de DNA.

7.7 Selênio e mecanismos epigenéticos

No câncer de mama alterações epigenéticas são frequentemente encontradas (RODRÍGUEZ-PAREDES; ESTELLER, 2011). Entretanto, os mecanismos envolvidos em nível celular e molecular sobre a modulação de eventos epigenéticos no câncer, inclusive câncer de mama, é pouco esclarecido (SU *et al.*, 2011).

7.7.1 Avaliação do padrão de metilação global do DNA de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.

O tratamento de células MCF-7 por 96h com 1,6µM ou 2µM de MSA (Figura 18) não alteraram o padrão de metilação global do DNA ($p > 0,05$).

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Figura 18. Análise dos níveis percentuais de metilação global do DNA em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico. Níveis percentuais de 5-mdC em DNA genômico de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 foram quantificadas em HPLC-DAD após 96h de tratamento com 1,6 µM e 2 µM de ácido metilselenínico. Dados de três experimentos independentes, apresentados em percentual como média $\pm$ desvio padrão. Analisados estatisticamente pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, considerando-se $p < 0,05$.

O tratamento de células MCF-7 por 96h ou 120h com 8µM ou 10µM de selenito de sódio (Figura 19) não alteraram o padrão de metilação global do DNA ($p > 0,05$).

Figura 19. Análise dos níveis percentuais de metilação global do DNA em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio. Níveis percentuais de 5-mdC em DNA genômico de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 foram quantificadas em HPLC-DAD após 96h e 120h de tratamento com 8µM e 10µM de selenito de sódio. Dados de três experimentos independentes, apresentados em percentual como média $\pm$ desvio padrão. Analisados estatisticamente pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Tuckey, considerando-se $p < 0,05$.

7.7.2 Expressão quantitativa do gene supressor de tumor *RASSF1A* de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.

Na quantificação da expressão do gene *RASSF1a*, não foi verificada alteração significativa, após 72h e 96h de tratamento de células MCF-7 com 1,6 μ M e 2 μ M de ácido metilselenínico (Figura 20).

Figura 20. Análise quantitativa do padrão de expressão do gene *RASSF1a* em células de adenocarcinoma humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico. Dados de três experimentos independentes. OS valores médios de CT normalizados do gene *RASSF1a* em relação ao gene controle endógeno GAPDH de células MCF-7 após 72h e 96h de tratamento com ácido metilselenínico foram determinados pela técnica quantitativa qPCR. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA, seguido pelo teste de Tuckey. Considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Na Figura 21 verifica-se que o tratamento com 10 μ M de selenito de sódio aumentou ($p < 0,05$) a expressão do gene *RASSF1a* em cerca de 45%, após 120h de tratamento, sem alterações significativas no tempo de 72h ($p > 0,05$). Em ambos os tempos de tratamento com 8 μ M de selenito de sódio, não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Figura 21. Análise quantitativa do padrão de expressão do gene em células de adenocarcinoma humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio. Dados de três experimentos independentes. OS valores médios de CT normalizados do gene *RASSF1a* em relação ao gene controle endógeno GAPDH de células MCF-7 96h e 120h de tratamento com selenito de sódio foram determinados pela técnica quantitativa qPCR. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA, seguido pelo teste de Tuckey. Considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. (a) Estatisticamente significativo comparado grupo controle. (b) estatisticamente significativo comparado ao tratamento de 8µM.

7.7.3 Padrão de metilação das regiões promotoras dos genes para *RASSF1A* e *RARβ* após tratamento de células MCF-7 com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.

Na Figura 22, observa-se que o gene *RASSF1a* encontra-se silenciado epigeneticamente por hipermetilação de sua região promotora em células MCF-7. Nos resultados obtidos, os tratamentos com ácido metilselenínico não alteraram seu padrão de metilação. O tratamento com 10µM de azacitidina por 72h ou 96h também não alterou o padrão de metilação deste gene. (Figura 22).

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Figura 22. Análise do padrão de metilação da região promotora do gene supressor de tumor RASSF1a em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselelnínico, determinada por MS-PCR. Experimentos em duplicata de células MCF-7 após 72h e 96h de tratamento com 1,6μM ou 2μM de ácido metilselelnínico. Amplificação com primers específicos para sequência não metilada (U) ;Amplificação com primers específicos para sequência metilada (M); (P) Padrão molecular.. *Controles: EIPtech Human DNA control (1) Unmethylated; (2) Methylated bisulfited converted; (3)Unmethylated bisulfite converted.

Na Figura 23 pode ser observado que a região do gene supressor de tumor *RARβ* encontrava-se predominantemente metilada tanto no grupo de células MCF-7 não tratadas, como após 72h e 96h de tratamento com 1,6μM ou 2μM de MSA. O tratamento com 10μM de azacitidina por 96h ou 120h também não alterou o padrão de metilação deste gene.

Figura 23. Análise do padrão de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *RARβ* em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselelnínico, determinada por MS-PCR. Experimentos em duplicata de células MCF-7 após 72h e 96h de tratamento com 1,6μM ou 2μM de ácido metilselelnínico. Amplificação com primers específicos para sequência não metilada (U) ;Amplificação com primers específicos para sequência metilada (M); (P) Padrão molecular.. *Controles: Epitech Human DNA control (1) Unmethylated; (2) Methylated bisulfited converted; (3)Unmethylated bisulfite converted.

Na Figura 24, observa-se que o gene *RASSF1a* encontra-se silenciado epigeneticamente por hipermetilação de sua região promotora em células MCF-7. Nos resultados obtidos, os tratamentos com selenito de sódio não alteraram seu padrão de metilação (Figura 24). O tratamento com 10 μ M de azacitidina por 96h ou 120h também não alterou o padrão de metilação deste gene.

Figura 24. Análise do padrão de metilação da região promotora do gene supressor de tumor RASSF1a em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio determinada por MS-PCR. Experimentos em duplicata de células MCF-7 após 96h e 120h de tratamento com 8 μ M ou 10 μ M de ácido metilselelnínico. Foi utilizado ainda como possível agente desmetilante com 10 μ M de 5-azacitidina por 96h e 120h de tratamento. Amplificação com primers específicos para sequência não metilada (U); Amplificação com primers específicos para sequência metilada (M); (P) Padrão molecular.. *Controles: EpiTech Human DNA control (1) Unmethylated; (2) Methylated bisulfite converted; (3) Unmethylated bisulfite converted.

Na Figura 25 pode ser observado que a região do gene supressor de tumor *RAR β* encontrava-se predominantemente metilada tanto no grupo de células MCF-7 não tratadas, como após 72h e 96h de tratamento com 1,6 μ M ou 2 μ M de MSA. Nos grupos tratados com 10 μ M de azacitidina por 96h ou 120h, a intensidade das bandas dos primers específicos para sequência não metilada estavam mais intensas, comparado ao grupo controle de células não tratadas, agindo como um bom controle de agente desmetilante da região promotora de *RAR β* em células MCF-7.

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Figura 25. Análise do padrão de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *RARβ* em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com selenito de sódio determinada por MS-PCR. Experimentos em duplicata de células MCF-7 após 96h e 120h de tratamento com 8μM ou 10μM de ácido metilselenínico. Foi utilizado ainda como possível agente desmetilante com 10μM de 5-azacitidina por 96h e 120h de tratamento. Amplificação com primers específicos para sequência não metilada (U); Amplificação com primers específicos para sequência metilada (M); (P) Padrão molecular.. *Controles: Eptech Human DNA control (1) Unmethylated; (2) Methylated bisulfited converted; (3) Unmethylated bisulfite converted.

