

Marcos Raniel Straliozzo

**ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS
NO EFEITO CITOPROTETOR DO DISSELENETO DE
DIFENILA EM MACRÓFAGOS E CÉLULAS ENDOTELIAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Bioquímica

Orientadora: Prof^a. Dra. Andreza Fabro
de Bem

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Stralietto, Marcos Raniel

Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito citoprotetor do disseleneto de difenila em macrófagos e células endoteliais / Marcos Raniel Stralietto ; orientadora, Andreza Fabro de Bem - Florianópolis, SC, 2016. 148 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Disseleneto de difenila. 3. Antioxidante. 4. Macrófagos. 5. Células endoteliais. I. de Bem, Andreza Fabro. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

"Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito citoprotetor do disseleneto de difenila em macrófagos e células endoteliais"

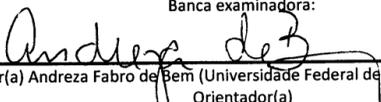
Por

Marcos Raniel Stralio

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (21/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.


Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

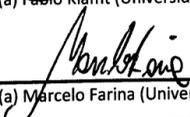
Banca examinadora:


Dr(a) Andreza Fabro de Bem (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr(a) Rafael Radi (Universidad de la República)


Dr(a) Silvina Bartesaghi (Universidad de la República)


Dr(a) Fábio Klant (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)


Dr(a) Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr(a) Alcir Luiz Dafre (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 23 de Junho de 2016.

*A lei da mente é implacável.
O que você pensa, você cria;
O que você sente, você atrai;
O que você acredita
Torna-se realidade.
Buda*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pela oportunidade de estar concluindo mais esta etapa na minha vida.

Agradeço imensamente a minha mãe Ordália e a meu pai Ireno, que a pouco nos deixou. Meu muito obrigado pelos ensinamentos e exemplos de conduta moral, profissional e ética. Por estarem sempre ao meu lado incentivando a alcançar meus sonhos e principalmente por terem me ensinado a persistir diante das dificuldades. Sem vocês, eu não seria ninguém.

“Pai, onde o senhor estiver receba o meu carinho e minha gratidão por tudo que fizestes por mim”.

Agradeço a minha avó Zandilla e minhas irmãs Sandra e Leandra, por todo amor e carinho e por sempre acreditarem no meu potencial. Aos meus cunhados e sobrinhas.

Ao meu grande amigo, irmão e companheiro de todas as horas Rogério, por estar presente durante grande parte da minha caminhada, pelo incentivo, amizade e paciência, meu muito obrigado.

Um agradecimento especial à minha orientadora Prof^ª. Dra. Andreza Fabro de Bem. Muito obrigado por todos os ensinamentos, pelo apoio e confiança no meu trabalho. Esses anos sob sua orientação foram sem dúvidas de muito crescimento e aprendizagem.

Aos colegas do laboratório de Neuroquímica I, Gianni, Jade, Daniel, Gabriela, Ruth, Letícia e Luana pelas discussões sobre ciência, auxílio nos experimentos e amizade.

Ao prof. Dr. Rafael Radi por me receber em seu laboratório durante o doutorado sanduiche. Meu muito obrigado pela oportunidade que me proporcionou em conviver com um grupo tão especial e compartilhar conhecimentos e também fazer grandes amizades. Meu muito obrigado a todos os membros do CEINBIO pela amizade e carinho.

Aos professores Alexandra Latini e Marcelo Farina pelas colaborações e auxílios durante o desenvolvimento deste doutorado. Um agradecimento especial aos colegas e membros de seus laboratórios pela amizade, companheirismo, auxílios e parcerias.

Ao Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha da UFSM, pelas sugestões, trocas de conhecimento e pelo fornecimento do disseleneto de difenila.

Agradeço aos meus grandes e queridos amigos Gianni, Aline, Mariana, Alessandra, Daniel, Karina, Roberta, Viviane, Heloisa, Dirleise e Danúbia pela amizade e parceria.

Aos técnicos do LAMEB, Bibiana, Dênis, Vanessa e Camile, pela amizade, disponibilidade e auxílio na utilização dos equipamentos.

Aos colegas de corredor, pela amizade, trocas de experiências e brincadeiras.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Bioquímica, pelos conhecimentos e exemplos passados durante o doutorado.

A todos os amigos, que direta ou indiretamente participaram nesta fase da minha vida, meu muito obrigado.

Aos órgãos CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica caracterizada pelo acúmulo de lipídios e elementos celulares nas artérias de calibre médio e grande porte. Neste contexto, a modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a geração de espécies reativas no ambiente vascular desempenham um papel importante no desenvolvimento desta patogênese. O disseleneto de difenila (PhSe)₂, um composto orgânico de selênio, tem demonstrado relevante papel na prevenção da aterosclerose e de outras doenças relacionadas com o estresse oxidativo em diversos modelos experimentais. Os efeitos antioxidantes do (PhSe)₂ estão relacionados a sua capacidade em atuar como mimético a glutatona peroxidase e também por aumentar as defesas antioxidantes celulares, através da ativação de fatores de transcrição, como o Nrf2. Neste contexto, nosso objetivo foi investigar os mecanismos moleculares envolvidos no efeito citoprotetor do (PhSe)₂ em macrófagos e células endoteliais. Os nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com (PhSe)₂ reduziu os efeitos tóxicos induzidos pela LDLox em macrófagos murinos J774, incluindo a geração de ERO, distúrbio da homeostase do NO, ativação de metaloproteinases de matriz, formação de células espumosas e disfunção mitocondrial. Além disso, os efeitos da sinalização redox do (PhSe)₂ foram acompanhados pela regulação do fator de transcrição NF-κB, aumento dos níveis de GSH e da atividade da GGCS em macrófagos de forma dependente do tempo. Esses resultados estão relacionados com a capacidade do (PhSe)₂ em promover a ativação e a translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2. Por outro lado, o aumento da atividade da GGCS e a translocação para o núcleo do Nrf2 induzidas pelo (PhSe)₂ foram revertidas pelos inibidores de PI3K, JNK e p38MAPK. Ainda, o (PhSe)₂ aumentou os níveis proteicos de enzimas antioxidantes, como HO-1 e Prx-1, dependentes de Nrf2. Além disso, este composto aumentou a atividade da GPx, a qual está relacionada com o aumento nos níveis proteicos das isoformas GPx1 e GPx2 da enzima. Interessantemente, o (PhSe)₂ aumenta os níveis de MnSOD e GPx2, enzimas que não são alvos de Nrf2, sugerindo que outro fator de transcrição pode estar envolvido no efeito antioxidante do (PhSe)₂. Considerando o importante papel das células endoteliais vasculares no processo aterogênico, utilizando células endoteliais da aorta bovina (BAEC), investigamos o efeito citoprotetor do (PhSe)₂ nestas células expostas a privação de oxigênio e glicose, seguido de reoxigenação (OGD), simulando um quadro de

hipóxia. Inicialmente verificamos que o $(\text{PhSe})_2$, na sua forma reduzida selenol, aumentou a constante de reação com ONOO^- na medida que o pH diminuiu, sugerindo apresentar um efeito protetor em casos de acidose metabólica, como ocorre na hipóxia. Além disso, o $(\text{PhSe})_2$ preveniu a morte celular e a geração de ERO/ERN induzidos pela OGD. Ademais, a OGD diminuiu o potencial de membrana mitocondrial e a eficiência respiratória mitocondrial, sendo esses efeitos prevenidos pelo tratamento com $(\text{PhSe})_2$. Este efeito protetor pode estar relacionado, em parte, a sua atividade antioxidante como mimético da GPx e, por outro lado, por sua capacidade em ativar fatores transcricionais promotores do aumento da expressão de enzimas antioxidantes, diminuindo, desta forma, os efeitos nocivos provocados por espécies reativas e melhorando, conseqüentemente, o ambiente redox celular. Assim, os nossos resultados sugerem que o $(\text{PhSe})_2$ melhorou os sistemas de defesas antioxidantes em macrófagos e em células endoteliais através da modulação de diferentes vias de sinalização.

Palavras-chave: Aterosclerose. Lipoproteína de baixa densidade. Macrófagos. Células endoteliais. Nrf2. Mitocôndria. Disseleneto de difenila. Antioxidante.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease characterized by accumulation of lipids and cellular elements in the medium and large-sized arteries. In this context, the oxidative modification of low density lipoprotein (LDL) and the generation of reactive oxygen species (ROS) in the vascular environment play an important role in the development of this pathogenesis. The diphenyl diselenide (PhSe)₂, an organic selenium compound, has been demonstrated significant role in prevention of atherosclerosis and other diseases associated with oxidative stress in different experimental models. The antioxidant effects of (PhSe)₂ are related to its ability to act as glutathione peroxidase mimetic and also by increasing cellular antioxidant defenses, via activation of transcription factors, such as Nrf2. Thus, our goal was to investigate the molecular mechanisms involved in the cytoprotective effect of (PhSe)₂ in macrophages and endothelial cells. Our results showed that pre-treatment with (PhSe)₂ reduced the toxic effects induced by oxLDL in J774 murine macrophages, including ROS, disturbance of NO homeostasis, matrix metalloproteinase activation, foam cell formation and mitochondrial dysfunction. Moreover, the effects of redox signaling caused by (PhSe)₂ were monitored by regulation of the transcription factor NF-κB, increasing GSH levels and GGCS activity in the macrophages in a time-dependent manner. These results are related to the capacity of (PhSe)₂ in promoting activation and nuclear translocation of the transcription factor Nrf2. On the other hand, the increased GGCS activity and translocation of Nrf2 to the nucleus-induced by (PhSe)₂ were reversed by inhibitors of PI3K, JNK and p38MAPK. Furthermore, (PhSe)₂ increased the protein levels of antioxidant enzymes, such as HO-1 and Prx-1, an Nrf2-dependent mechanism. In addition, this compound increased GPx activity, which is related to the rise in the protein levels of GPx1 and GPx2 isozymes. Interestingly, (PhSe)₂ increased the protein levels of MnSOD and GPx2, enzymes that are not Nrf2 targets, suggesting that another transcription factor may be involved in the antioxidant effect of (PhSe)₂. Considering the important role of vascular endothelial cells in the atherogenic process, using bovine aortic endothelial cells (BAEC), we investigate the cytoprotective effect of (PhSe)₂ in this cells exposed to deprivation of oxygen and glucose, followed by reoxygenation (OGD) protocol, simulating a hypoxia condition. Initially we found that the (PhSe)₂, in reduced form selenol, increased reaction constant with ONOO⁻ as the pH decreased, suggesting a protective effect in case of metabolic

acidosis, as occurs in hypoxia. Furthermore, (PhSe)₂ prevented cell death and generation of ROS/RNS induced by OGD. Moreover, OGD decreasead the mitochondrial membrane potential and mitochondrial respiratory efficiency, being both of this effects prevented by (PhSe)₂ treatment. This protective effect may be, in part, related by its antioxidant activity as GPx mimetic and, secondly, by its ability to activate transcription factors that enhance expression of antioxidant enzymes, reducing, thus, the harmful effects caused by reactive species and improving the intracellular redox environment. Thus, our results suggest that (PhSe)₂ improved the antioxidant defense system in macrophages and endothelial cells through modulation of different signaling pathways.

Keywords: Atherosclerosis. Low density lipoprotein. Macrophages. Endothelial cells. Nrf2. Mitochondria. Diphenyl diselenide. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Recrutamento e ativação de macrófagos na lesão aterosclerótica	23
Figura 2	Modificação oxidativa da LDL	24
Figura 3	Ativação e translocação nuclear do fator Nrf2	28
Figura 4	Ciclo catalítico proposto para o (PhSe) ₂	31
Figura 5	O (PhSe) ₂ diminui a geração de ERO induzidos por LDLox em macrófagos	53
Figura 6	O (PhSe) ₂ preveniu a diminuição do potencial de membrana mitocondrial mediada pela LDLox	54
Figura 7	O (PhSe) ₂ preveniu a diminuição da viabilidade celular induzida pela LDLox	55
Figura 8	O (PhSe) ₂ preveniu a formação de células espumosas..	56
Figura 9	O (PhSe) ₂ diminuiu a atividade da MMP-9 induzida pela LDLox	58
Figura 10	Efeito do (PhSe) ₂ no imunoc conteúdo da iNOS e produção de NO	60
Figura 11	O (PhSe) ₂ modulou a translocação nuclear do fator NF-κB induzida por LDLox	62
Figura 12	O (PhSe) ₂ aumentou a biossíntese de GSH em macrófagos	67
Figura 13	O (PhSe) ₂ induziu a translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2 em macrófagos	69
Figura 14	Inibidores das vias p38, JNK e PI3K impediram o efeito do (PhSe) ₂ na translocação nuclear de Nrf2	71
Figura 15	Inibidores das vias p38, JNK e PI3K modularam o efeito do (PhSe) ₂ na atividade da enzima GGCS	72
Figura 16	O (PhSe) ₂ aumentou o imunoc conteúdo de HO-1 e Prx-1	73
Figura 17	O (PhSe) ₂ aumentou a atividade da enzima GPx e o imunoc conteúdo das isoformas GPx1 e GPx2	74
Figura 18	O (PhSe) ₂ aumentou os níveis proteicos da MnSOD ..	75
Figura 19	Determinação das constantes de reação (k) do ONOO ⁻ com o (PhSe) ₂ em diferentes pHs na presença de DTT.	79

Figura 20	O (PhSe) ₂ protegeu as células endoteliais da morte induzida pela OGD no teste de MTT	82
Figura 21	O (PhSe) ₂ protegeu as células endoteliais da morte apoptótica induzida pela OGD	83
Figura 22	O (PhSe) ₂ diminuiu a geração de ONOO ⁻ promovido pela OGD	85
Figura 23	O (PhSe) ₂ preveniu a geração de ONOO ⁻ induzido pela OGD em células endoteliais	86
Figura 24	O (PhSe) ₂ preveniu a perda do $\Delta\Psi_m$ provocado pela OGD	87
Figura 25	(PhSe) ₂ preserva a capacidade de reserva respiratória mitocondrial de células endoteliais expostas a OGD ...	89

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Efeitos do (PhSe) ₂ sobre a toxicidade induzida pela LDLox em macrófagos.....	63
Esquema 2	Protocolo experimental de OGD e reperfusão	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
*NO	Óxido nítrico
*OH	Radical hidroxil
(PhSe) ₂	Disseleneto de difenila
AP-1	Fator de transcrição de Proteína ativadora-1
Apo B-100	Apolipoproteína B-100
Apo E ^{-/-}	Camundongo deficiente para apolipoproteína E
ATP	Adenosina Trifostato
BAEC	Células endoteliais da aorta bovina
BSA	Albumina de soro bovino
CD36	Receptor scavenger CD36
DCFH-DA	2',7'- Diclorodihidrofluoresceína diacetato
DHR	Dihidrorodamina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FoxO	Fator de transcrição Forkhead box
GGCS	Gamaglutamilcisteína Sintetase
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril coenzima A
HOCl	Ácido hipocloroso
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro- 1,1',3,3'- tetraetilbenzimidazolil-carbocianina iodado
Keap1	Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLr ^{-/-}	Camundongo deficiente para o receptor de LDL
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos-1
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos

MnSOD	Manganes superóxido dismutase
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NADPH	Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida
NF-κB	Fator nuclear κB
NOS	Óxido nítrico sintase
NQO1	NAD(P)H quinona oxireductase
Nrf2	Nuclear factor-E2-related factor
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
OGD	Privação de oxigênio e glicose
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Salina tamponada com fosfato
Prx	Peroxireductase
-Se-OH	Selenol
SFB	Soro fetal bovino
-SH	Grupamento tiol
SOD	Superoxido dismutase
SRA	Receptor scavenger A
Trx	Tiorredoxina
VCAM-1	Molécula de adesão vascular - 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA ATEROSCLEROS	21
1.2	HIPÓTESE OXIDATIVA NA ATEROSCLEROSE	23
1.3	DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E ATEROSCLEROSE	25
1.4	MODULAÇÃO DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE VIA Nrf2	26
1.5	COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E A ATEROSCLEROSE	29
1.6	COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO COMO AGENTES ANTIATEROGÊNICOS	30
2	JUSTIFICATIVA	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	COMPOSTO DISSELENETO DE DIFENILA (PhSe) ₂ ...	39
4.2	CULTIVO CELULAR DE MACRÓFAGOS E CÉLULAS ENDOTELIAIS	39
4.3	ISOLAMENTO DE LDL E OXIDAÇÃO	39
4.4	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)	40
4.5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)	40
4.6	VIABILIDADE CELULAR E MORFOLOGIA NUCLEAR	45
4.7	AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO EM CÉLULAS ESPUMOSAS	42
4.8	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMP-9)	42
4.8.1	Zimografia	43
4.8.2	Atividade enzimática das gelatinases ou colagenases IV... ..	43
4.9	DETERMINAÇÃO DE NITRITO	43
4.10	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	44
4.11	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)	44
4.12	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GAMA-GLUTAMILCISTEINA SINTETASE (GGCS)	45

4.13	ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA PARA NF- κ B E Nrf2	45
4.14	PREPARO DAS FRAÇÕES CITOSÓLICAS E NUCLEARES PARA AVALIAR OS NÍVEIS DE Nrf2 POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	46
4.15	ANÁLISE DOS NÍVEIS PROTEICOS DE Nrf2, HO-1, Prx-1, GPx1, GPx2, MnSOD E iNOS	47
4.16	DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE REAÇÃO ENTRE ONOO ⁻ E (PhSe) ₂ EM DIFERENTES pH	47
4.17	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ONOO ⁻	48
4.18	OXIMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO	48
4.19	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	49
4.20	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	49
5	RESULTADOS	
5.1	CAPÍTULO 1: DISSELENETO DE DIFENILA (PhSe) ₂ MODULA A CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELA LDLox EM MACRÓFAGOS POR MELHORAR A SINALIZAÇÃO REDOX	51
5.2	CAPÍTULO 2: DISSELENETO DE DIFENILA (PhSe) ₂ MELHORA O SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM MACRÓFAGOS ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO Nrf2	65
5.3	CAPÍTULO 3: DISSELENETO DE DIFENILA (PhSe) ₂ PROTEGE CÉLULAS ENDOTELIAIS DO DANO PROMOVIDO PELA PRIVAÇÃO TRANSITÓRIA DE OXIGÊNIO E GLICOSE	77
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÕES	103
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
	ANEXO 1 – Artigo publicado	119
	ANEXO 2 – Manuscrito em elaboração	127

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares, tais como doença arterial coronariana e suas complicações, são importantes causas de morbidade e mortalidade no mundo, respondendo por 16,7 milhões de mortes a cada ano (Go et al., 2014). E, de acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2004), esta tendência deve persistir agravando ainda mais nos países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil se encontra (Sposito et al., 2007, Brasil, 2014). Etiologicamente, a aterosclerose é a condição patológica que antecede a maior parte dos episódios cardiovasculares, como o infarto do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (Itabe, 2003, Hansson e Libby, 2006, Swirski e Nahrendorf, 2013).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que se inicia devido à disfunção do endotélio vascular, favorecendo o acúmulo de material lipídico, principalmente lipoproteína de baixa densidade (LDL), e de elementos celulares, especialmente macrófagos e células musculares lisas, os quais se depositam na túnica íntima das artérias de médio e grande calibre, levando à formação de placas ateroscleróticas (Ross, 1999, Lusic, 2000, Libby et al., 2010). A relação entre lipídeos e a aterosclerose dominou os estudos acerca desta patologia por muitos anos, em que fortes evidências experimentais e clínicas relatam a ligação entre a hipercolesterolemia e o desenvolvimento da aterosclerose (Libby, 2002). Estudos mais recentes, no entanto, chamam a atenção para o envolvimento do processo inflamatório na aterosclerose e em suas complicações (Libby et al., 2010).

1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA ATEROSCLEROSE

As lesões iniciais ocorrem especialmente nas bifurcações e curvaturas das artérias, locais onde o fluxo sanguíneo ocorre de maneira turbilhonada e desorientada (Ross, 1999, Lusic, 2000). O processo aterosclerótico se inicia com uma disfunção endotelial vascular, favorecendo o surgimento de uma resposta inflamatória que resulta em aumento da permeabilidade aos leucócitos, lipídeos e plaquetas circulantes (Kadar e Glasz, 2001). A fase inicial da aterosclerose é caracterizada pelo surgimento de estrias gordurosas, as quais dão origem ao ateroma (Stary, 1990). Este processo inicia-se com a passagem de LDL da circulação para a camada íntima dos vasos, através da monocamada endotelial, onde esta LDL irá sofrer modificações

oxidativas, levando à liberação de fosfolípidos bioativos que poderão ativar as células endoteliais. Por sua vez, as células endoteliais ativadas expressam moléculas de adesão para leucócitos (principalmente VCAM-1). Após a adesão à camada endotelial, os leucócitos migram para a íntima em resposta a estímulos quimioatraentes, incluindo quimiocinas, dentre elas a MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos-1), que recruta monócitos circulantes para o local da lesão (Hansson, 2005, Hansson e Libby, 2006).

Na camada íntima, os monócitos adquirem características de macrófagos teciduais e passam a expressar receptores *scavenger* que ligam e internalizam partículas de lipoproteínas modificadas. O conjunto destes processos leva a formação das células espumosas, que são o resultado do acúmulo de gotículas lipídicas dentro do citoplasma destes macrófagos (Ross, 1999, Libby, 2002, Mimura e Itoh, 2015). Dentro da camada íntima arterial, os macrófagos participam de muitas funções relacionadas à aterosclerose e suas complicações. Notavelmente, as células espumosas secretam citocinas pró-inflamatórias, que amplificam a resposta inflamatória no local da lesão, bem como intensificam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Além disso, os macrófagos e as células espumosas têm um papel fundamental nas complicações trombóticas da aterosclerose através da produção e secreção de metaloproteinases de matriz (MMP). Estas enzimas proteolíticas podem degradar a matriz extracelular resultando em ruptura da placa aterosclerótica, e assim o sangue circulante entra em contato com o fator tecidual pró-coagulante, levando à formação de um trombo sobrejacente (Libby, 2002). Conforme a Figura 1, o processo de recrutamento e ativação de macrófagos na lesão aterosclerótica é exemplificado.

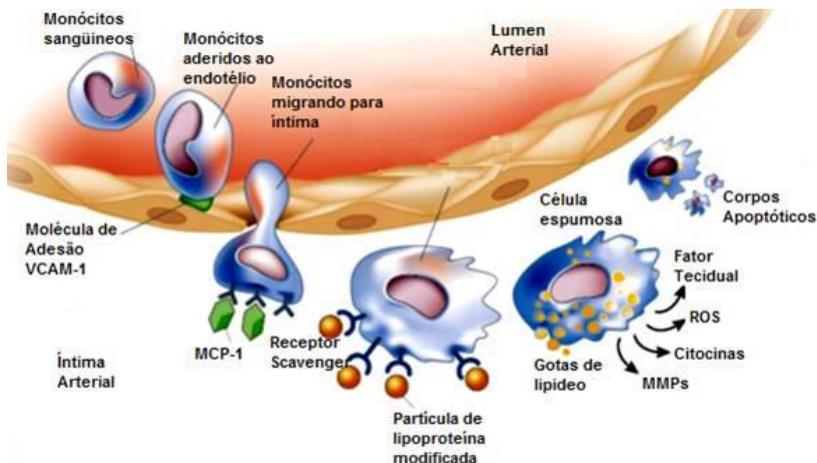


Figura 1: Recrutamento e ativação de macrófagos na lesão aterosclerótica. Monócitos da circulação se aderem às células endoteliais através de moléculas de adesão vascular (VCAM-1), atravessam a camada endotelial e na camada íntima adquirem características de macrófagos teciduais. Os macrófagos expressam receptores que incorporam partículas de LDL modificadas e formam as células espumosas, componentes essenciais para o estabelecimento da lesão aterosclerótica. Estes macrófagos ativados secretam componentes inflamatórios (citocinas, MMPs, ERO, etc) que intensificam e perpetuam o processo. Fonte: Adaptado de Libby (2002).

1.2 HIPÓTESE OXIDATIVA NA ATEROSCLEROSE

A hipótese da modificação oxidativa da LDL, proposta há mais de 25 anos por Steinberg e colaboradores (1989), propõe que processos oxidativos levam a modificações da LDL, desempenhando um papel fundamental na aterogênese. Esta hipótese constitui a base para as discussões sobre a patogênese da aterosclerose (Glass e Witztum, 2001). A LDL oxidada (LDL_{ox}) contém componentes potencialmente nocivos que induzem respostas inflamatórias em células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos (Hansson, 2005).

Os mecanismos envolvidos nas modificações *in vivo* das lipoproteínas ainda não estão completamente esclarecidos, todavia, um dos eventos iniciais na oxidação da LDL é a peroxidação dos lipídeos, particularmente, fosfolipídios e ésteres de colesterol (Glavind et al., 1952). Um dos produtos finais da oxidação dos ácidos graxos é o dieno

conjugado, o qual reage muito rapidamente com o oxigênio molecular iniciando uma reação auto-catalítica que leva a formação de hidroperóxidos lipídicos. A presença de peróxidos lipídicos em extratos preparados de aortas ateroscleróticas foi descrita há mais de 60 anos e, desde então, foi sugerido que a peroxidação lipídica desempenha um papel ativo na patogênese da aterosclerose (Glavind et al., 1952).

Adicionalmente à oxidação lipídica, a apo B-100, apolipoproteína primária da LDL, fragmenta-se por ação oxidativa e os produtos formados na lipoperoxidação reagem com resíduos de lisina da apo B-100, formando bases de Schiff (Steinbrecher, 1987, Yamaguchi et al., 2002). As alterações conformacionais causadas pela perda da estrutura secundária ou alterações de carga elétrica resultam em uma proteína com carga negativa aumentada. Estas modificações oxidativas proporcionam um aumento do reconhecimento destas partículas pelos receptores *scavenger* dos macrófagos, como SR-A e CD36, levando ao acúmulo de LDL modificada e a consequente formação de células espumosas (Figura 2).

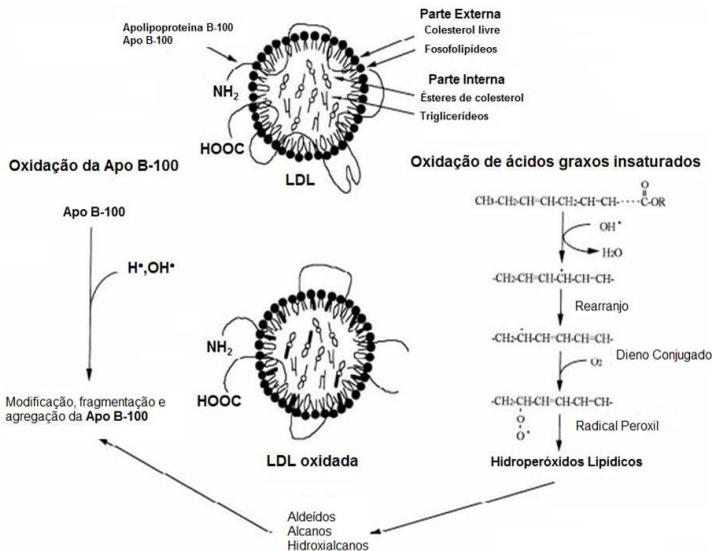


Figura 2: Modificação oxidativa da LDL. O dano oxidativo à LDL afeta ambos componentes lipídicos e proteicos da molécula. A oxidação da LDL leva à modificação, fragmentação e agregação da apo B-100. Por outro lado, a oxidação da LDL inicia-se através da peroxidação lipídica, principalmente de

fosfolípídeos e ésteres de colesterol, resultando na formação de dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos. Fonte: Adaptado de Yamaguchi et al., (2002).

1.3 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E ATEROSCLEROSE

A integridade funcional do endotélio é um elemento fundamental na preservação da saúde vascular. Muitos estudos têm demonstrado que a disfunção endotelial não é apenas um iniciador, mas pode também ser um fator importante na progressão da doença cardiovascular aterosclerótica (Park e Park, 2015).