7.7.4 Padrão de metilação de histona H3K9; acetilação de histonas H3K9 e H4K16 de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico.

Tanto a concentração de 1,6μM quanto 2μM de MSA reduziram ($p < 0,05$) os níveis de acetilação de H3K9 e metilação de H3K9me3 após 72h de tratamento. Após 96h, 2μM reduziu os níveis de metilação da H3K9me3, sem alterações significativas com 1,6μM. Os níveis de acetilação de H4K16 aumentaram ($p < 0,05$) após 96h de tratamento com 1,6μM ou 2μM de MSA, e não foram observadas diferenças significativas após 72h de tratamento com 1,6μM ou 2μM de MSA (Figura 26).

Figura 26. Análise do padrão de acetilação (H3K9ac) e trimetilação (H3K9me3) de resíduos de lisina 9 em histona H3 e de acetilação de resíduos de lisina 16 em histona H4 (H4K16ac) em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico, determinado por Western Blotting. (A) Imagens obtidas pela técnica de *Western Blotting* de células MCF-7 não tratadas ou após 72h ou 96h de tratamento com 1,6 ou 2μM de ácido metilselenínico. Dados de três experimentos independentes, com análise dos níveis de acetilação e trimetilação de resíduos de lisina K9 em histona H3; níveis de acetilação de resíduos de lisina K16 em histona H4. (B) Representação gráfica das análises quantitativa dos níveis de acetilação de resíduos de lisina K9 ou K16 em histonas H3 (H3K9ac) e H4 (H4K16ac), respectivamente; níveis de trimetilação de resíduos de lisina K9 em histona H3 (H3K9me3) em células de adenocarcinoma humano após 72h e 96h de tratamento com 1,6μM ou 2μM de ácido metilselenínico. Como controle, células MCF-7 foram cultivadas com meio de cultura. Os dados estão expressos em valores médios percentuais $\pm$ desvio padrão; foram submetidos ao teste de ANOVA, seguido pelo teste de Tuckey. Considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

7.7.5 Padrão de expressão de enzimas DNA metiltransferases 1 (DNMT1) de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio.

Na Figura 27(A) observa-se que tanto após 72h ou 96h de tratamento de células MCF-7 com MSA, a expressão da enzima DNMT1 foi significativamente reduzida. O tratamento por 72h das células com 1,6 μ M ou 2 μ M reduziu em 50% ($p= 0,001$) e 60% ($p= 0,0007$), respectivamente, a expressão da enzima. Após 96h de tratamento, a expressão foi reduzida tanto na concentração de 1,6 μ M (56,2%; $p= 0,04$) e quanto com 2 μ M (88,2%; $p= 0,008$) de MSA. Não foram observadas diferenças entre as concentrações de MSA testadas sobre a expressão de DNMT1, tanto após 72h ($p= 0,43$) quanto após 96h de tratamento ($p= 0,20$).

Na figura 27(B) observa-se também a redução do padrão de expressão da enzima DNMT1 após tratamento de células MCF-7 com selenito de sódio. O tratamento por 96h de células MCF-7 com 8 μ M de selenito demonstrou uma tendência de redução da expressão de DNMT1 em 58,4% ($p= 0,06$). Após 120h de tratamento com 8 μ M de selenito a expressão da enzima foi reduzida em 75,8% ($p= 0,0002$). O tratamento com 10 μ M de selenito reduziu a expressão de DNMT1 em células MCF-7 tanto após 96h (73,4%; $p= 0,03$) quanto após 120h (93,7%; $p=0,0002$) de tratamento. No tempo de 120h, a concentração de 10 μ M de selenito diferiu ($p= 0,001$) da concentração de 8 μ M na redução da expressão da enzima DNMT1.

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Figura 27. Análise do padrão de expressão protéica da enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1) em células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico ou selenito de sódio, determinado por Western Blotting. Representação gráfica das análises quantitativas da expressão da enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1) em células de adenocarcinoma humano após 72h e 96h de tratamento com 1,6µM ou 2µM de ácido metilselenínico. Como controle, células MCF-7 foram cultivadas com o veículo (meio de cultura DMEM, soro fetal bovino 10%). Imagens obtidas pela técnica de *Western Blotting* de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 não tratadas ou após 72h (A1) ou 96h (A2) de tratamento com 1,6 ou 2µM de ácido metilselenínico; ou 96h (B1) ou 120h (B2) de tratamento com selenito de sódio. Dados de três experimentos independentes, com análise da expressão percentual da enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1). Os dados estão expressos em valores médios percentuais $\pm$ desvio padrão; foram submetidos ao teste de ANOVA, seguido pelo teste de Tuckey. Considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

8. DISCUSSÃO

No câncer de mama um conjunto de aspectos hormonais, genéticos e epigenômicos estão envolvidos em sua etiologia, progressão e prognóstico (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007; WHO, 2012). Cerca de 70% dos casos de câncer de mama são diagnosticados como positivos para o receptor de estrógeno, hormônio que propicia significativamente a proliferação e tumorigenicidade de células epiteliais mamárias (PATHIRAJA; STEARNS; OESTERREICH, 2010; PUTNIK *et al.*, 2012). Entretanto, apesar de a terapia hormonal repercutir com benefícios bem documentados contra o câncer de mama, sua incidência vem crescendo mundialmente (WHO, 2012). Cerca de 25% dos pacientes que respondem à terapia apresentam recorrência da doença, bem como ainda se verifica um aumento pronunciado de neoplasias mamárias agressivas ainda em mulheres jovens (PATHIRAJA; STEARNS; OESTERREICH, 2010; TEEGARDENA; ROMIEUA; LELIÈVRE, 2012; WHO, 2012).

Ressalta-se, assim, considerável interesse público em novas estratégias voltadas para prevenção e intervenção terapêutica no controle da carcinogênese mamária, onde o padrão de expressão gênica envolvido em processos de proliferação, diferenciação e morte celular estão frequentemente desregulados (ONG; MORENO; ROSS, 2011). Atribui-se aos diversos nutrientes presentes nos alimentos, inclusive ao micronutriente essencial selênio, ação anti-câncer potencial (WCRF/AICR, 2007; SUZANA *et al.*, 2009; HARRIS; BERGKVIST; WOLK, 2012; TEEGARDENA; ROMIEUA; LELIÈVRE, 2012).

Evidências experimentais em modelos animais bem como em ensaios clínicos humanos, identificam correlações inversamente significativas entre a ingestão dietética de selênio com as taxas de mortalidades de diferentes tipos de câncer humano, incluindo de mama (SCHRAUZER *et al.*, 1977; SU *et al.*, 2011). Resultados controversos, todavia, foram recentemente levantados no que diz respeito à sua atividade anti-câncer. Foi observado que a suplementação com o micronutriente selênio pode favorecer a quimioprevenção do risco para câncer em indivíduos com deficiência, mas não entre aqueles com ingestão e status adequados para o micronutriente. Verificou-se ainda que a suplementação com selênio de indivíduos com níveis basais adequados de selênio pode

aumentar o risco de desenvolvimento de câncer, bem como outras doenças crônicas, como o *diabetes mellitus tipo II*. Destaca-se assim que a atuação promissora do selênio no câncer, seja ao nível individual ou populacional, depende do tipo de neoplasia, status nutricional e forma química do micronutriente, bem como variações genômicas e/ou genéticas (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011).