O endotélio é uma barreira altamente seletiva e metabolicamente ativa, e que desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase vascular, mantendo um equilíbrio delicado entre a vasodilatação e vasoconstrição (Kasprzak et al., 2006). A vasodilatação é mediada por vários fatores, mas principalmente pelo óxido nítrico (NO). Além disso, o NO mantém a homeostase da parede vascular pela sua capacidade em inibir a agregação plaquetária, processo inflamatório, estresse oxidativo, migração e proliferação de células musculares lisas, além de controlar a adesão de leucócitos às células endoteliais (Moncada e Higgs, 2006, Tousoulis et al., 2014). A síntese de NO no endotélio se dá pela isoforma NOS3 (eNOS), forma constitutiva e ativa, que gera NO em resposta a estímulos fisiológicos ou devido a presença de algum estressor e, também, pela isoforma induzível NOS2 (iNOS) estimulada por respostas inflamatórias, principalmente em macrófagos (Moncada e Higgs, 2006).

A disfunção endotelial está caracterizada pelo aumento do estresse oxidativo e diminuição da biodisponibilidade do NO , resultando em comprometimento do tônus vascular e da função cardiovascular. A principal via de inativação do NO na vasculatura é sua reação controlada com superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) produzindo peroxinitrito (ONOO^{\cdot}), o qual atua como potente agente oxidante e nitrante, promovendo danos celulares e intensificando o processo pró-aterogênico (Cai e Harrison, 2000, Yokoyama, 2004).

Diversos trabalhos têm enfatizado a importância das mitocôndrias das células endoteliais na manutenção da função endotelial. As mitocôndrias desempenham importante papel na sinalização celular em respostas a estímulos celulares, como a produção de ERO. A relação da mitocôndria com fatores de riscos da aterosclerose está no excesso de produção de ERO geradas pela

mitocôndria, promovendo um processo inflamatório e diminuição da biodisponibilidade de NO, promovendo assim uma disfunção endotelial (Moncada e Higgs, 2006, Kluge et al., 2013). Além disso, associado ao metabolismo glicolítico, as mitocôndrias apresentam um papel fundamental na bioenergética celular e participam de uma série de outros processos celulares, inclusive ativação de vias de morte celular (Widlansky e Guterman, 2011, Hort et al., 2014).

As células endoteliais possuem uma rede mitocondrial a qual, em condições basais, utiliza apenas cerca de 35% de sua capacidade respiratória máxima. De acordo com recente estudo, mitocôndrias de células endoteliais estão fortemente acopladas e possuem uma capacidade de reserva bioenergética considerável, importante na resposta ao estresse oxidativo, como ocorre durante o processo aterosclerótico, em que células endoteliais são expostas a ambas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Dranka et al., 2010).

O comprometimento do endotélio durante episódios de isquemia/reperfusão se deve ao aumento na produção de ERO/ERN gerados pelas mitocôndrias (Giedt et al., 2012). A lesão tecidual e/ou morte celular ocorre como resultado do insulto isquêmico inicial, que é determinado principalmente pela magnitude e duração da interrupção no fornecimento de oxigênio e nutrientes pelo sangue. Durante a isquemia prolongada, ocorre uma diminuição nos níveis de ATP e diminuição do pH intracelular, como resultado do metabolismo anaeróbico e acúmulo de lactato (Kalogeris et al., 2012). A restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão) no tecido isquêmico tem demonstrado causar um forte dano tecidual, principalmente no endotélio, devido ao aumento na formação de espécies reativas, levando ao estresse oxidativo, responsável pelo dano tecidual pós-isquêmico (McCord, 1985, Zonov et al., 2013). Desta forma, a disfunção mitocondrial durante o processo aterosclerótico contribui para disfunção endotelial e, assim, intensifica o dano tecidual.

1.4 MODULAÇÃO DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE VIA Nrf2

Em condições normais, os níveis de ERO/ERN são finamente controlados pelo sistema de defesa enzimático antioxidante, incluindo superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), peroxiredoxinas (Prx), tioredoxinas (Trx), catalase, entre outros (Wang et al., 2013).

Muitas dessas enzimas antioxidantes são reguladas através de fatores de transcrição, como o Nrf2 (Nuclear factor-E2-related factor).

Em condições basais, o fator Nrf2 está na forma inativo quando ligado ao seu repressor citosólico Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein-1) e está predestinado para a degradação proteossomal dependente de ubiquitina (Itoh et al., 2004, Shay et al., 2012, Chepelev et al., 2013). O Keap1 apresenta vários resíduos de cisteína em sua estrutura, os quais podem sofrer oxidação e desta forma desfazer sua interação com o Nrf2, favorecendo a translocação deste fator do citoplasma para o núcleo. Além da oxidação de Keap1, a ativação e translocação nuclear de Nrf2 podem ser mediadas também através da fosforilação de resíduos específicos do Nrf2, via proteínas cinases, como p38MAPK, ERK, JNK, PI3K e PKC (Huang et al., 2002, Surh, 2003, Rojo et al., 2008, Vrba et al., 2013).

Após a ativação e translocação do Nrf2 ao núcleo, este se liga ao ARE (Elemento responsivo a antioxidante), o qual está presente na região promotora que codifica genes de enzimas antioxidantes e de detoxificação de fase II, conforme demonstrado na Figura 3. Enzimas, tais como hemeoxigenase-1 (HO-1), gama-glutamilcisteína sintetase (GGCS), peroxiredoxina-1 (Prx-1), NAD(P)H quinona oxireductase (NQO1), glutathiona S-transferase (GST), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase 2 (GPx2) entre outras, desempenham um importante papel na proteção contra estresse oxidativo e na manutenção do homeostase redox celular (Dinkova-Kostova et al., 2002, Kobayashi et al., 2006, Brigelius-Flohe e Maiorino, 2013).

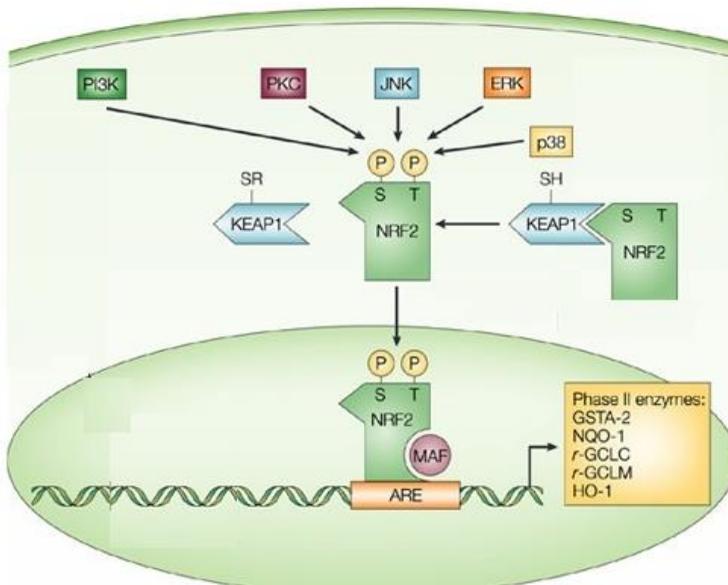


Figura 3: Ativação e translocação do fator Nrf2. Keap1 possui muitos resíduos de cisteína que podem sofrer oxidação ou modificação covalente liberando o fator Nrf2 e favorecendo sua translocação ao núcleo. Além disso, a fosforilação de resíduos de serina (S) e treonina (T) do Nrf2 por proteínas cinases, como PI3K, PKC, JNK, ERK e p38 induzem a dissociação de Nrf2 do Keap1 e subsequente translocação nuclear do Nrf2. No núcleo, Nrf2 se liga ao ARE e estimula a expressão gênica de enzimas antioxidantes e de detoxificação de fase II. Fonte: Adaptado de Surh, (2003).

Além do fator Nrf2, outros fatores de transcrição também estão envolvidos na proteção contra o estresse oxidativo, como os fatores de transcrição da família FoxO. A família FoxO, incluindo FoxO1, FoxO3, FoxO4 e FoxO6, participam no controle dos níveis de espécies reativas através de ativação da transcrição gênica de importantes enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase 2 (SOD2 ou MnSOD), catalase, peroxiredoxina 3 (Prx-3) e glutathiona peroxidase 1 (GPx1) (Kops et al., 2002, Chiribau et al., 2008, Papanicolaou et al., 2008, Hagenbuchner e Ausserlechner, 2013, Wang et al., 2013, Klotz et al., 2015).

1.5 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E A ATEROSCLEROSE

Considerando a “hipótese oxidativa da aterosclerose”, antioxidantes presentes na dieta têm atraído considerável atenção como agentes preventivos e terapêuticos. Inúmeras evidências obtidas por estudos *in vitro*, *in vivo* e intervenções controladas demonstram que o consumo de antioxidantes previne a progressão da aterosclerose (Otero et al., 2002, Bleys et al., 2006, Frederiksen et al., 2007). Há décadas pesquisadores buscam prevenir ou mesmo tratar as doenças cardiovasculares através de agentes farmacológicos e não farmacológicos.

O impactante estudo de Renaud and de Lorgeril (1992), que propôs o “Paradoxo Francês”, constatou que apesar do alto consumo de gordura saturada, os franceses eram muito mais protegidos contra o acometimento de doenças cardiovasculares do que outras populações. Este efeito foi atribuído ao consumo de vinho que reduziu em pelo menos em 40% o risco de mortalidade por doenças cardiovasculares naquela população (Renaud e de Lorgeril, 1992). Compostos naturais, como, por exemplo, os flavonóides presentes no vinho, apresentam diversas propriedades biológicas, particularmente no sistema cardiovascular, incluindo atividade antiaterogênica, antioxidante, vasodilatadora, anti-hipertensiva e propriedades anti-plaquetárias (Grassi et al., 2010).

Estudos mais recentes demonstram que alguns compostos com propriedades antioxidantes, sejam eles naturais ou sintéticos, apresentam além da capacidade de agirem diretamente como sequestradores ou *scavengers* de espécies reativas, também podem modular o sistema intrínseco de defesa antioxidante celular através da ativação de fatores de transcrição envolvidos na melhora da resposta antioxidante celular (de Bem et al., 2013, Fiuza et al., 2015).

A manutenção das defesas antioxidantes enzimáticas celulares é de grande importância na prevenção das doenças cardiovasculares, principalmente no sistema antioxidante vinculado a glutatona (GSH). Em células endoteliais e macrófagos, a GSH e enzimas relacionadas, como a glutatona peroxidase (GPx), constituem um importante sistema de defesa antioxidante (Blankenberg et al., 2003, Mimura e Itoh, 2015), sendo que distúrbios neste sistema podem acelerar o processo aterogênico (Blankenberg et al., 2003).

Estudos clínicos têm demonstrado que a diminuição da atividade da enzima GPx1 eritrocitária está associada ao risco aumentado de eventos cardiovasculares (Blankenberg et al., 2003,

Espinola-Klein et al., 2007). Além disso, a atividade da GPx1 está diminuída ou ausente em placas ateroscleróticas humanas e esta diminuição está associada ao desenvolvimento de lesões mais severas (Lapenna et al., 1998). Em camundongos apoE^{-/-}, modelo experimental de aterosclerose, a deficiência de GPx1 causa disfunção endotelial e estresse oxidativo vascular (Forgione et al., 2002), enquanto a superexpressão da GPx4, inibe o desenvolvimento da placa aterosclerótica por diminuir a peroxidação lipídica e inibir a sensibilidade de células vasculares a lipídios oxidados (Guo et al., 2008).

Considerando que a GPx é uma enzima chave na proteção do endotélio contra o estresse nitroxidativo e dano aterogênico, a modulação celular na atividade desta enzima pode ser uma alternativa para prevenir o desenvolvimento da aterosclerose. Desta forma, compostos com atividade mimética da GPx, como os compostos orgânicos de selênio, têm recebido grande atenção nos últimos anos, devido aos seus efeitos benéficos na proteção contra aterosclerose e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (de Bem et al., 2009, Hort et al., 2011, Stralio et al., 2013, Dobrachinski et al., 2014).

1.6 COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO COMO AGENTES ANTIATEROGÊNICOS

Diferentes classes de compostos orgânicos de selênio apresentam atividade mimética à GPx e podem decompor H₂O₂, ONOO⁻ e hidroperóxidos orgânicos utilizando GSH ou outros compostos tíois como agentes redutores (Nogueira et al., 2004).

O primeiro e mais estudado composto foi o Ebselen. Seu mecanismo protetor foi associado a sua capacidade mimética à GPx e sua capacidade de atuar como *scavenger* de ERO e ONOO⁻ (Sies, 1993, Sies e Masumoto, 1997). O ebselen demonstrou ações anti-inflamatória e antioxidante em diversos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (Schewe, 1995, Porciuncula et al., 2003, Brodsky et al., 2004). Além disso, chegou a ser empregado com relativo sucesso em estudos clínicos com pacientes com aneurisma hemorrágico e isquemia aguda (Parnham e Sies, 2000).

Assim como o ebselen, outro composto organoselênio mimético à GPx, que tem se destacado nos últimos anos é o (PhSe)₂. Um fato importante em relação à capacidade antioxidante do (PhSe)₂ é que, de acordo com o mecanismo catalítico proposto para este composto, para a detoxificação de peróxidos, inicialmente ele reage com um gruppamento

tiol (RSH) (principalmente GSH) originando um selenilsulfeto, o qual reage com um segundo equivalente de GSH, formando um selenol (-SeH). Este selenol, então, reduz o H_2O_2 ou peróxidos lipídicos em H_2O , formando o ácido selênico, conforme mostrado na Figura 4. Desta forma, este composto utiliza equivalentes redutores à custa do consumo de GSH (Nogueira e Rocha, 2010).

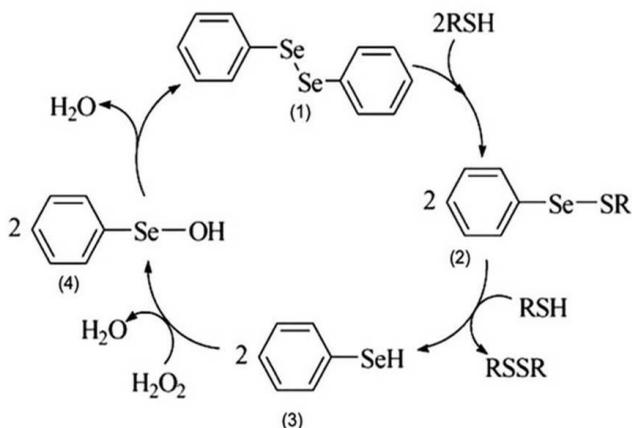


Figura 4: Ciclo catalítico proposto para o $(\text{PhSe})_2$. Inicialmente o $(\text{PhSe})_2$ (1) reage com um grupamento tiol (RSH) originando um selenilsulfeto, (2) o qual reage com um segundo equivalente de RSH formando um selenol, (3) o qual reduz o H_2O_2 em H_2O , e gera ácido selênico (4) que reage com uma molécula de hidrogênio regenerando $(\text{PhSe})_2$. Fonte: Nogueira e Rocha (2010).

Recentes trabalhos do nosso grupo têm demonstrado seu potencial farmacológico em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* relacionados à aterosclerose (Nogueira e Rocha, 2010, de Bem et al., 2013, Stralio et al., 2013, Hort et al., 2014, Fiuza et al., 2015). De Bem e colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento por via oral com $(\text{PhSe})_2$ reduziu a hipercolesterolemia e o estresse oxidativo em coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol (de Bem et al., 2009) e foi capaz de inibir a oxidação da LDL humana isolada *in vitro*, sendo este efeito relacionado a sua atividade tiol-peroxidase (de Bem et al., 2008). Em camundongos hipercolesterolêmicos deficientes para receptor LDL ($\text{LDLr}^{-/-}$) o $(\text{PhSe})_2$ reduziu as lesões ateroscleróticas e a

marcação arterial de 3-nitrotirosina e malonaldeído e melhorou o tônus vascular dependente do endotélio. Esses importantes efeitos foram acompanhados pela diminuição do recrutamento e infiltração de monócitos da circulação para a camada íntima arterial e redução da produção da citocina inflamatória MCP-1 (Hort et al., 2011).

Buscando entender os mecanismos moleculares referentes ao efeito protetor do $(\text{PhSe})_2$, demonstramos em células endoteliais de aorta bovina (BAEC) que o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ melhorou o sistema antioxidante vinculado à GSH através do aumento do conteúdo intracelular de GSH e da atividade e expressão da GPx protegendo estas células da morte celular e nitração proteica induzida pelo ONOO^- (de Bem et al., 2013). Em outro trabalho de nosso grupo, verificamos que o $(\text{PhSe})_2$ protegeu as células endoteliais da disfunção mitocondrial induzida pela LDLox por diminuir o estresse oxidativo nestas células (Hort et al., 2014). A ativação do sistema antioxidante mediado pela translocação do Nrf2 pela ação do $(\text{PhSe})_2$ parece ter papel fundamental no mecanismo protetor deste composto (de Bem et al., 2013). Por outro lado, não se pode descartar a contribuição do efeito antioxidante direto do intermediário selenol por sua atividade tiol-peroxidase, na redução de peróxidos orgânicos e inorgânicos (Bartolini et al., 2015).

A ativação dos macrófagos é um processo crucial na iniciação da resposta inflamatória característica da aterogênese. Sabe-se que a LDLox é capaz de induzir a produção de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias por mediar a ativação do fator NF- κ B em macrófagos. Neste sentido, já foi demonstrado que o $(\text{PhSe})_2$ diminuiu a produção de mediadores inflamatórios, como TNF α e MCP-1, induzidos pela exposição à LDLox em uma linhagem de macrófagos J774, demonstrando efeitos modulatórios na via inflamatória relacionada ao fator NF- κ B (Hort et al., 2011).

Em células endoteliais, o estresse nitroxidativo mediado por oxidantes, tais como LDLox, ONOO^- e $\text{O}_2^{\cdot-}$, agentes envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose, comprometem a função mitocondrial por promover um aumento da produção de ONOO^- intracelular, reduzindo a biodisponibilidade de $\cdot\text{NO}$ e, por consequência, induzindo a uma disfunção endotelial. Enzimas mitocondriais, como as dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons e a ATP-sintase, são particularmente vulneráveis a ataques por ONOO^- , diminuindo a geração de ATP, induzindo a formação do poro de transição mitocondrial, dissipando o potencial de membrana e permitindo o efluxo de várias moléculas pró-apoptóticas, incluindo citocromo c (Szabo et al., 2007).

Neste sentido, estudos têm sido realizados avaliando o efeito do $(\text{PhSe})_2$ sobre a função mitocondrial. No trabalho de Hort e colaboradores (2014) verificou-se que o $(\text{PhSe})_2$ tem a capacidade de modular diversos parâmetros relacionados ao consumo de oxigênio em células endoteliais. O consumo de oxigênio relativo à síntese de ATP e a capacidade respiratória máxima foram modulados positivamente pelo $(\text{PhSe})_2$, conferindo maior resistência mitocondrial da células endoteliais frente ao dano oxidativo induzido pela LDLox. Os resultados recentes de Fiuza e colaboradores (2015) também apontam para o efeito modulador do $(\text{PhSe})_2$ sobre a função mitocondrial. Neste estudo, os autores demonstraram que a disfunção mitocondrial e a consequente disfunção endotelial induzida por um doador de ONOO^- foi prevenida pelo tratamento com $(\text{PhSe})_2$. Este efeito foi relacionado com sua habilidade em melhorar o sistema antioxidante intracelular através do aumento da expressão de diferentes isoformas da enzima peroxiredoxina (Prx-1 e 3), enzimas fortemente eficientes na detoxificação do ONOO^- .

Esse conjunto de trabalhos indicam claramente que o $(\text{PhSe})_2$ melhora o ambiente redox intracelular e, desta forma, protege a mitocôndria e as demais funções celulares do efeito de mediadores oxidativos envolvidos na aterogênese. Os efeitos protetores deste composto são em parte atribuídos a capacidade deste em ativar a via do Nrf2, possivelmente por oxidar resíduos $-\text{SH}$ do inibidor Keap1. Todavia, a participação de mecanismos adjacentes a ativação do Nrf2, como o controle das cascatas de fosforilação, ainda não foram estudados para o $(\text{PhSe})_2$. O esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no papel protetor do $(\text{PhSe})_2$, bem como do intermediário selenol, no contexto da aterosclerose e das condições isquêmicas adjacentes, contribuirá para o entendimento de seu mecanismo de ação e da participação da modulação redox e mitocondrial na aterosclerose.

2 JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morbidade e mortalidade nos países ocidentais. A aterosclerose é a condição patológica que antecede a maioria dos eventos cardiovasculares e diversos processos bioquímicos, principalmente aqueles relacionados à produção excessiva de espécies reativas, estão associados com o desenvolvimento da doença. Considerando o aumento exponencial na incidência das doenças cardiovasculares, a melhor compreensão acerca dos mecanismos envolvidos na patofisiologia desta enfermidade e a busca por novos alvos terapêuticos tornam-se imperativas.

Nesse sentido, o composto orgânico de selênio $(\text{PhSe})_2$ tem recebido grande destaque em nossas pesquisas devido as suas diversas propriedades farmacológicas, principalmente as atividades antioxidante, antiinflamatória e antiaterogênica. Inicialmente, as propriedades antioxidantes deste composto foram atribuídas a sua capacidade de mimetizar a atividade da enzima glutathione peroxidase. Porém, recentes estudos sugerem que este composto também possa melhorar as defesas antioxidantes celulares através da ativação de fatores de transcrição responsáveis pela indução gênica de importantes enzimas antioxidantes. Porém, pouco se sabe como o $(\text{PhSe})_2$ modula este sistema. Neste sentido, o entendimento de como este composto promove uma melhora no sistema antioxidante celular é de grande importância, uma vez que uma diminuição nos níveis de estresse oxidativo poderia ajudar no tratamento ou mesmo prevenir doenças cardiovasculares.

Baseado nessas evidências, acreditamos na possibilidade futura do emprego de compostos orgânicos de selênio, como o $(\text{PhSe})_2$ como eficientes agentes preventivos e terapêuticos em patologias relacionadas ao estresse oxidativo, em especial a aterosclerose. Acreditamos que a concretização deste estudo contribua para novas possibilidades de tratamento das doenças cardiovasculares.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a capacidade do $(\text{PhSe})_2$ em ativar vias de transcrição relacionadas à expressão gênica de enzimas antioxidantes e modulação da resposta inflamatória, além de avaliar a citoproteção frente a danos oxidativos relacionados ao processo aterogênico em cultura celular de macrófagos e células endoteliais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar o mecanismo citoprotetor do $(\text{PhSe})_2$ frente a toxicidade induzida pela exposição à LDLox sobre a geração de ERO/ERN, $\Delta\Psi_m$, formação de células espumosas, ativação de MMP-9 e NF- κ B em cultura de macrófagos murinos J774;
2. Investigar o efeito do $(\text{PhSe})_2$ sobre a ativação do fator de transcrição Nrf2 e a modulação do sistema antioxidante, como GSH, GGCS, GPx, HO-1, Prx-1 e MnSOD em cultura de macrófagos murinos J774;
3. Avaliar a modulação da atividade da enzima GGCS induzida pelo $(\text{PhSe})_2$, através do uso de inibidores específicos da cascata de fosforilação responsável pela ativação de Nrf2 em cultura de macrófagos;
4. Verificar se a diminuição do pH, característica de situações isquêmicas, é capaz de modificar a cinética de reação entre o selenol (forma reduzida do $(\text{PhSe})_2$) e o ONOO^- ;
5. Avaliar o efeito citoprotetor do $(\text{PhSe})_2$ em células endoteliais de aorta bovina (BAEC) submetidas à privação de oxigênio e glicose (OGD) e seguida de reperfusão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COMPOSTO DISSELENETO DE DIFENILA (PhSe)₂

O disseleneto de difenila (PhSe)₂ foi sintetizado de acordo com métodos previamente descritos (Paulmier, 1986). Análises de ressonância magnética nuclear e espectros mostraram que o composto sintetizado apresentou dados analíticos e espectrofotométricos condizentes com a estrutura química do (PhSe)₂. A pureza química (99,9%) do (PhSe)₂ foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. A síntese do composto foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, sob supervisão do Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha. Todos os demais produtos químicos de grau analítico foram obtidos a partir de fornecedores comerciais.

Para a realização dos tratamentos utilizando cultura de células o composto foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído em meio de cultura (DMEM) para conter no máximo 0,1% de DMSO.

4.2 CULTIVO CELULAR DE MACRÓFAGOS E CÉLULAS ENDOTELIAIS

Macrófagos murinos J774A.1 foram obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro Cell (BCRJ: 0121, Rio de Janeiro, Brasil). As células endoteliais da aorta bovina (BAEC) foram obtidas a partir da aorta torácica de bovinos adultos e purificadas através de tratamento com colagenase (2 mg/mL) como previamente descrito (Peluffo et al., 2009). Ambas as células foram cultivadas com Dulbecco Modified Eagle Médium (DMEM) suplementado com 2 mM de glutamina, 10 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (FBS), mantidos em atmosfera de 5% de CO₂ e 37°C. Todos os experimentos foram realizados com uma confluência celular de 80% e o tratamento das células com (PhSe)₂ foi realizado em DMEM com 0,5% de FBS.

4.3 ISOLAMENTO DE LDL E OXIDAÇÃO

A LDL foi isolada a partir de plasma humano fresco por ultracentrifugação utilizando gradiente de densidade descontínua, conforme descrito por Bem e colaboradores (2008). Ao plasma foi adicionado EDTA (1 mg/mL) e sacarose (concentração final de 0,5%)

para evitar a agregação de LDL. Cinco mL de plasma-EDTA foi ajustado a uma densidade de 1,22 g/mL com KBr (0,326 g/mL) e em seguida foi adicionado cloreto de sódio (1,006 g/mL). A ultracentrifugação foi executada a 191.000xg por 2 horas a 4 °C em ultracentrífuga Hitachi Himac CP80WX, rotor 40ST. Após este processo, a camada contendo LDL (porção superior) foi coletada e dialisada (25 x 16 mm) durante 16 horas a 4°C em tampão fosfato 148 mM (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, KCl 2,6 mM, NaCl 136mM, pH 7,4). As amostras isoladas de LDL (1 mg de proteína/mL) foram oxidadas a 37°C na presença de 10 µM de CuSO₄, durante 16 horas, para produzir LDL oxidada (LDL_{ox}). Em seguida, foi adicionado EDTA 1,5 mM e as amostras foram dialisadas em tampão fosfato 148 mM durante 24 horas a 4°C. O teor de proteína da LDL isolada foi determinado pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). O uso da LDL humana neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (nº 943/11).

4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO CELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

A produção celular de ERO em macrófagos expostos a LDL_{ox} foi detectada utilizando a sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Macrófagos (2,0 x 10⁵ células/poço) foram semeados em placas de 24 poços e, após atingirem uma confluência de 80%, foram expostos a LDL_{ox} durante 1 hora. Depois disso, as células foram incubadas com a DCFH-DA (10 µM) durante 30 minutos a 37°C, lavadas com PBS e ressuspensas para a determinação de ERO por citometria de fluxo (FACS Canto II, BD Bioscience). O efeito do (PhSe)₂ sobre a geração de ERO também foi avaliado. Para isso, as células foram pré-tratadas por 24 horas com (PhSe)₂ (1 µM) ou veículo antes da adição de LDL_{ox} (100 µg/mL). Os resultados foram expressos como porcentagem do controle (células não tratadas).

4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) dos macrófagos e das BAEC foi avaliado através da sonda 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianina iodado (JC-1) (Reers et al., 1991). JC-1 é um composto lipofílico que entra seletivamente na membrana e é utilizado como um indicador de alterações no potencial de membrana

mitocondrial. Em células com alto $\Delta\Psi_m$, JC-1 forma complexos conhecidos como J-agregados com intensa fluorescência vermelha. Por outro lado, em células com baixo $\Delta\Psi_m$, JC-1 permanece na forma monomérica, que apresenta fluorescência verde (Cossarizza et al., 1993). Para avaliar o efeito do $(\text{PhSe})_2$ sobre o $\Delta\Psi_m$ de macrófagos expostos à LDLox, estas células foram semeadas em placas de 24 poços (2×10^5 células/poço) e pré-tratadas com $(\text{PhSe})_2$ ($1 \mu\text{M}$) ou veículo por 24 horas, seguido pela exposição com LDLox ($100 \mu\text{g/mL}$) ou $1 \mu\text{M}$ FCCP (controlo positivo) durante 3 horas adicionais. Para avaliar o efeito do $(\text{PhSe})_2$ sobre o $\Delta\Psi_m$ em BAEC submetidas ao protocolo de OGD, as células foram semeadas em placas de 24 poços (2×10^5 células/poço) e pré-tratadas com $(\text{PhSe})_2$ ($1 \mu\text{M}$) ou veículo por 24 horas e após submetidas ao protocolo de OGD.