Merece destaque, assim, investigações em modelos *in vitro* de câncer de mama que elucidem os exatos mecanismos inibitórios das diferentes formas químicas de selênio aos níveis celulares e moleculares (HESKETH, 2008). Principalmente no que compete aos fatores primários de tratamento que precisam ainda ser esclarecidos. Incluem-se as formas químicas de selênio, suas respectivas doses inibitórias e tempos de administração efetivos para se atingir os efeitos celulares e moleculares esperados (ONG; MORENO; ROSS, 2011).

Os dados obtidos aqui somam à comunidade científica informações para esta lacuna de conhecimento. As distintas formas químicas de selênio, ácido metilselenínico e selenito de sódio, exerceram atividade anti-câncer potencial sobre o modelo *in vitro* de neoplasia de mama MCF-7 ER+. Com distintas ações inibitórias de proliferação e viabilidade celular, sugeriram mecanismos aos níveis celulares e moleculares diferenciados. Sabe-se que uma importante meta no manejo endócrino do câncer de mama é aumentar a proporção de células submetidas à morte por apoptose associadas à parada do ciclo celular, evitando que as células entrem novamente no ciclo celular e resultem numa recorrência da doença (SHAH *et al.*, 2005). A indução apoptótica de células de carcinoma de mama pode representar assim um mecanismo potencial da atividade anti-câncer de compostos de selênio.

Foi assim investigado, por análise em citometria de fluxo, mecanismos de destaque envolvidos na indução de apoptose por selênio: fragmentação de DNA e marcação com anexina que reconhece moléculas de fosfatidilserina exposta na membrana das células quando estão sofrendo apoptose. A análise combinada do conteúdo de DNA e antígenos de membrana através da citometria de fluxo permite diferenciar células vivas, apoptóticas e em necrose (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2010; ZARITSKAYA *et al.*, 2010). IP, que promove fluorescência vermelha-alaranjado, em combinação com anticorpo conjugado ao fluorocromo FITC, que promove fluorescência verde, têm sido amplamente utilizados (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2010).

A anexina-V possui alta afinidade de ligação a fosfatidilserina, que é um fosfolípido de membrana, o qual é externalizado sob indução de apoptose (ZARITSKAYA *et al.*, 2010). Quando a integridade de membrana está comprometida, o IP entra na célula, se intercala a dupla fita de DNA, levando a uma emissão de fluorescência proporcional ao conteúdo de DNA na célula, caracterizando a citotoxicidade (GLOMSKI *et al.*, 2002).

Os tratamentos com MSA favoreceram a morte de células MCF-7, onde predominaram propriedades apoptóticas, diante do aumento do nível de fragmentação de DNA, reduzida ruptura de membrana plasmática associada com a elevada exposição de fosfatidilserina. Desta forma, os efeitos inibitórios do MSA sobre crescimento celular parecem não ser exercidos por mecanismos citotóxicos como identificado nos tratamentos com a forma química inorgânica selenito. Este, por outro lado, acompanhou suas propriedades citotóxicas sustentadas na literatura. O selenito pareceu não controlar a proliferação de células de câncer de mama MCF-7 por mecanismos apoptóticos, mas sim por mecanismos citotóxicos e indução de morte por necrose. Apesar de ter aumentado o nível de fragmentação do DNA, aumentou a positividade de ligação de DNA ao iodeto de propídio, com indução de apoptose tardia (necrose). Efeitos tóxicos do selênio podem representar um problema se utilizados em doses elevadas e necessárias para prevenção do câncer (ZHAO *et al.*, 2009). No contexto da progressão da carcinogênese mamária, entretanto, a toxicidade do selênio poderia ser considerada um ponto positivo se fosse seletiva para as células neoplásicas de mama somente, não prejudicando células normais.

Outros achados relatados na literatura apontam que em linhagens de câncer, incluindo-se de pulmão, cabeça e de pescoço são substancialmente mais sensíveis ao selenito e propícios à indução de apoptose do que células de câncer de mama MCF-7 (SUZUKI *et al.*, 2010). Em células neoplásicas de mama MDA-MB231 com capacidade metastática o metabólito ácido metilselenínico exerceu efeitos anti-tumorais, inibindo vias de vascularização (WU *et al.*, 2012). Em linhagens de células pré-malignas de mama humana MCF10AT1 e MCF10AT3B, por outro lado, observou-se também uma inibição do crescimento celular e indução de apoptose pelo MSA, com efeitos similares aos encontrados aqui em câncer de próstata e de pulmão (SHAH *et al.*, 2005).

Estudos prévios têm sugerido ainda que o papel anticarcinogênico do selênio em várias linhagens neoplásicas dá-se pela indução de apoptose associada à parada do ciclo celular mediada pela liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequente danos ao DNA (LI *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2010).

Células neoplásicas apresentam-se em constante proliferação celular com grande proporção de células na fase S e G2/M (TYSON *et al.*, 2011). A eficiência de um composto bioativo de alimento no controle do câncer pode ser avaliada através da sua capacidade de bloquear o ciclo celular nas fases G0/G1 e G2/M, reduzindo a proporção de células em fase S (YAO *et al.*, 2011). Neste sentido, somado aos achados aqui apresentados de que os compostos de selênio ácido metilselenínico e selenito de sódio inibiram a proliferação e viabilidade celular de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, verificou-se que estes compostos bioativos também interferiram na distribuição de fases do ciclo celular.

MSA ou selenito foram capazes de induzir a parada do ciclo celular, aumentando a proporção de células na fase G2/M e reduzindo-a nas fases G0/G1 e S. Nenhum trabalho avaliou o efeito desses compostos na distribuição das fases do ciclo celular em células MCF-7. Em células de câncer de próstata DU145, o tratamento por 24h com 3 μ M de MSA levou a uma importante parada do ciclo em fase G1. Enquanto a exposição das células com concentrações maiores levaram não somente a parada em G1, mas também fragmentação de DNA. O tratamento com selenito de sódio na faixa de concentração 5-10 μ M tende a acumular células de câncer de cólon HCT-16 em fase G2, acompanhado pelo aumento da fragmentação de DNA (KRÁLOVÁ *et al.*, 2009). Em células de câncer de próstata LNCaP e PC3, o tratamento por 24h com 3,5 μ M de selenito induziu a morte celular por apoptose, mas sem induzir a parada do ciclo celular, com um discreto aumento de células na fase G2/M (ZHAO *et al.*, 2009).