Após os tratamentos, tanto os macrófagos quanto as células endoteliais foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com JC-1 ($5 \mu\text{M}$) por 20 minutos a 37°C . Ao final da incubação, as células foram novamente lavadas e $500 \mu\text{L}$ de PBS foram adicionados em cada poço para realizar a leitura. A intensidade da fluorescência foi medida utilizando um leitor de microplacas fluorimétrico (Tecan) com excitação de 488 nm e emissão a 525 nm e 590 nm , que representam a forma agregada (fluorescência vermelha) e monomérica (fluorescência verde), respectivamente. As imagens dos macrófagos foram obtidas a partir de três campos escolhidos aleatoriamente usando um microscópio de epifluorescência invertido (Olympus IX70). O $\Delta\Psi_m$ foi inferido a partir da relação da intensidade de fluorescência vermelho/verde.

4.6 VIABILIDADE CELULAR E MORFOLOGIA NUCLEAR

A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (Mosmann, 1983). Em células viáveis, o MTT é reduzido por enzimas desidrogenases mitocondriais a formazan, um composto violeta que pode ser mensurado espectrofotometricamente. Para realização deste teste, as células foram semeadas em placas de 96 poços e após os tratamentos com LDLox ou exposição ao protocolo de OGD, os macrófagos e as BAEC, respectivamente, foram incubadas por 24 horas e após foi adicionado $200 \mu\text{L}$ de solução de MTT ($0,5 \text{ mg/mL}$) por 2 horas a 37°C . Em seguida, a solução de MTT foi removida e $200 \mu\text{L}$ de DMSO/poço foram adicionados para dissolver os cristais de formazan intracelulares formados. A absorbância foi determinada em 540 nm

usando um leitor de microplacas (Tecan) e os resultados expressos como porcentagem do controle (células não tratadas). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

O método de Hoechst foi utilizado para avaliar a morfologia nuclear e determinar o tipo de morte celular induzida pelo protocolo de OGD nas células endoteliais. Para isso, após a OGD, as BAEC foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS (pH 7,4) durante 15 min a temperatura ambiente e, posteriormente, coradas com o corante Hoechst 33258 (5 µg/mL) durante 15 min, lavadas com PBS e preparadas usando lamínula contendo PBS/glicerol (3:1, v/v). As células foram examinadas através de um microscópio de epifluorescência (Nikon). Os núcleos corados foram avaliados de acordo com as características de condensação e coloração da cromatina. Os núcleos apoptóticos foram identificados pela cromatina condensada e fragmentação nuclear. Os resultados foram expressos como porcentagem de apoptose em relação ao controle.

4.7 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO EM CÉLULAS ESPUMOSAS

O ensaio para identificar a formação de células espumosas (foam cells) foi realizada utilizando o método de coloração de Oil-Red O (Koopman et al., 2001). Os macrófagos ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram semeados sobre lâminas de vidro “coverslips” inseridas em placa de 12 poços, pré-tratados com (PhSe)₂ (1 µM) ou veículo durante 24 horas, e em seguida expostos a LDLox (100 µg/mL) por mais 3 horas. Após a incubação com LDLox, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com Oil-red 0,3% durante 10 min. Hematoxilina foi usado como contracoloração. As imagens das células foram obtidas por microscopia confocal (Leica DMI6000 B Microscope), utilizando um conjunto de filtros de 546 nm. Dez imagens foram capturadas de cada grupo e a intensidade de pixels total foi determinada utilizando o software Image J e o conteúdo de lipídeos foram expressos como densidade óptica (OD).

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMP-9)

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases dependentes do zinco, capazes de degradar todos os componentes moleculares de matriz extracelular. Para avaliar a atividade

de MMP-9, foram usadas duas técnicas diferentes, zimografia em gelatina e a atividade da collagenase IV. Para estes ensaios, os macrófagos ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram semeados em placa de 12 poços e pré-incubados com $(\text{PhSe})_2$ ($1 \mu\text{M}$) ou veículo durante 24 horas, seguidos de exposição a LDLox ($100 \mu\text{g/mL}$) por 24 horas.

4.8.1 Zimografia

Os sobrenadantes ($50 \mu\text{g/mL}$ de proteína total) da cultura de macrófagos, após realizado o pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ e expostos à LDLox, foram submetidos a SDS-PAGE em gel de 7,5% (w/v) de poliácridamida copolimerizado com 1,5% de gelatina como substrato, conforme descrito (Kleiner e Stetler-Stevenson, 1994). Após a eletroforese, os géis foram corados com Azul Brilhante de Coomassie. A atividade proteolítica foi identificada pela formação de uma banda clara contra o fundo azul da gelatina corada. A MMP-9 foi identificada usando marcador de peso molecular (92 kDa). Os géis foram digitalizados e a intensidade das bandas foi quantificada utilizando software Quantity One (Bio-Rad, EUA). Os resultados foram expressos como intensidade relativa de MMP-9 em relação ao controle.

4.8.2 Atividade enzimática das gelatinases ou collagenases IV

A atividade das gelatinases ou collagenases IV nos sobrenadantes de cultura de macrófagos foi determinada utilizando um kit de ensaio enzimático fluorimétrico Gelatinase/Collagenase (Molecular Probes, USA). Os sobrenadantes ($50 \mu\text{g/mL}$ de proteínas) foram coletados após o tratamento descrito anteriormente na zimografia e incubados com substrato específico para MMP, de acordo com as instruções do fabricante do kit. A clivagem do substrato por MMP (gelatinases ou collagenase IV) resulta em um aumento do sinal de fluorescência lido em um leitor de microplacas de fluorescência (Tecan) utilizando um comprimento de onda de excitação de 495 nm e emissão a 515 nm. Os resultados foram expressos como atividade da collagenase IV em relação ao controle.

4.9 DETERMINAÇÃO DE NITRITO

A determinação de nitrito, utilizado como um indicador da produção de óxido nítrico (NO), foi mensurada no sobrenadante da cultura através da reação de Griess (Schulz et al., 1999). Os macrófagos

($2,0 \times 10^5$ células/poço) foram cultivados em placas de 24 poços e pré-tratados com $(\text{PhSe})_2$ ($1 \mu\text{M}$) ou veículo por 24 horas e depois expostos à LDLox (100 ou $200 \mu\text{g/mL}$) por mais 24 horas. Após este período, os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de nitrito, onde $100 \mu\text{L}$ de cada amostra foi adicionada juntamente com $100 \mu\text{L}$ de reagente de Griess, incubado a temperatura ambiente durante 30 min no escuro, e a absorvância foi medida usando comprimento de onda de 540 nm em leitor de microplacas (Tecan). A quantidade de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão, utilizando nitrito de sódio. Os resultados foram expressos como porcentagem de aumento da produção de nitrito em relação ao controle.

4.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Os níveis intracelulares de GSH foram determinados por ensaio fluorimétrico (Hissin e Hilf, 1976). Macrófagos ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram cultivados em placa de 6 poços e incubados com $(\text{PhSe})_2$ ($1 \mu\text{M}$) ou veículo nos tempo de 1, 3, 6 e 24 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas com $0,6 \text{ M}$ de ácido perclórico e PBS 100 mM contendo EDTA 5mM ($\text{pH } 8,0$), utilizando um poço por amostra. Após, foram centrifugadas a 14.000xg a 4°C durante 10 min. Volume de $100 \mu\text{L}$ de sobrenadante foi incubado com $100 \mu\text{L}$ de ortoftaldeído ($0,1\%$ w/v em metanol) e $1,8 \text{ mL}$ de Na_2HPO_4 100 mM durante 15 min à temperatura ambiente. A intensidade da fluorescência foi lida em um espectrofluorímetro (Tecan), utilizando um comprimento de onda de emissão de 420 nm e excitação de 350 nm . O conteúdo de GSH celular foi calculado utilizando curva padrão de GSH e expressos como μg de GSH por mg de proteína.

4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

A atividade da glutatona peroxidase (GPx) foi determinada de acordo com o método de Wendel (1981), utilizando hidróperóxido de terc-butila (tBuOOH) como substrato. A GPx catalisa a redução de H_2O_2 , bem como outros peróxidos orgânicos, utilizando a GSH como co-substrato e gerando glutatona oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela glutatona redutase (GR) às custas de NADPH. Macrófagos ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram cultivados em placa de 6 poços e incubados com $(\text{PhSe})_2$ ($1 \mu\text{M}$) ou veículo nos tempo de 1, 3, 6 e 24 horas. Após o

tratamento, as células foram coletadas com 200 μL de tampão Hepes 20 mM e Triton 0,1% e centrifugadas a 16.000xg por 20 minutos a 4°C. Foi utilizado um poço por amostra. A atividade da enzima foi determinada através da monitoração do consumo de NADPH a 340 nm. Volume de 100 μL de amostra foi adicionado ao meio de reação contendo tampão de fosfato de potássio (TFK) 50 mM, pH 7,0, EDTA 2,5 mM, GSH 1 mM, GR 0,2 U/mL, tBuOOH 0,2 mM, NADPH 0,2 mM. A atividade da GPx foi expressa como nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH ($6,22 \times 10^3/\text{M}/\text{cm}$).

4.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GAMA-GLUTAMILCISTEINA SINTETASE (GGCS) EC 6.3.2.2

A atividade da GGCS foi determinada conforme descrito (Seelig e Meister, 1985) com pequenas modificações. Macrófagos ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram cultivados em placa de 6 poços e incubados com $(\text{PhSe})_2$ (1 μM) ou veículo nos tempo de 1, 3, 6 e 24 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas com 200 μL de Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), MgCl_2 5 mM e Triton 0,5%, centrifugadas a 12.500xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi usado para determinar a atividade da enzima através da oxidação de NADH em 340 nm em um meio de reação contendo tampão Tris-HCl (pH 8,0) 0,1 M, KCl 150 mM, ATP- Na_2 5 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, L-glutamato 10 mM, L- α -aminobutirato 10 mM, MgCl_2 20 mM, NADH 2 mM e 17 μg de piruvato cinase/lactato desidrogenase. Os resultados foram expressos como nmol NADH/min/mg proteína.

4.13 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA (IMUNOFLUORESCÊNCIA) PARA NF-kB E Nrf2

Para avaliar a translocação nuclear dos fatores de transcrição NF-kB e Nrf2, utilizamos ensaio de imunofluorescência ou imunocitoquímica. Os macrófagos foram semeados em lâminas de vidro “coverslips” inseridas em placas de 12 poços ($2,5 \times 10^5$ células/poço). Para a avaliação de NF-kB, os macrófagos foram incubados com $(\text{PhSe})_2$ (1 μM) por 24 horas seguido de 1 hora com LDLox (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para avaliar a translocação nuclear de Nrf2, os macrófagos foram incubados com $(\text{PhSe})_2$ (1 μM) ou veículo nos tempo de 1, 3, 6 e 24 horas. Após os tratamentos, as células foram lavadas e fixadas com

paraformaldeído (PFA) 4% por 12 minutos e bloqueadas com albumina 5% em TBS-T 0,1% por 1 hora em temperatura ambiente.

A translocação nuclear de Nrf2 foi avaliada usando anticorpo monoclonal de coelho anti-Nrf2 (1:100, Santa Cruz Biotechnology) por 24 horas a 4°C, seguido pela incubação com anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado com FITC (1:400, Vector Laboratories) por 1 hora. A translocação nuclear de NF-κB foi avaliada utilizando um anticorpo monoclonal de coelho anti-NF-κB P-65 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, EUA), durante 24 horas a 4°C, seguido da incubação com anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado com FITC (1:100, Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora. O núcleo celular foi marcado com Hoechst 33258 (5 µg/mL) por 2 minutos. As imagens foram escolhidas aleatoriamente entre oito a dez campos e capturadas utilizando um microscópio de fluorescência (Olympus BX41) acoplado a um sistema de captura de imagens (Nikon Digital sight DS-Qi1Mc).

4.14 PREPARO DAS FRAÇÕES CITOSÓLICAS E NUCLEARES PARA AVALIAR O IMUNOCONTEÚDO DE Nrf2 POR WESTERN BLOTTING

O imunocnteúdo de Nrf2 em frações citosólicas e nucleares foi detectado com o uso de anticorpos específicos utilizando ensaio de *Western blotting*. Para isso, os macrófagos ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram cultivadas em placa de 6 poços e incubadas com (PhSe)₂ (1 µM) ou veículo nos tempo de 1, 3, 6 e 24 horas. Para o preparo destas frações, foram usados dois poços por amostra. Depois do tratamento, as células foram coletadas com 200 µL de tampão de lise A gelado, contendo Hepes 10 mM (pH 7,9), KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, MgCl₂ 2 mM, Na₃VO₄ 1 mM, β-glicerofosfato 10 mM, ditiotreitól 1 mM, Triton 1% e coquetel de inibidores de proteases (Sigma, P2714). As amostras permaneceram no gelo por 15 minutos, após foram vigorosamente agitadas e centrifugadas a 15.000xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo a fração citosólica foi separado e o pellet foi ressuspendido com o tampão de lise B gelado, contendo Hepes 20 mM (pH 7,4), KCl 50 mM, NaCl 420 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 2 mM, Na₃VO₄ 2 mM, β-glicerofosfato 10 mM, ditiotreitól 1 mM, Triton 1%, glicerol 25% e coquetel de inibidores de proteases (Sigma, P2714). As amostras permaneceram em gelo por 15 minutos e após foram homogenizadas vigorosamente em vortex e, finalmente, centrifugadas a 15.000xg por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes contendo a fração

nuclear foram separados e armazenados a -80°C para posterior análise por *Western blotting*.

4.15 ANÁLISE DO IMUNOCONTEÚDO DE Nrf2, HO-1, Prx-1, GPx1, GPx2, MnSOD E iNOS

Os níveis proteicos de Nrf2 (frações citosólicas e nucleares) (68 kDa, HO-1 (32 kDa), Prx-1 (22 kDa), GPx1 (23 kDa), GPx2 (23 kDa), MnSOD (25 kDa) e iNOS (131 kDa) foram analisados por *Western blotting*. Macrófagos ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram cultivados em placa de 6 poços e receberam os tratamentos com $(\text{PhSe})_2$ ou veículo ou LDLox. Para cada amostra foram usados dois poços da placa de 6 poços. Com exceção das frações citosólica e nuclear de Nrf2, que foram coletadas com tampões específicos, as demais amostras foram coletadas utilizando tampão de lise contendo Tris-HCl 1 mM (pH 7,4), NaCl 2,5 M, EDTA 0,25 M, Triton X-100 1%, ditiotretitol 1 mM, Na_3VO_4 5 mM, β -glicerol fosfato 1mM e coquetel de inibidores de proteases (Sigma, P2714). As amostras foram coletadas e centrifugadas a $15.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C . O sobrenadante foi separado e $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína foram submetidas a separação por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando sistema de transferência semi-seca (TE 70 Semi-dry Transfer Unit, GE Healthcare Bio-Science). As membranas foram bloqueadas por 1 hora com leite desnatado 5% em TBS-T. Após lavagem e bloqueio, as membranas foram incubadas durante a noite com anticorpo primário policlonal de cabra anti-HO-1 (1:500), anticorpo primário policlonal de coelho anti-Nrf2 (1:300), anti-GPx1 e anti-GPx2 (1:250), anti-MnSOD (1:1000), anti-iNOS (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology) e Prx-1 (1:5000) (Milipore). Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP anti-cabra ou anti-coelho (1:2000; Santa Cruz Biotechnology) e os imunocomplexos foram visualizados utilizando o sistema de detecção de quimioluminescência ECL (GE Healthcare) no equipamento Fotodocumentador Chemidoc (Biorad). A análise da carga proteica de cada banda foi confirmada com uso da β -Actina (42 kDa) (1:2000) e a fração nuclear de Nrf2 utilizando Lamin B1 (66 kDa) (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Os níveis de proteína foram quantificados por densidade óptica usando o programa Image-J 1.36b software.

4.16 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE REAÇÃO ENTRE ONOO⁻ E $(\text{PhSe})_2$ EM DIFERENTES pH

A cinética da reação entre o peroxinitrito (ONOO^-) e o $(\text{PhSe})_2$, na sua forma reduzida, ou seja o selenol, foi realizada utilizando o sistema espectrofotométrico *stopped flow* com comprimento de onda 302 nm (SF MV17, Applied Photophysics). Para ocorrer a formação do selenol, diferentes concentrações de $(\text{PhSe})_2$ foram incubadas com DTT em excesso (1 mM) em fosfato de sódio 100 mM, DPTA 0,2 mM, com variação de pH de 6,4 a 8,0, temperatura de 37°C, por um minuto no interior de uma seringa do aparelho e após, rapidamente injetado o conteúdo da segunda seringa, a qual contém ONOO^- . A partir deste momento, a reação passa a ser detectada. As constantes de velocidade observadas da decomposição do ONOO^- na ausência ou na presença dos compostos foram obtidos por traços experimentais ajustados em curvas exponenciais com pontos finais. A partir do gráfico das constantes de velocidade de decomposição do ONOO^- verso diferentes concentrações de selenol em diferentes pH, a constante de velocidade de segunda ordem para a reação foi determinada. Como controle foi realizado reações de ONOO^- com DTT (1 mM) na ausência de $(\text{PhSe})_2$.

4.17 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ONOO^-

A sonda fluorescente dihidrorodamina (DHR) reage com os radicais livres derivados do ONOO^- , mas não diretamente com $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou $\cdot\text{NO}$ (Radi et al., 2001). A oxidação da sonda DHR foi utilizada para avaliar o efeito do $(\text{PhSe})_2$ na produção de ONOO^- em BAEC submetidas ao protocolo de OGD. As células foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços e tratadas com $(\text{PhSe})_2$ (0,5 e 1 μM) ou veículo por 24 horas ou no momento da OGD. Após, as células foram lavadas com dPBS (NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, CaCl_2 0,9 mM, MgCl_2 0,5 mM, KCl 2,7 mM e KH_2PO_4 1,45 mM (pH 7.4), suplementado com glicose 5,6 mM e L-arginina 1 mM) e incubadas com 10 μM de DHR por 30 minutos a 37°C. A detecção de rodamina 123, um produto da oxidação da DHR, foi determinada em espectrofluorímetro leitor de placa com comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 525 nm e 590 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle.

4.18 OXIMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO

As taxas de consumo de oxigênio foram medidas polarograficamente usando respirometria de alta resolução (Oroboros

Oxygraph-O₂K). Para avaliar a função mitocondrial das células endoteliais submetidas ao protocolo de OGD, as células foram pré-tratadas com (PhSe)₂ (1 µM) ou veículo durante 24 horas, seguido pela exposição a OGD. Após o período de exposição, as células foram coletadas usando uma solução de tripsina a 0,05%/EDTA 1 mM. As células (1,0 x 10⁶ células/mL) foram centrifugadas a 1.200xg durante 3 minutos e ressuspendidas em DMEM livre de soro para as medições do consumo de O₂ de células intactas em câmara fechada do respirômetro, com volume final de 2 mL. O processo inicia com a determinação da respiração basal, a qual é definida como a respiração em meio de cultura de células, sem substratos ou efetores adicionais. Depois de estabilizado o fluxo respiratório, a ATP sintase foi inibida com oligomicina (1 µg/mL), a fim de estimar a proporção do consumo de oxigênio acoplada a síntese de ATP. Para determinar o consumo máximo de oxigênio que as células podem sustentar, o ionóforo FCCP, desacoplador da fosforilação oxidativa, foi titulado como previamente descrito (50 nM por injeção) (Hutter et al., 2004). Após titulação com FCCP, a cadeia transportadora de elétrons foi inibida com Antimicina A (1 µg/mL) e a taxa de fluxo de oxigênio detectado nestas condições foi definida como o consumo de oxigênio extra-mitocondrial. A aquisição e a análise dos dados foram feitas utilizando o programa DatLab software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). Os parâmetros calculados foram: 1) RCR (Capacidade respiratória máxima/oligomicina) ($RCR = \frac{FCCP-AA}{Oligo-AA}$), 2) Capacidade de reserva respiratória (Capacidade de reserva = $\frac{FCCP-AA}{Basal-AA}$) (Máxima capacidade respiratória/respiração basal) e 3) Consumo de O₂ acoplado a síntese de ATP (ATP Linked = $Basal-AA - Oligo-AA$).

4.19 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas nos lisados celulares foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão de proteína.

4.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados são expressos como média ± erro padrão médio de pelo menos três experimentos independentes. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo post-hoc de Tukey ou Duncan conforme descrito na legenda dos resultados. As análises

estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 CAPITULO 1

Disseleneto de difenila (PhSe)₂ modula a citotoxicidade induzida pela LDLox em macrófagos por melhorar a sinalização redox.

Diphenyl diselenide modulates oxLDL-induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling

Marcos Raniel Stralio¹, Mariana Appel Hort¹, Bianca Fiuza¹, João Batista Teixeira da Rocha², Marcelo Farina¹, Gustavo Chiabrando³, Andreza Fabro de Bem^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040900;

²Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105900;

³Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina.

Artigo publicado no periódico: *Biochimie* 95(2013) 1544-1551

Na primeira parte desta tese, buscamos investigar o efeito protetor do $(\text{PhSe})_2$ sobre a citotoxicidade induzida pela exposição à LDLox em cultura de macrófagos, buscando identificar os mecanismos envolvidos na citoproteção causada por este composto.

Neste estudo, utilizamos macrófagos murinos da linhagem J774.A1 e todos os protocolos estão descritos na seção de material e métodos desta tese.

A literatura comprova que a exposição de macrófagos à LDLox promove um aumento da produção de ERO/ERN e este aumento geralmente está relacionado a várias fontes geradoras de espécies reativas presentes em macrófagos, como os sistemas NADPH oxidase (NOX) e lipoxigenase/cicloxigenase, iNOS e cadeia respiratória mitocondrial (Levitan et al., 2010). Neste sentido, inicialmente avaliamos a geração de ERO em macrófagos expostos a diferentes concentrações de LDLox, utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA, conforme descrito em material e métodos. Como esperado, a exposição dos macrófagos por 1 hora à LDLox nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ causou um aumento significativo na geração de ERO de forma dependente da concentração de LDLox, conforme demonstrado na Figura 5A. Buscando avaliar o efeito do $(\text{PhSe})_2$ na prevenção da geração de ERO induzidas pela LDLox, os macrófagos foram pré-tratados com o composto (1 μM) por 24 horas e, após este período, expostos por 1 hora adicional à LDLox (100 $\mu\text{g/mL}$). De acordo com as Figuras 5B e C, observamos que o pré-tratamento dos macrófagos com $(\text{PhSe})_2$ atenuou significativamente a produção de ERO induzida por LDLox.

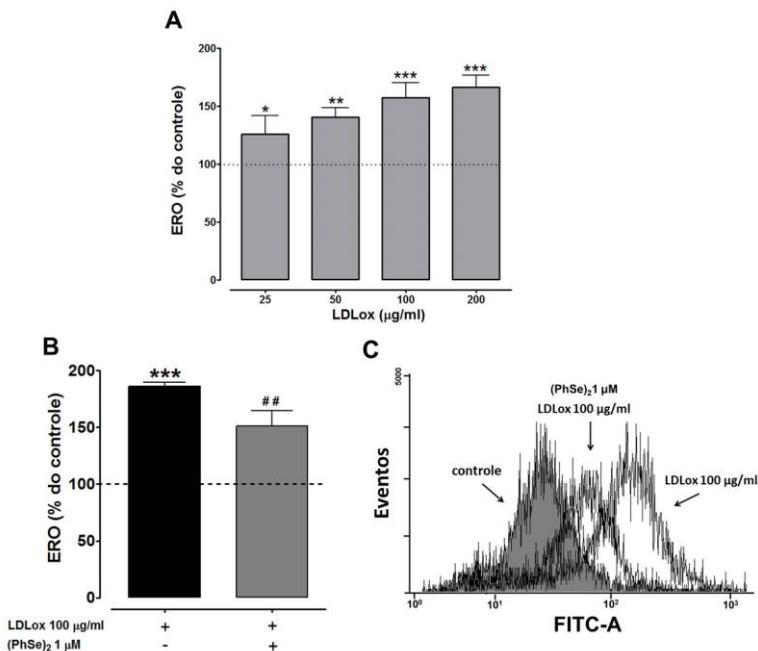


Figura 5: O (PhSe)₂ diminuiu a geração de ERO induzidos por LDLox em macrófagos. (A) Os macrófagos foram expostos a diferentes concentrações de LDLox (25-200 µg/mL) durante 1 hora. (B) As células foram pré-tratadas com (PhSe)₂ 1 µM ou veículo por 24 horas seguidos da incubação com LDLox (100 µg/mL) por 1 hora. A sonda fluorescente DCFH-DA (10 µM) foi adicionada ao meio por 30 minutos e a quantidade de ERO foi determinada por citometria de fluxo. A quantidade de ERO foi expressa como percentagem em relação ao controle. (C) Histograma representativo da citometria de fluxo. Os resultados representam a média ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indicam a diferença quando comparado com o controle; ## $p < 0,01$ indica a diferença quando comparado com LDLox (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

A mitocôndria além de ser uma fonte geradora de ERO/ERN, também pode ser alvo destas espécies reativas, comprometendo a função mitocondrial. A disfunção mitocondrial e conseqüentemente o comprometimento bioenergético mitocondrial estão relacionados com distúrbios na formação do gradiente de prótons no espaço intermembranas e a perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Neste sentido, avaliamos o $\Delta\Psi_m$ através da sonda fluorescente JC-

1. Podemos observar que a exposição dos macrófagos por 3 horas à LDLox (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diminuiu significativamente o $\Delta\Psi_{\text{m}}$, observado pela diminuição da razão da fluorescência entre vermelho/verde (forma monomérica/agregada), conforme descrito em material e métodos. Por outro lado, o pré-tratamento dos macrófagos por 24 horas com $(\text{PhSe})_2$ preveniu a diminuição do $\Delta\Psi_{\text{m}}$ mediada pela LDLox (Figura 6A-B). Este resultado nos sugere que o efeito antioxidante deste composto possa estar prevenindo a disfunção mitocondrial induzida pela LDLox.