Embora a especiação dos metabólitos efetivos dentro das células não tenha sido determinada, os resultados encontrados na presente investigação corroboraram os dados encontrados na literatura em que o selênio tem demonstrado induzir a morte celular por apoptose em células neoplásicas *in vitro* com eficácia dependente de suas formas químicas (GABEL-JENSEN; LUNØE K; GAMMELGAARD, 2010). Sabe-se ainda que o metabólito intermediário monometilado metilselenol, crítico das ações

anticarcinogênicas do selênio, é gerado a partir do metabolismo de formas químicas de selênio. Entretanto, dados sobre a sua identificação e mensuração em amostras de mamíferos ainda não foram publicados. A razão para isto é que é altamente reativo e, portanto, difícil de ser detectado. Compostos de selênio que são capazes de produzi-lo diretamente são considerados mais eficientes (GABEL-JENSEN; LUNØE K; GAMMELGAARD, 2010), com destaque para a forma química orgânica de selênio monometilada, ácido metilselenínico. Isto pode ser explicado, por um lado pela atividade promissora do MSA em modelos *in vitro* de câncer, que não requer enzimas para sua conversão em metilselenol (IP *et al.*, 2000; RIKIISHI, 2007). Portanto, bioquimicamente, serve como um agente pronto para gerar selênio monometilado assim que entra na célula (ABDULAH *et al.*; 2005); atuando rapidamente em linhagens celulares (SHAH *et al.*, 2005). Já o selenito exige a presença do tripeptídeo glutatona para ser reduzido ao metabólito intermediário seleneto de hidrogênio (H_2Se), que consequentemente pode sofrer metilação e gerar metilselenol (ABDULAH *et al.*; 2005). No estudo de Li *et al.* (2008), por exemplo, o ácido metilselenínico exerceu atividade inibitória em tumores de próstata *in vivo* superior à exercida pelo selenito e selenometionina; sem as propriedades genotóxicas exercidas pelo selenito.

Ressalta-se neste contexto que apesar se apontar a inibição do crescimento celular como aspecto crítico das ações anticarcinogênicas do selênio, os mecanismos exatos envolvidos não são claros. Sabe-se que nutrientes e/ou CBAs atuam promissoriamente na reversibilidade destes eventos. A hipótese deste estudo foi que processos epigenéticos, incluindo a hipometilação global do DNA, a hipermetilação da região promotora de genes supressores de tumor e modificações pós-tradução em proteínas histonas, representem mecanismos relevantes das ações inibitórias do selênio no câncer de mama.

Nos últimos anos, uma compreensão melhor da maquinaria que conecta metilação do DNA, estado da cromatina e atividade transcricional, vem sendo correlacionada com modificações covalentes pós-traducionais de histonas, outro mecanismo epigenético de destaque no contexto do câncer (BALLESTAR, ESTELLER, 2005; GUIL; ESTELLER, 2009). Estas identificações de conexões entre a metilação alterada do DNA com o processo de acetilação e metilação de histonas têm contribuído não somente para a compreensão de como a desregulação epigenética acontece no

câncer, e também do desenvolvimento de novas terapias que possam reverter defeitos epigenéticos em células neoplásicas (BALLESTAR, ESTELLER, 2005; TING; MCGARVEY; BAYLIN, 2006; VALERI *et al.*, 2009).

No processo de metilação genômica a enzima DNMT1 é responsável por manter o padrão de metilação do DNA durante a replicação do DNA (GUIL; ESTELLER, 2009). Possui afinidade bioquímica por regiões hemimetiladas, ao mesmo tempo em que a preferência do momento de replicação seja o alvo para permitir que a cópia do padrão de metilação da fita parental seja transmitida para a nova fita-filha de DNA sintetizada (PATRA *et al.*, 2008; GUIL; ESTELLER, 2009). A identificação de antagonistas da via de DNMTs podem repercutir em importantes implicações terapêuticas na reexpressão de genes supressores de tumor epigeneticamente silenciados na carcinogênese mamária (GIRAULT *et al.*, 2003). Os melhores inibidores farmacológicos de DNMTs descritos até então são os substratos análogos de 5-citosina, 5-azacytidine e 5-aza-deoxycytidine. Estes compostos atuam através de sua incorporação no DNA, substituindo a base de citosina durante a sua replicação e levando a um sequestro covalente de DNMTs. Isto causa a depleção das enzimas ativas e desmetilação genômica do DNA durante a divisão celular (JOVANOVIC *et al.*, 2010). Entretanto, dentre as desvantagens destes compostos, destaca-se a sua alta instabilidade em soluções aquosas e reflexos negativos nas intervenções terapêuticas desejadas.

Na literatura nenhum trabalho descreve a atividade do ácido metilselenínico ou selenito de sódio sobre o padrão de metilação global do DNA em células MCF-7. Nos resultados aqui encontrados, ambos MSA ou selenito não alteraram o padrão de metilação global do DNA de células MCF-7, mas reduziram o nível de expressão protéica da enzima DNMT1 em cerca de 88% (MSA) e 94% (selenito).

No estudo de Ramachandram e colaboradores (2007), onde foram utilizadas condições de tratamentos e cultivo celular similares à da presente investigação, células LNCaP foram tratadas com uma única dose de 10µM de selenito por 4 dias, não tendo sido observada alterações sobre a expressão de genes silenciados pela hipermetilação de seu promotor, como o próprio GSTP1 reexpresso no estudo de Xiang (RAMACHANDRAM *et al.*, 2007; XIANG *et al.*, 2008). Xiang e colaboradores (2008) além de terem utilizado a técnica de *dot blot*, utilizaram uma forma de tratamento diferente da aplicada no estudo aqui apresentado, substituindo diariamente o

selenito de sódio no meio de cultivo celular durante o período de tratamento. Células de câncer de próstata LNCaP foram tratadas com selênio na concentração de 1,5 μ M de selenito de sódio e este foi repostado diariamente por 7 dias. Verificou-se que além do efeito inibitório sobre a proliferação e viabilidade celular, alterações significativas sobre o padrão de metilação global do DNA, redução da expressão gênica e protéica da enzima *DNMT1*, reativação do gene supressor de tumor *GSTP1* mediado por modificações pós-tradução em histonas, com aumento dos níveis de acetilação e redução dos níveis de trimetilação de resíduos de lisina 9 em histona H3 (XIANG *et al.*, 2008).

Verifica-se assim que a reposição diária do composto no meio de cultivo celular parece exercer uma atividade inibitória e modulação de mecanismos epigenéticos mais pronunciada quando comparada ao tratamento único de determinada linhagem, forma de tratamento esta adotada na presente investigação. Entretanto, é preciso considerar que uma vez que os compostos sejam substituídos diariamente, as doses administradas podem estar sendo cumulativas e consequentemente diferentemente das doses promissoras de inibição não tóxicas desejadas. Ressalta-se ainda que a morte celular induzida com doses tóxicas de tratamento com selenito poderiam mascarar os seus efeitos epigenéticos (SMITH, OTTERSON; PLASS, 2007).

Dentre as demais marcas epigenéticas investigadas, destaca-se a análise de expressão de genes supressores de tumor *RASSF1a* e *RARB*, comumente silenciados pela hipermetilação de suas regiões promotoras. Nenhum trabalho até então descreveu a atividade de compostos de selênio sobre o perfil de metilação do promotor do gene supressor de tumor *RASSF1a* em células MCF-7. Os dados obtidos aqui corroboram estudos descritos na literatura em que o gene *RASSF1a* encontra-se comumente hipermetilados no câncer de mama (BURBEE *et al.*, 2001; JOVANOVIC *et al.*, 2010). Em ambos os grupos tratados ou controle, a região promotora do gene *RASSF1a* apresentou-se hipermetilada e, portanto, silenciado. Entretanto, apesar de a expressão gênica do *RASSF1a* não ter sido alterada pelo MSA, aumentou em 45% após o tratamento com selenito. Neste sentido, apesar do selenito não ter induzido mecanismos apoptóticos, foi capaz de induzir a morte celular, parada de ciclo celular associado à reativação da expressão do gene *RASSF1a* em células MCF-7.