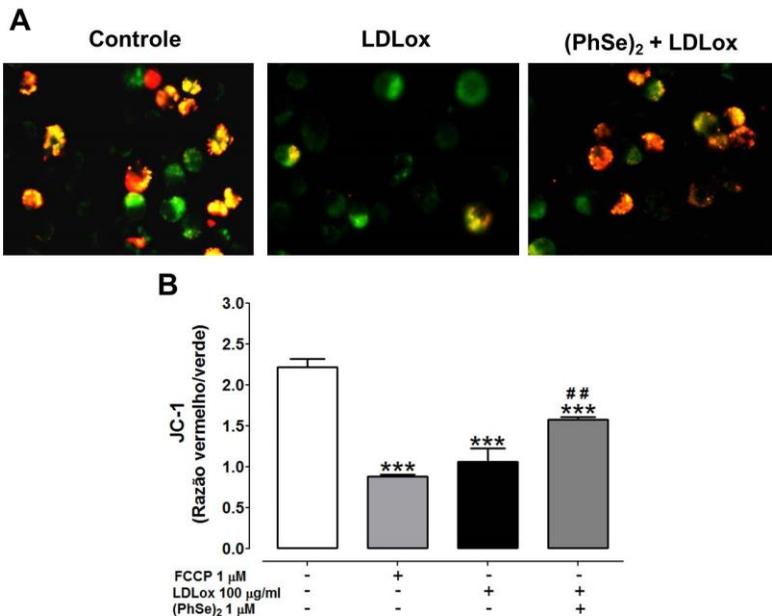


Figura 6: O $(\text{PhSe})_2$ preveniu a dissipação do potencial de membrana mitocondrial mediada pela LDLox. Os macrófagos foram pré-tratados 24 horas com $(\text{PhSe})_2$ (1 μM) ou veículo e após expostos à LDLox (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 3 horas. (A) Imagens representativas da alteração no $\Delta\Psi_{\text{m}}$ avaliadas de acordo com a intensidade da fluorescência vermelha/verde de JC-1. As imagens foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência invertido (Magnitude de 400x). (B) Quantificação da fluorescência de JC-1. O FCCP (1 μM) foi utilizado como controle positivo. Cada barra representa a média \pm erro padrão da razão fluorescência vermelho/verde de pelo menos três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ indica a diferença quando comparado com o controle; ## $p < 0,01$

indica a diferença quando comparado com LDLox (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

O comprometimento mitocondrial associado ao aumento na produção de ERO pode ativar diferentes vias de morte celular. Com o intuito de investigar o efeito citoprotetor do $(\text{PhSe})_2$ frente a toxicidade mediada pela LDLox em macrófagos, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de redução do MTT. Como mostrado na Figura 7, a exposição dos macrófagos por 24 horas à LDLox (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diminuiu aproximadamente 46% a viabilidade celular, enquanto o pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ preveniu este efeito citotóxico. Porém, não foi observada uma diminuição significativa na viabilidade dos macrófagos quando expostos a concentrações menores de LDLox. Esses resultados sugerem que a LDLox promoveu um aumento na geração de ERO e comprometimento do $\Delta\Psi_m$, os quais estão associados a diminuição da viabilidade celular, enquanto o pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ preveniu esses efeitos citotóxicos, provavelmente por inibir a geração de ERO induzidas pela LDLox.

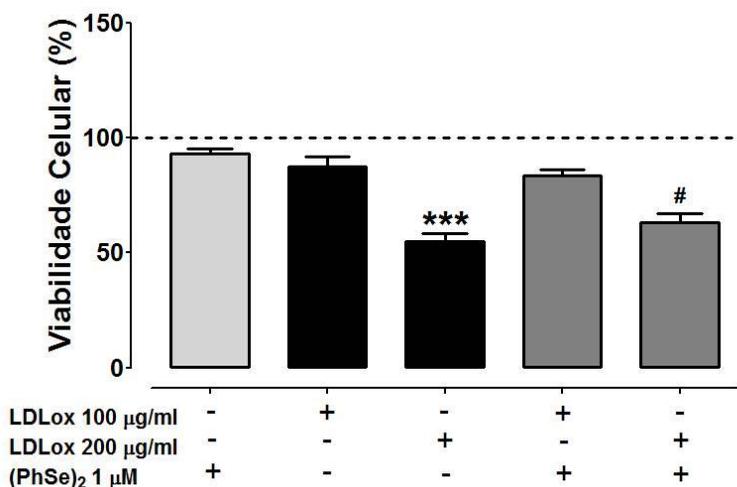


Figura 7: O $(\text{PhSe})_2$ preveniu a diminuição da viabilidade celular induzida pela LDLox. Os macrófagos foram pré-tratados por 24 horas com $(\text{PhSe})_2$ 1 μM ou veículo e após expostos a LDLox (100 ou 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por mais 24 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT e expressos como percentagem em relação ao controle. Cada barra representa a média \pm erro

padrão de pelo menos três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ indica a diferença quando comparado com o controle; # $p < 0,05$ indica a diferença quando comparado com LDLox (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

Durante os estágios do desenvolvimento do processo aterosclerótico, um dos eventos envolvidos é a formação das células espumosas. Macrófagos expressam receptores como CD36 e SR-A que reconhecem e captam LDLox gerando as células espumosas. Neste sentido, através da coloração com Oil Red O, a qual identifica gotículas de gordura presentes no interior dos macrófagos, avaliamos o efeito do $(\text{PhSe})_2$ na prevenção da formação de células espumosas induzidas por LDLox. Como esperado, macrófagos expostos por 3 horas à LDLox (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aumentaram significativamente a internalização de LDLox e conseqüentemente a formação de células espumosas. Em contrapartida, o pré-tratamento por 24 horas com $(\text{PhSe})_2$ preveniu a internalização de LDLox pelos macrófagos, como demonstrado na Figura 8.

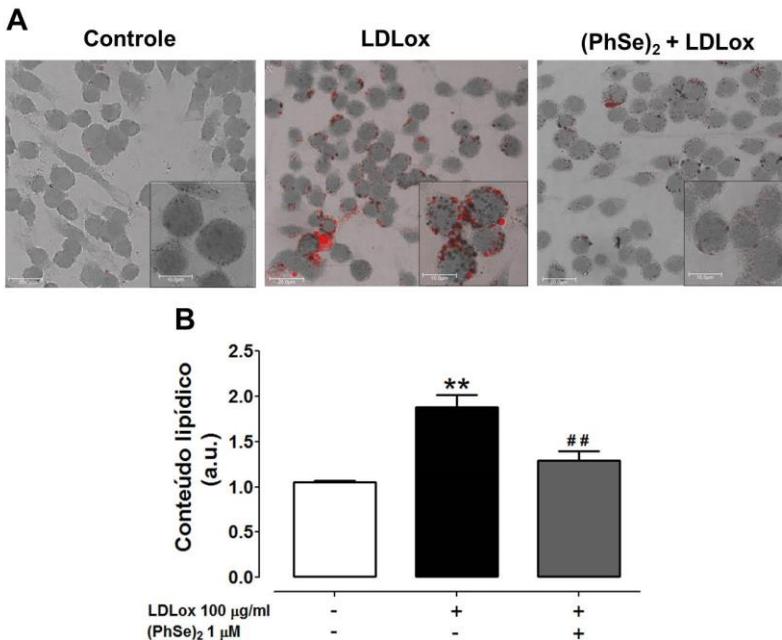


Figura 8: O (PhSe)₂ preveniu a formação de células espumosas. Os macrófagos foram pré-tratados por 24 horas com (PhSe)₂ 1 μM ou veículo e após expostos a LDLox (100 μg/mL) por 3 horas adicionais, seguidos pela coloração com Oil Red O. (A) Imagens representativas de macrófagos corados com Oil Red O adquiridas em microscópio confocal (Ampliação 63x), detalhes da ampliação da imagem no quadrante inferior com escala de 10 μm. (B) Quantificação do conteúdo lipídico das células espumosas (unidades arbitrárias, a.u.). Cada barra representa a média ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. ** $p < 0,01$ indica a diferença quando comparado com o controle e # $p < 0,01$ indica a diferença quando comparado com LDLox (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

A intensificação dos processos inflamatórios no desenvolvimento da aterosclerose pode desencadear complicações trombóticas com o envolvimento da produção e secreção de metaloproteinases de matriz (MMP). Estas enzimas proteolíticas podem degradar a matriz extracelular resultando em ruptura da placa aterosclerótica e consequentemente ativação do processo trombogênico.

Neste sentido, avaliamos a atividade da MMP-9 ou collagenase tipo IV, por duas técnicas diferentes conforme descrito em material e métodos. Uma vez que já está bem reportado que a LDLox promove a ativação de MMP, avaliamos o efeito do (PhSe)₂ sobre a modulação desta enzima. Como esperado, a exposição dos macrófagos à LDLox (100 μg/mL) por 24 horas provocou um aumento significativo da atividade da MMP-9 em ambos os métodos utilizados (Figura 9A). Porém, o pré-tratamento por 24 horas com (PhSe)₂ reduziu significativamente a atividade da MMP-9 no meio de cultura após a exposição com LDLox. De forma semelhante, a Figura 9B mostra uma análise representativa de zimografia, onde pode ser observado que a LDLox produziu um aumento significativo na atividade de MMP-9, a qual foi marcadamente reduzida pelo pré-tratamento com (PhSe)₂. Estes resultados sugerem que o (PhSe)₂ apresenta propriedades em prevenir a ativação das MMP-9 induzida pela LDLox.

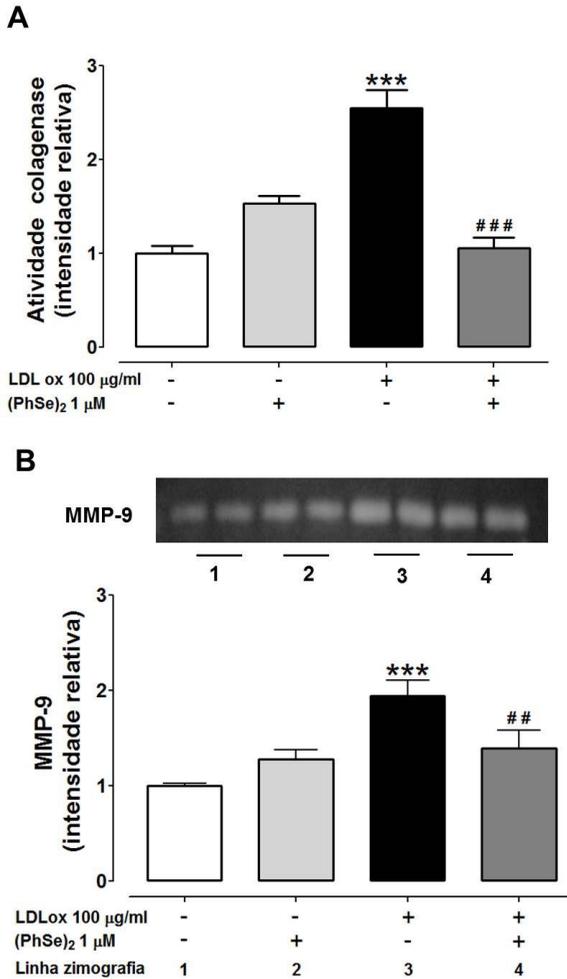


Figura 9: O (PhSe)₂ diminuiu a atividade da MMP-9 induzida pela LDLox. Os macrófagos foram pré-tratados por 24 horas com (PhSe)₂ 1 µM ou veículo e, em seguida, expostos a LDLox (100 µg/mL) por mais 24 horas. (A) A atividade da collagenase IV no sobrenadante foi medida utilizando um kit EnzChek Gelatinase/Colagenase. (B) Análise de zimografia da atividade da MMP-9 no sobrenadante das células. Painel superior: ensaio de zimografia representativo da atividade gelatinolítica da MMP-9. Painel inferior: análise da densitometria a partir dos ensaios de zimografia. Os resultados foram expressos como intensidade relativa em relação ao controle. Cada barra representa a média ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. ****p*<0,001 indica

diferença quando comparado com o controle e ^{##} $p < 0,01$; ^{###} $p < 0,001$ indica a diferença quando comparado com LDLox (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

A aterosclerose é considerada uma doença inflamatória crônica e envolve vários mediadores inflamatórios. A óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2) é uma enzima importante nos macrófagos na resposta ao processo inflamatório, sendo responsável pela síntese de óxido nítrico ([•]NO). O imunoconteúdo de iNOS foi significativamente maior quando macrófagos foram expostos por 24 horas à LDLox (200 µg/mL). Em contrapartida, quando as células foram pré-tratadas por 24 horas com (PhSe)₂ este efeito foi prevenido, conforme demonstrado na Figura 10A. Porém, a exposição a 100 µg/mL de LDLox não gerou diferenças significativas no imunoconteúdo de iNOS em relação ao controle. Uma vez demonstrado que LDLox induziu aumento no imunoconteúdo da iNOS, avaliamos a produção de nitrito no sobrenadante das células expostas aos tratamentos, uma forma indireta de analisarmos os níveis de [•]NO através do método de Griess, conforme descrito no material e métodos. De acordo com a Figura 10B, macrófagos expostos à LDLox (200 µg/mL) aumentaram significativamente a secreção de nitrito e o pré-tratamento com (PhSe)₂ preveniu este evento. Já a LDLox na concentração de 100 µg/mL não induziu aumento nos níveis de [•]NO. De acordo com estes resultados, podemos inferir que o (PhSe)₂ preveniu a ativação da iNOS e, conseqüentemente, a produção de [•]NO quando os macrófagos foram expostos à LDLox.