A metilação do gene supressor de tumor *RAR-β* compreende outro evento epigenético precoce na carcinogênese, e é encontrado em lesões *in situ*, de ambos os tipos de câncer lobulares e ductais (JOVANOVIĆ *et al.*, 2010). O padrão de metilação de região promotora do gene *RARβ* não foi alterado com os tratamentos, apesar de ter sido observado que estavam predominantemente metilados tanto nos grupos tratados quanto nos grupos não tratados com as formas químicas MSA ou selenito. Sabe-se que a técnica de MS-PCR, apesar de ser indicada para avaliação qualitativa do padrão de metilação de genes, acaba sendo uma técnica limitada visto que não se consegue quantificar os níveis de metilação das regiões promotoras dos genes. Esta análise poderia ter sido complementada com uma técnica quantitativa, como por exemplo, pelo sequenciamento do DNA dos genes, visto que os tratamentos com selenito de sódio ou ácido metilselenínico sugeriram possíveis alterações na região promotora do *RARB*.

Como o código de histonas é mais variado que a metilação do DNA, incluem-se ainda oportunidades potenciais para a nutrição influenciar marcas em histonas, promoverem alterações na estrutura da cromatina e então influenciar a transcrição gênica. Dentre as marcas epigenéticas investigadas, o MSA reduziu a acetilação de H3K9ac e trimetilação de H3K9me3, bem como aumentou a acetilação de H4K16ac. A falta de trimetilação de lisina 9 em histone H3 propicia o condensamento da cromatina em células de mamíferos, desencadeando uma viabilidade severamente prejudicada e instabilidades cromossômicas que estão associadas com o aumento de tumorigenicidade. Em relação a isto, trabalhos na literatura ressaltam que o desligamento da DNMT1, que causa uma profunda desorganização da arquitetura nuclear, associa-se também a uma redução na H3K9me3 (FRAGA; ESTELLER, 2005). Isto coincide com os dados aqui apresentados, sugerindo que na atividade inibitória do MSA sobre o crescimento de células MCF-7 estejam envolvidos modificações pós-tradução de histonas associadas à redução da expressão protéica da enzima DNMT1.

Por fim, este estudo traz pela primeira vez resultados referente à atividade inibitória exercida pelo selênio sobre células MCF-7, sugerindo que mecanismos epigenéticos estejam envolvidos e que as formas químicas de selênio exercem efeitos celulares e moleculares de inibição distintos. Com os resultados obtidos pode-se prever que o selênio, especificamente ácido metilselenínico, compreenda um agente bioativo de alimento potencial do controle da carcinogênese mamária, conseguindo

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

modular mecanismos epigenéticos, com destaque para modificações pós-tradução em histonas e expressão protéica de DNMT1. Entretanto, é imprescindível que em estudos futuros sejam investigados sua ação sobre células normais de mama. Assegurando-se, por sua vez, que sua ação seja seletiva para células neoplásicas de mama apenas; e assim possível extrapolar seu estudo em modelos animais e intervenções clínicas humanas voltadas para o controle do câncer de mama.

9. CONCLUSÕES

O selênio exerceu atividade anti-câncer potencial sobre células MCF-7, com efeitos celulares e moleculares diferenciados pelas formas químicas MSA e selenito de sódio:

- O MSA inibiu o crescimento das células por mecanismos apoptóticos, interferindo na distribuição das fases do ciclo celular. A modulação epigenética da modificação pós-tradução de acetilação e metilação de histonas, bem como redução da expressão protéica da enzima *DNMT1* pareceram ser características relevantes dos efeitos inibitórios do MSA em células de câncer de mama.

- O selenito de sódio inibiu o crescimento das células por mecanismos citotóxicos, induzindo morte por necrose e interferindo na distribuição das fases do ciclo celular. A reativação da expressão do gene supressor de tumor *RASSF1a* e redução da expressão protéica da enzima *DNMT1* pareceram ser características relevantes de sua ação inibitória em células de câncer de mama.

10. REFERÊNCIAS

ABDULAH R, MIYAZAKI K, NAKAZAWA M *et al.* Chemical forms of selenium for cancer prevention. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. 19: 141–150, 2005.

ALYAQOUB FS, TAO L, KRAMER PM *et al.* Prevention of mouse lung tumors and modulation of DNA methylation by combined treatment with budesonide and R115777 (ZarnestraMT). **Carcinogenesis**. 28(1): 124-29, 2006.

ANDRADE FO; MIRANDA JX; MORENO FS; ONG TP. Modelos Neoplásicos *in vitro* para Estudo de Compostos Bioativos de Alimentos. In: Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte; Raquel Alves dos Santos; Helio Vannucchi. (Org.). Nutrição e Metabolismo - Nutrição Experimental. Nutrição e Metabolismo. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, edição 1; v. 1, p. 95-109, 2012.

BALLESTAR E; ESTELLER M. The epigenetic breakdown of cancer cells: from DNA methylation to histone modifications. **Prog Mol Subcell Biol**. 38:169-81, 2005.

BARNES S. Nutritional Genomics, Polyphenols, Diets, and Their Impact on Dietetics. **J Am Diet Assoc**. 108(11): 1888-95, 2008.

BAYLIN SB; OHM JE. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nature Cancer Reviews**. 6: 107-16, 2006.

BECK K, THOMPSON RL, ALLEN K. Policy and action for cancer prevention—highlights from a new report by the World Cancer Research Fund and the American Institute for Cancer Research: Nutrition Bulletin. **British Nutrition Foundation**. 34: 296–302, 2009.

BOHNSACK BL, HIRSCHI KK. Nutrient regulation of cell cycle progression. **Annu Rev Nutr**. 24:433–53, 2004.

BOWEN DJ, BERESFORD SAA. Dietary interventions to prevent disease. **Annu Rev Public Health**. 23:255-86, 2002.

BROWER V. Epigenetics: Unravelling the cancer code. **Nature**. 471, 2011.

BROZMANOVA J; MA'NIKOVA D; VLC'KOVA V *et al.* Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. **Arch Toxicol.** 84: 919–38, 2010.

BURBEE DG; FORGACS E; ZÖCHBAUER-MÜLLER S *et al.* Epigenetic Inactivation of RASSF1A in Lung and Breast Cancers and Malignant Phenotype Suppression. **Journal of the National Cancer Institute.** 93 (9), 2001.

BROWER V. Epigenetics: Unravelling the cancer code. **Nature.** 471: S12–S13, 2011.

BYER T. Two Decades of Declining Cancer Mortality: Progress with Disparity. **Annu Rev Public Health.** 31: 28.1-28.12, 2010.

COLACINO JA; ARTHUR AE; DOLINOY DC *et al.* Pretreatment dietary intake is associated with tumor suppressor DNA methylation in head and neck squamous cell carcinomas. **Epigenetics.** 7 (8): 883-91, 2012.

COTTRELL SE, LAIRD PW. Sensitive detection of DNA methylation. **Ann N Y Acad. Sci.** 983: 120-30, 2003.

COUTO E, BOFFETA P, LAGIOU P *et al.* Mediterranean dietary pattern and cancer risk in the EPIC cohort. **British Journal of Cancer.** 1 – 7, 2011.

DAMMANN R, YANG G, PFEIFER GP. Hypermethylation of the CpG Island of Ras Association Domain Family 1A (RASSF1A), a Putative Tumor Suppressor Gene from the 3p21.3 Locus, Occurs in a Large Percentage of Human Breast Cancers. **Cancer Res.** 61: 3105–3109, 2001.

DAVIS CD. Nutritional Interactions: Credentialing of Molecular Targets for Cancer Prevention. **Exp Biol Med.** 232:176–183, 2007.

DAVIS CD; UTHUS EO; FINLEY JW. Dietary selenium and arsenic affect DNA methylation *in vitro* in Caco-2 and *in vivo* rat liver and colon. **The Journal of Nutrition.** 130 (12): 2903-9, 2000.

DARZYNKIEWICZ Z; DOROTA HALICKA HD; ZHAO H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow and Laser Scanning Cytometry. **Advances in experimental medicine and biology**. 676: 137–147, 2010.

DEVINOY E; RIJNKELS M. Epigenetics in Mammary Gland Biology and Cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**. 15:1–4, 2010.

DIVISI D; DI TOMMASO S; SALVEMINI S *et al*. Diet and cancer. **Acta Biomed** 77: 118-23, 2006.

DOLL R, PETO R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risk in the United States today. **J Natl Cancer Inst**. 66:1191-308, 1981.

DONG Y, GANTHER HE, STEWART C *et al*. Identification of molecular targets associated with selenium-induced growth inhibition in human breast cells using cDNA microarrays. **Cancer Res**. 62:708–714, 2002.

DONNINGER H, VOS MD, CLARK GJ. The RASSF1A tumor suppressor. **J Cell Sci**. 120:3163-31, 2007.

DWORKIN AM; HUANG THM; TOLAND AE. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. **Seminars in Cancer Biology**. 19: 165–71, 2009.

ESTELLER M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. **European Journal of Cancer**. 36: 2294-300, 2000.

ESTELLER M; GUO M; MORENO V *et al*. Hypermethylation-associated inactivation of the cellular retinol-binding-protein 1 gene in human cancer. **Cancer Res**. 62: 5902-5, 2002.

ESTELLER M. Epigenetics in cancer. **N Engl J Med**. 358: 1148-59, 2008.

FANG MZ, CHEN D, SUN Y *et al*. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. **Clin Cancer Res**, 11:7033-41, 2005.

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

FEIL R. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. **Mutat Res.** 600:46-57, 2006.

FENTON JI, HORD NG. Stage matters: choosing relevant model systems to address hypotheses in diet and cancer chemoprevention research. **Carcinogenesis.** 27(5): 893–902, 2006.

FIALHO E; MORENO FS; ONG TP. Nutrição no pós-genoma: fundamentos e aplicações de ferramentas ômicas. **Rev Nutr.** 21(6):757-66, 2008.

FINLEY JW. Bioavailability of Selenium from Foods. **Nutrition Reviews.** 64: 3, 2006.

FRAGA MF; ESTELLER M. Towards the Human Cancer Epigenome: A First Draft of Histone Modifications. **Cell Cycle.** 4(10): 1377-81, 2005.

GABEL-JENSEN C; LUNØE K; GAMMELGAARD B. Formation of methylselenol, dimethylselenide and dimethyldiselenide in in vitro metabolism models determined by headspace GC-MS. **Metallomics.** (2):167-73, 2010.

GANTHER HE. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. **Carcinogenesis.** 20 (9): 1657-66, 1999.

GARFINKEL MD; RUDEN DM. Chromatin effects in nutrition, cancer, and obesity. **Nutrition.** 20:56–62, 2004 .

GERHAUSER C. Cancer chemoprevention and nutriepigenetics: state of the art and future challenges. **Top Curr Chem.** 329:73-132, 2013.

GIRAULT I; TOZLU S; LIDEREAU R *et al.* Expression Analysis of DNA Methyltransferases 1, 3A, and 3B in Sporadic Breast Carcinomas. **Clin Cancer Res.** 9:4415-22, 2003.

GUIL S; ESTELLER M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** 41: 87–95, 2009.

HARRIS HR, BERGKVIST L, WOLK A. Selenium intake and breast cancer mortality in a cohort of Swedish women. **Breast Cancer Res Treat.** 134(3):1269-77, 2012.

HACKETT AJ, SMITH HS, SPRINGER EL *et al.* Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. **J Natl Cancer Inst.** 58(6):1795-806, 1977.

HERMAN JG; GRAFF JR; MYÖHÄNEN S *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 93(18): 9821-26, 1996.

HOLANDINO C, VEIGA VF, RODRIGUES ML *et al.* Direct current decreases cell viability but not P glycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukaemic cell. **Bioelectromagnetics**, 22 (7): 470-78, 2001.

HO E; DASHWOOD RH. Dietary manipulation of histone structure and function. **World Rev Nutr Diet.** 101:95-102, 2010.

HOWLADER N, NOONE AM, KRAPCHO M *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2012.

HUANG; ESTELLER. Breast Tumorigenesis Chromatin Remodeling in Mammary Gland Differentiation and Breast Tumorigenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 2:a004515, 2010.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / **Instituto Nacional de Câncer (INCA). Ministério da Saúde** – Rio de Janeiro: INCA, 2009.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012 – Incidência de câncer no Brasil. Acesso em: 16 Set 2012. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>.

IOM. INSTITUTE OF MEDICINE/FOOD AND NUTRITION BOARDS. Dietary and reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and aminoacids. Washington, National Academy Press. 697-736, 2005.

IP C, HAYES C, BUDNICK RM *et al.* Chemical Form of Selenium, Critical Metabolites, and Cancer Prevention. **Cancer Res.** 51: 595-600, 1991.

IP C, THOMPSON HJ, ZHU Z *et al.* *In Vitro* and *in Vivo* Studies of Methylseleninic Acid: Evidence That a Monomethylated Selenium Metabolite Is Critical for Cancer Chemoprevention. **Cancer Res.** 60: 2882–86, 2000.

IP C, DONG Y, GANTHER HE. New concepts in selenium chemoprevention. **Cancer Metastasis Rev.** 21:281–89, 2002.

JACKSON MI, COMBS GF JR. Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** 11:718–726, 2008.

JIANG C; WANG Z; GANTHER H; LÜ J. Distinct effects of methylseleninic acid versus selenite on apoptosis, cell cycle, and protein kinase pathways in DU145 human prostate cancer cells. **Mol Cancer Ther.** 1(12):1059-66, 2002.

JIRTLE RL, SKINNER MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Genetics Reviews.** 8: 253-62, 2007.

JOHANNING GL; HEIMBURGER DC; PIYATHILAKE CJ. DNA methylation and diet in cancer. **J Nutr.** 132: 3814S-18S, 2002.

JOVANOVIĆ J, RØNNEBERG JA, TOST J *et al.* The epigenetics of breast cancer. **Molecular oncology.** 4: 242-54, 2010.

KARAGIANNIS TC; MAULIK N. Factors Influencing Epigenetic Mechanisms and Related Diseases. **Antioxidants & Redox signaling.** 17 (2), 2012.

KERR JF; WYLLIE AH; CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer.** 26(4): 239-57, 1972.

KERR JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology.** 181-182:471-4, 2002.

KONDO Y. Epigenetic Cross-Talk between DNA Methylation and Histone Modifications in Human Cancers. **Yonsei Med J.** 50(4): 455-463, 2009.

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

KRÁLOVÁ V, BRIGULOVÁ K, CERVINKA M *et al.* Antiproliferative and cytotoxic effects of sodium selenite in human colon cancer cells. **Toxicology in Vitro**. 23: 1497–503, 2009.

KRIS-ETHERTON PM; LEFEVRE M; BEECHER GR *et al.* Bioactive compounds in nutrition and health research methodologies for establishing biological function: The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Flavonoids on Atherosclerosis. **Annu Rev Nutr**. 24:511-38, 2004.

KUROIWA-TRZMIELINA J; DE CONTI A; SCOLASTICI C *et al.* Chemoprevention of rat hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: Efficacy of tributyrin, a butyric acid prodrug. **Int J Cancer**. 124:2520–27, 2009.

LANCHER ML, O’SULLIVAN J, JENUWEIN T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. **J Cell Sci**. 116: 2117-24, 2003.

LECHNER M, BOSHOFF C, BECK S. Cancer epigenome. **Adv Genet**. 70:247-76, 2010.

LEE SO; NADIMINTY N; WU XX *et al.* Selenium Disrupts Estrogen Signaling by Altering Estrogen Receptor Expression and Ligand Binding in Human Breast Cancer Cells. **Cancer Res**. 65(8): 3487-92, 2005.

LEE KW; BODE AM; DONG Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. **Nature Reviews Cancer**. 11: 211-17, 2011.

LI GX; LEE HJ; WANG Z *et al.* Superior in vivo inhibitory efficacy of methylseleninic acid against human prostate cancer over selenomethionine or selenite. **Carcinogenesis**. 29(5):1005-12, 2008.

LIN X, NELSON WG. Methyl-CpG-binding Domain Protein-2 Mediates Transcriptional Repression Associated with Hypermethylated GSTP1 CpG Islands in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Cancer Res**. 63: 498–504, 2003.

LI Y; TOLLEFSBOL TO. Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. **Curr Med Chem**. 17(20): 2141–151, 2010.

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. **Methods**. 25: 402-08, 2001.

LO PK, SUKUMAR S. Epigenomics and breast cancer. **Pharmacogenomics**. 9 (12): 1879-1902, 2008.

LOPEZ-GARCIA MA; GEYER FC; LACROIX-TRIKI M *et al.* Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. **Histopathology**. 57, 171–92, 2010.

LOPEZ-SAEZ JB, SENRA-VARELA A, POUSA-ESTEVEZ L. Selenium in Breast Cancer. **Oncology**, 64: 227-31, 2003.

MANSON MM. Cancer prevention – the potential for diet to modulate molecular signaling. **TRENDS in Molecular Medicine**. 9 (1), 2003.

MARTINEZ, MARSHALL, GIOVANNUCCI. Diet and cancer prevention: the roles of observation and experimentation. **Nature Cancer Reviews**. 8: 694-703, 2008.

MCKAY JA ; MATHERS JC. Diet Induced Epigenetic Changes and their implications for Health. **Acta Physiol**. 202(2):103-18, 2011.

MATHERS JC. Overview of genes, diet and cancer. **Genes Nutr**. 2: 67-70, 2007.

MENSE SM; HEI TK; GANJU RK *et al.* Phytoestrogens and breast cancer prevention: possible mechanisms of action. **Environ Health Perspect**. 116 (4): 426-33, 2008.

MICHELS KB, MOHLLAJEE AP, ROSET-BAHMANYAR E *et al.* Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies. **Cancer**. 15;109(12 Suppl):2712-49, 2007.

MILNER JA. Nutrition and Gene Regulation. **J Nutr**. 134: 2492S–98S, 2004. **Nutr Cancer**, 44:80-8, 2004.

MILNER J. Nutrition and cancer: Essential elements for a roadmap. **Cancer Letters**. 269 (2):189-98, 2008.

MUTCH DM; WAHLI W; WILLIAMSON G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. **The FASEB Journal**. 19:1602-1616, 2005.

MYZAK MC; DASHWOOD RH. Histone deacetylases as targets for dietary cancer preventive agents: lessons learned with butyrate, diallyl disulfide, and sulforaphane. **Curr Drug Targets**, 7:443-52, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). SEER Stat Fact Sheets: Breast Cancer Disponível em <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>. Acesso em: 20 de Maio de 2011.

NIAN H; BISSON WH; DASHWOOD WM *et al.* a-Keto acid metabolites of organoselenium compounds inhibit histone deacetylase activity in human colon cancer cells. **Carcinogenesis**. 30 (8): 1416–23, 2009.

ONG TP; HEIDOR R; DE CONTI A *et al.* Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. **Carcinogenesis**, 27: 1194-203, 2006.

PATHIRAJA TN; STEARNS V; OESTERREICH S. Epigenetic regulation in estrogen receptor positive breast cancer--role in treatment response. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**. 15(1):35-47, 2010.

PATRA SK; PATRA A; RIZZI F *et al.* Demethylation of (Cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development. **Cancer Metastasis Rev**. 27:315–334, 2008.

PITOT HC; DRAGAN YP. The multistage nature of chemically induced hepatocarcinogenesis in the rat. **Drug Metabolism Reviews**. 26: 209–20, 1994.

POLYAK K. Breast cancer: origins and evolution. **J Clin Invest**. 117(11):3155–63, 2007

PORTELLA A; ESTELLER M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**. 28 (10), 2010.

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

PUTNIK M; ZHAO C; GUSTAFSSON JA *et al.* Global identification of genes regulated by estrogen signaling and demethylation in MCF-7 breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. xxx: xxx–xxx, 2012.

RAMACHANDRAN K; NAVARRO L; GORDIAN E *et al.* Methylation-mediated silencing of genes is not altered by selenium treatment of prostate cancer. **Anticancer Res**. 27, 921–926, 2007.

REDMAN C; SCOTT JA; BAINES AT *et al.* Nelson MA. Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. **Cancer Letters**. 125: 103-110, 1998.

REGGETI F; BIENZLE D. Flow Cytometry in Veterinary Oncology. **Veterinary Pathology**. 48(1): 223-35, 2011.

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

ROCK CL, LAMPE JW, Patterson RE. Nutrition, Genetic and Cancer. **Annu Rev Public Health**. 21:47-64, 2000.

RODRÍGUEZ-PAREDES M; ESTELLER M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. **Nature Medicine**. 17 (3), 2011.

ROODENBURG AJ; SCHLATMANN A; DÖTSCH-KLERK M *et al.* Potential Effects of Nutrient Profiles on Nutrient Intakes in the Netherlands, Greece, Spain, USA, Israel, China and South-Africa. **PLoS ONE**. 6(2): e14721, 2011.

ROLL JD; RIVENBARK AG; JONES WD *et al.* DNMT3b overexpression contributes to a hypermethylator phenotype in human breast cancer cell lines. **Molecular Cancer**. 7:15, 2008.

ROSS SA, POIRIER L. Proceedings of the TRANS-HHS workshop: Diet, DNA methylation processes and health. **J Nutr**, 132: 2329S-32S, 2002.

ROSS SA. Evidence for relationship between diet and cancer. **Exp Oncol.** 32(3): 137-42, 2010.

SCHRAUZER GN, WHITE DA, SCHNEIDER DJ. Cancer mortality correlation studies. III. Statistical associations with dietary selenium intakes. **Bioinorg Chem.** 7: 23–34, 1977.

SCHRAUZER GN; SURAI PF. Selenium in human and animal nutrition: Resolved and unresolved issues. A partly historical treatise in commemoration of the fiftieth anniversary of the discovery of the biological essentiality of selenium, dedicated to the memory of Klaus Schwarz (1914–1978) on the occasion of the thirtieth anniversary of his death. **Critical Reviews in Biotechnology.** 29(1): 2–9, 2009.

SHAH YM; KAUL A; DONG Y *et al.* Attenuation of estrogen receptor α (ER α) signaling by selenium in breast cancer cells via downregulation of ER α gene expression. **Breast Cancer Research and Treatment.** 92: 239–50, 2005.

SINGAL R, van WERT J, BASHAMBU M. Cytosine Methylation Represses Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) Gene Expression in Human Prostate Cancer Cells. **Cancer Res.** 61: 4820–26, 2001.

SINHA R; SAID TK; MEDINA D. Organic and inorganic selenium compounds inhibit mouse mammary cell growth in vitro by different cellular pathways. **Cancer Letters.** 107: 277-84, 1996.

SMITH LT, OTTERSON GA; PLASS C. Unraveling the epigenetic code of cancer for therapy. **TRENDS in Genetics.** 23 (9), 2007.

STEFANSKA B; KARLIC H; VARGA F *et al.* Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components - the implications in cancer prevention. **Br J Pharmacol.** 167(2):279-97, 2012.

SU Y; SHANKAR K; RAHAL O *et al.* Bidirectional signaling of mammary epithelium and stroma: implications for breast cancer—preventive actions of dietary factors. **Journal of Nutritional Biochemistry.** xx: xxx–xxx, 2011.

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

SUZANA S; CHAM B G; AHMAD ROHI G *et al.* Relationship between selenium and breast cancer: a case-control study in the Klang Valley. **Singapore Med J.** 50 (3) : 265, 2009.

SUZUKI M; ENDO M; SHINOHARA F *et al.* Differential apoptotic response of human cancer cells to organo selenium compounds. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2010.

THUN MJ; DELANCEY JO; CENTER MM *et al.* The global burden of cancer: priorities for prevention. **Carcinogenesis.** 31(1): 100–10, 2010.

TING AH, MCGARVEY KM, BAYLIN SB. The cancer epigenome – components and functional correlates. **Genes Dev.** 20: 3215-323, 2006.

UTHUS; ROSS; DAVIS Differential Effects of Dietary Selenium (Se) and Folate on Methyl Metabolism in Liver and Colon of Rats. *Biological Trace Element Research.* 109: 201-214, 2006.

VAISSIÈRE T; SAWAN C; HERCEG Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. **Mutat R.** 659: 40-48, 2008.

VALERI N; VANNINI I; FANINI F *et al.* Epigenetics, miRNAs, and human cancer: a new chapter in human gene regulation. **Mamm Genome.** 20:573–580, 2009.

VALDIGLESIAS V; PÁSARO E; MÉNDEZ J *et al.* *In vitro* evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. **Arch Toxicol,** 2009.

VAN DEN VIJVER IB. Genetic effects of methylation diets. **Annu Rev Nutr.** 22: 255-282, 2002.

VAN DER WEYDEN L; ADAMS DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer.** 1776 (1): 58-85, 2007.

VARGO-GOGOLA T; ROSEN JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer.** 7: 659-71, 2007.

VEECK J, ESTELLER M. Breast Cancer Epigenetics: From DNA Methylation to microRNAs. **J Mammary Gland Biol Neoplasia.** 15:5–17, 2010.

WADDINGTON, C.H. The epigenotype. **Endeavour**. 1: 18–20, 1942.

WARRI A, SAARINEN NM, MAKELA S *et al*. The role of early life genistein exposures in modifying breast cancer risk. **Br J Cancer**. 98, 1485–93, 2008.

WATSON WH, CAI J, JONES DP. Diet and apoptosis. **Annu Rev Nutr**. 20:485-505, 2000.

WCRF/AIRC/AIRC. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Second Expert report: Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR, 2007

WEIGELT B. BREAST CANCER METASTASIS: MARKERS AND MODELS. **Nature Cancer Reviews**. 5: 591-602, 2005.

WHO. World Health Organization: Fact sheet: Cancer, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 20 maio 2011.

WHO. World Health Organization. Cancer. Fact sheet N°297. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 01 Set 2012.

WU M; KANG MM; SCHOENE NW *et al*. Selenium Compounds Activate Early Barriers of Tumorigenesis. **The journal of Biological Chemistry**. 285 (16), 2010.

WU X; ZHANG Y; CHEN S *et al*. Methylseleninic acid restricts tumor growth in nude mice model of metastatic breast cancer probably via inhibiting angiopoietin-2. **BMC Cancer**. 28;12(1):192, 2012.

XIANG N; ZHAO R; SONG G *et al*. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. **Carcinogenesis** 29(11): 2175–81, 2008.

YANG L. Mechanisms of Apoptosis Resistance in Breast Cancer. **Breast Cancer and Molecular Medicine**. 13: 841-858, 2006.

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

YANG Q; MORI I; SHAN L *et al.* Biallelic Inactivation of Retinoic Acid Receptor β 2 Gene by Epigenetic Change in Breast Cancer. **Am J Cardiovasc Pathol.** 158(1), 2001.

YEO W; WONG WL; WONG N *et al.* High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumorous and non tumorous of breast cancer. **Pathology.** 37: 125-30, 2005.

ZARITSKAYA L; SHURIN MR; SAYERS TJ; MALYGUINE AM. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. **Expert review of vaccines.** 9: 601–16, 2010.

ZENG H; BRISKE-ANDERSON M; IDSO JP *et al.* The Selenium Metabolite Methylselenol Inhibits the Migration and Invasion Potential of HT1080 Tumor Cells. **J Nutr.** 136: 1528–32, 2006.

ZHAO R; XIANG N; DOMANN F *et al.* Effects of Selenite and Genistein on G2/M cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. **Nutrition and Cancer.** 61(3): 397-407, 2009.

ZHU Z; JIANG W; GANTHER HE *et al.* Mechanisms of Cell Cycle Arrest by Methylseleninic Acid. **Cancer research.** 62, 156–164, 2002.

11. ANEXOS

ANEXO 1. Histogramas da avaliação da integridade de membrana plasmática de células MCF-7 tratadas com ácido metilselenínico. Histogramas da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (PI) ligado ao DNA obtidos por citometria de fluxo após incubação de células MCF-7 por 72h e 96h com 2 μ M de ácido metilselenínico. As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal PEA (exc. = 488 nm; emi. = 695 nm).

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

ANEXO 2. Histogramas da Avaliação da integridade de membrana plasmática de células MCF-7 tratadas com selenito de sódio. Histogramas da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (PI) ligado ao DNA obtidos por citometria de fluxo após incubação de células MCF-7 por 96h e 120h com 10 μ M de selenito de sódio. As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal PEA (exc. = 488 nm; emi. = 695 nm).

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

ANEXO 3. Histogramas da avaliação das fases ciclo celular e fragmentação do DNA após tratamento de células MCF-7 com ácido metilselenínico. Histogramas da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (PI) ligado ao DNA obtidos por citometria de fluxo após incubação de células MCF-7 por 72h e 96h com 1,6 μ M ou 2 μ M de ácido metilselenínico. As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal PEA (exc. = 488 nm; emi. = 695 nm).

Efeitos do tratamento com selênio no crescimento e marcas epigenéticas de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

ANEXO 4. Histogramas da avaliação das fases ciclo celular e fragmentação do DNA após tratamento de células MCF-7 com selenito de sódio. Histogramas da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (PI) ligado ao DNA obtidos por citometria de fluxo após incubação de células MCF-7 por 96h e 120h com 8 μ M ou 10 μ M de selenito de sódio. As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal PEA (exc. = 488 nm; emi. = 695 nm).