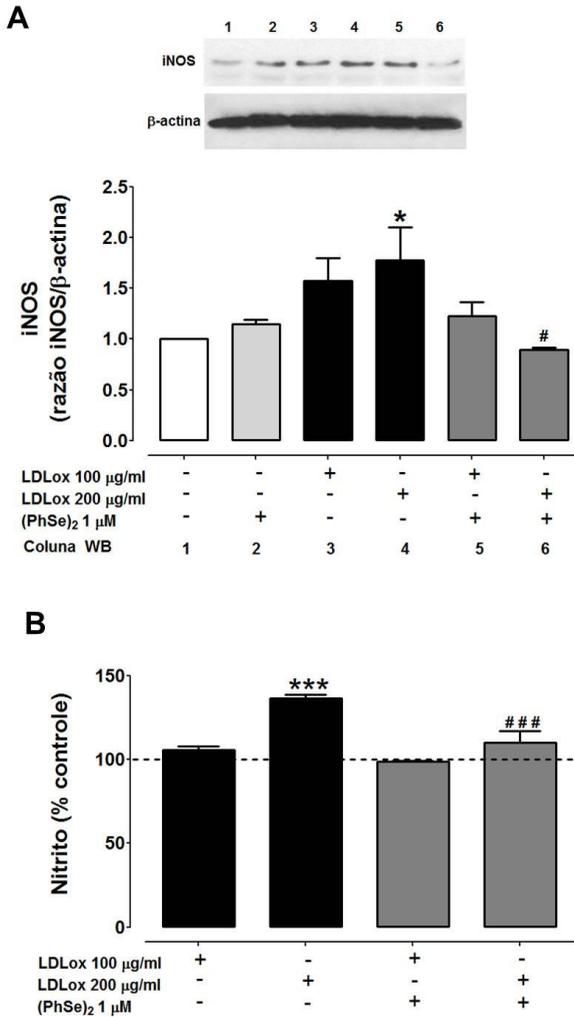


Figura 10: Efeito do (PhSe)₂ no imunocónteuóo da iNOS e produção de NO. Os macrófagos foram pré-tratados por 24 horas com (PhSe)₂ 1 μ M ou veículo e, em seguida, expostos a LDLox (100 μ g/mL ou 200 μ g/mL) por mais 24 horas. (A) Western blot representativo da análise dos níveis proteicos de iNOS. A normalização da carga proteica foi realizada utilizando β -actina. O resultado foi expresso como razão iNOS/ β -actina. (B) Os níveis de nitrito no meio de cultura foram determinados e expressos como porcentagem em relação ao controle. Cada barra representa a média \pm erro padrão de pelo menos três

experimentos independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em comparação com o controle e # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ indica a diferença quando comparado com LDLox (200 $\mu\text{g/mL}$) (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

A produção de ERO mediada por LDLox desempenha um papel importante no aumento do processo inflamatório através da ativação de fatores de transcrição sensíveis a mudanças redox, como o NF- κ B, que regula positivamente vários mediadores pró-inflamatórios, tais como iNOS, MMP, receptores CD36 entre outros (Maziere e Maziere, 2009). Através da técnica de imunocitoquímica, verificamos que a exposição à LDLox 100 $\mu\text{g/mL}$ por 1 hora induziu a translocação nuclear do fator NF- κ B em macrófagos (Figura 11). Com o intuito de verificar se o composto (PhSe)₂ apresentaria efeito inibitório na ativação do fator NF- κ B, as células foram pré-tratadas por 24 horas antes da incubação com a LDLox. De acordo com a Figura 11, podemos verificar que o pré-tratamento com (PhSe)₂ inibiu a translocação nuclear do fator NF- κ B, mantendo-o no citosol. De acordo com este resultado, podemos concluir que a LDLox promoveu um rápido aumento na geração de ERO levando a ativação do fator de transcrição NF- κ B o que poderia intensificar o processo inflamatório. Em contrapartida, os efeitos citoprotetores do (PhSe)₂ frente a LDLox se devem a sua atividade antioxidante prevenindo a geração de ERO e inibindo a translocação nuclear do fator inflamatório NF- κ B.

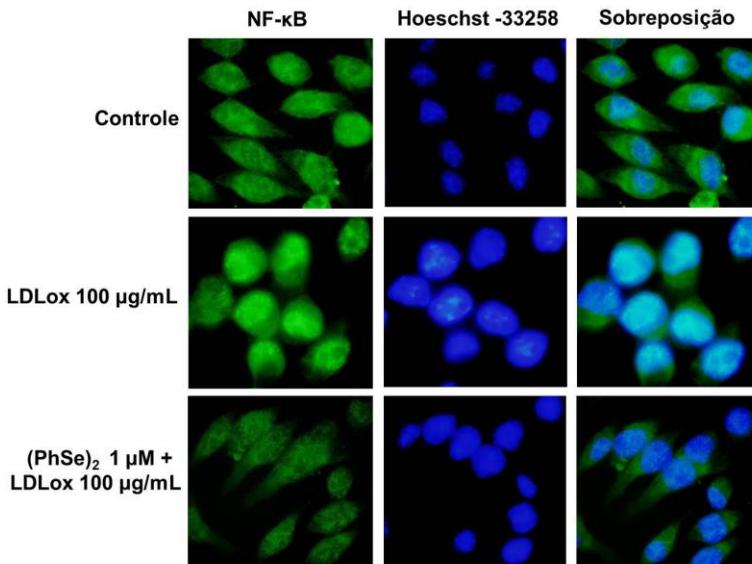
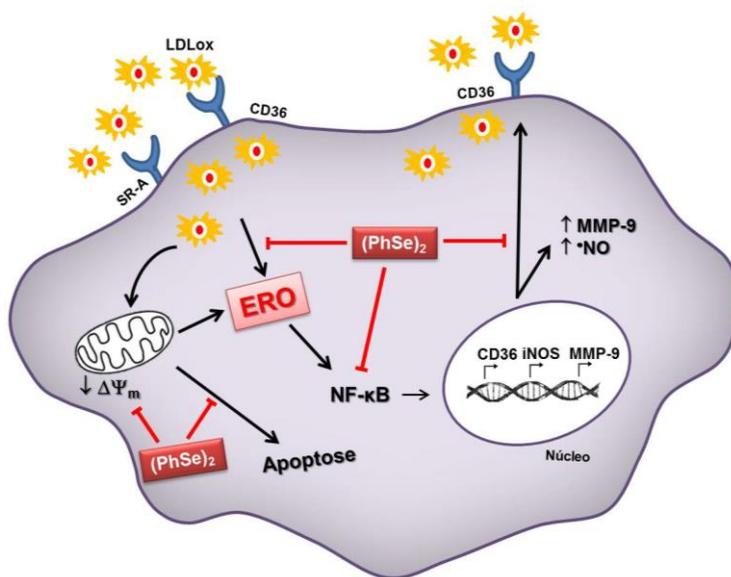


Figura 11: O (PhSe)₂ modula a translocação nuclear do fator NF-κB. Os macrófagos foram pré-tratados 24 horas com (PhSe)₂ 1 µM ou veículo e após expostos à LDLox (100 µg/mL) por 1 hora. A translocação nuclear de NF-κB foi avaliada através de imunofluorescência (coloração verde). A identificação nuclear foi feita com o corante Hoechst-33258 (azul). Imagem representativa da sobreposição de duas imagens marcadas em verde e azul (Magnitude de 1000x). As imagens foram adquiridas aleatoriamente a partir de três experimentos independentes.

Concluindo este primeiro capítulo, podemos sugerir que o (PhSe)₂ diminuiu a incorporação de LDLox através de receptores como SR-A e CD36 pelos macrófagos (formação de células espumosas) fato que foi concomitante à redução na geração de ERO/ERN. A diminuição no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e a conseqüente indução da morte celular apoptótica pela LDLox também foi prevenida pelo (PhSe)₂. Em relação a ativação dos marcadores inflamatórios pela ação da LDLox nos macrófagos, verificou-se que o (PhSe)₂ diminuiu a atividade da MMP-9, a ativação da iNOS e a produção de [•]NO. Propomos que esses efeitos ocorreram em decorrência da capacidade do (PhSe)₂ em inibir a translocação do fator NF-κB, possivelmente por mediar a diminuição da geração de ERO pelos macrófagos. De fato, a

superprodução de ERO/ERN induzidas pela LDLox leva a ativação do fator de transcrição NF- κ B, portanto a melhora da capacidade antioxidante celular mediada pelo $(\text{PhSe})_2$, juntamente a sua ação antioxidante direta como mimético de GPx, podem explicar em parte a sua ação como um possível composto antiaterogênico. De forma resumida, o esquema abaixo representa os efeitos citoprotetores do $(\text{PhSe})_2$ em relação a toxicidade da LDLox em macrófagos (Esquema 1).



Esquema 1: Efeitos do $(\text{PhSe})_2$ sobre a toxicidade induzida pela LDLox em macrófagos. Com base nos resultados indicados no presente estudo, conclui-se que o $(\text{PhSe})_2$ diminuiu a geração de EROs e a formação de células espumosas (incorporação de LDLox). Além disso, o pré-tratamento com o composto organoselênio preveniu a diminuição do $\Delta\Psi_m$ e, conseqüentemente, a morte celular induzida por LDLox. A translocação de NF- κ B para o núcleo foi inibida pelo $(\text{PhSe})_2$, diminuindo a transcrição de genes, tais como o receptor CD36, iNOS e MMP-9, o que resulta numa diminuição da expressão destas proteínas e da produção de NO.

5.2 CAPITULO 2

Disseleneto de difenila (PhSe)₂ melhora o sistema de defesa antioxidante em macrófagos através da ativação do fator de transcrição Nrf2

Diphenyl diselenide improves antioxidant defense systems in macrophage cells through activation of Nrf2 transcription factor

Marcos Raniel Stralio¹, Daniel da Silva¹, Marcelo Farina¹, Rafael Radi³, João Batista da Rocha², Andreza Fabro de Bem^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil;

²Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

³Departamento de Bioquímica and Center for Free Radical and Biomedical Research, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Manuscrito em elaboração.

No primeiro capítulo deste trabalho, demonstramos que o efeito citoprotetor do $(\text{PhSe})_2$ em macrófagos expostos à LDLox foi relacionado com a modulação do sistema antioxidante celular nestas células (Straliotto et al., 2013). Assim, este próximo capítulo tem por objetivo verificar se esta modulação mediada pelo $(\text{PhSe})_2$ está relacionada com a ativação do fator de transcrição Nrf2. Para isso, utilizamos macrófagos murinos da linhagem J774.A1 e todos os protocolos estão descritos na seção material e métodos desta tese.

Vários estudos demonstraram que o $(\text{PhSe})_2$ apresenta importantes propriedades farmacológicas e antioxidantes (Posser et al., 2006, Nogueira e Rocha, 2010, Straliotto et al., 2013) e que esta capacidade antioxidante está, em parte, relacionada a sua atividade mimética da enzima GPx (Nogueira et al., 2004), utilizando GSH como equivalente redutor. Além disso, recentemente o efeito protetor do $(\text{PhSe})_2$ também tem sido atribuído a sua capacidade em melhorar o ambiente redox celular através da ativação de vias relacionadas a síntese de enzimas antioxidantes (Fiuza et al., 2015), entretanto, não está totalmente claro como e quais vias são responsáveis pelo efeito protetor do $(\text{PhSe})_2$.

Considerando a importância do sistema antioxidante vinculado à GSH na proteção celular frente ao estresse oxidativo, nosso primeiro passo foi avaliar o efeito da exposição temporal (1, 3, 6 e 24 horas) de $(\text{PhSe})_2$ (1 μM) sobre os níveis de GSH em macrófagos. Vale salientar que no trabalho apresentado no capítulo anterior, verificamos que a concentração de 1 μM de $(\text{PhSe})_2$ não induziu nenhuma toxicidade em macrófagos e demonstrou efeitos citoprotetores importantes (Straliotto et al., 2013).

Como mostra a Figura 12A, o $(\text{PhSe})_2$ promoveu um aumento significativo nos níveis de GSH já em 1 hora de exposição e este aumento perdurou até 24 horas. Apesar de consumir GSH em seu ciclo catalítico, o $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de aumentar os níveis celulares deste tripeptídeo nos macrófagos, sugerindo sua habilidade modulatória do sistema antioxidante. O processo de biossíntese de GSH ocorre exclusivamente no citosol e envolve duas enzimas, a Gama Glutamil Cisteína Sintetase e a Glutathione Sintetase (Meister e Anderson, 1983). Com o intuito de verificar se o aumento nos níveis de GSH estavam relacionados com aumento da atividade da enzima GGCS, passo limitante da síntese de GSH, avaliamos sua atividade em macrófagos após diferentes tempos de exposição ao $(\text{PhSe})_2$. De acordo com a Figura 12B, verificamos que mesmo após um curto período de exposição (1 hora), o $(\text{PhSe})_2$ promoveu aumento significativo na

atividade da enzima GGCS de maneira dependente do tempo, o qual coincidiu com o aumento dos níveis de GSH, permanecendo elevada por até 24 horas. Assim, podemos inferir que o $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de proporcionar o aumento dos níveis de GSH o qual pode estar relacionado com o aumento da atividade da GGCS.

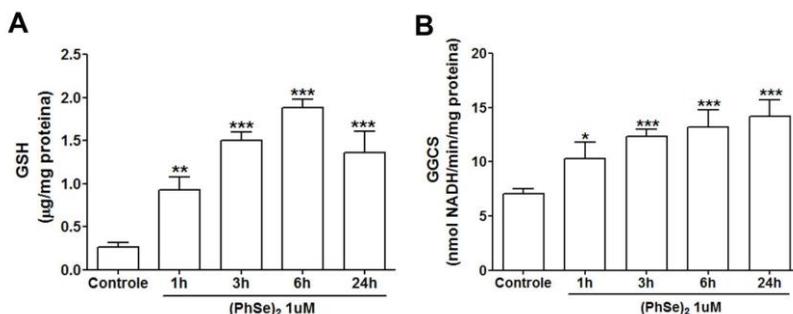


Figura 12: O $(\text{PhSe})_2$ aumentou a biossíntese de GSH em macrófagos. Macrófagos foram incubados com $1\mu\text{M}$ de $(\text{PhSe})_2$ nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas. (A) Os níveis intracelulares de GSH foram determinados e os resultados foram expressos em μg de GSH por mg de proteína. (B) A atividade da GGCS foi determinada e expressa como nmol NADH consumido por minuto por mg de proteína. Os resultados representam a média \pm erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indica a diferença quando comparado com o controle (ANOVA de uma via, seguida por teste *post hoc* Tukey).

A síntese da enzima GGCS no núcleo tem sido atribuída a mecanismos dependentes da ativação do fator de transcrição Nrf2 (Hybertson et al., 2011). Desta forma, através das técnicas de imunocitoquímica e *Western blotting* avaliamos em uma curva de tempo, a capacidade do $(\text{PhSe})_2$ em promover a ativação e translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2.

De acordo com a Figura 13A, o $(\text{PhSe})_2$ promoveu rapidamente (1 hora) a translocação nuclear do fator Nrf2 e isto se deu de maneira dependente do tempo, como verificado pelo aumento da intensidade da imunofluorescência no núcleo dos macrófagos comparado com o controle. Para confirmar este resultado, o imunoconteúdo de Nrf2 foi avaliado através do método de *Western blotting*.

Para isso, os macrófagos foram incubados com $(\text{PhSe})_2$ por diferentes tempos e após frações nucleares e citosólicas foram preparadas, conforme descrito em material e métodos, e submetidas a

SDS-PAGE 10%. Como esperado, $(\text{PhSe})_2$ promoveu um rápido (após 1 hora) e significativo aumento do imunocontéudo de Nrf2 na fração nuclear de maneira dependente do tempo, conforme observado na Figura 13B, enquanto a fração citosólica não sofreu alteração (Figura 13C). Para descartar a possível presença de contaminantes citosólicos no preparado nuclear, a pureza da fração nuclear foi testada através da incubação da membrana contendo proteínas da fração nuclear com β -actina e não foram observadas bandas (dado não mostrado).

De acordo com estes resultados, podemos concluir que o $(\text{PhSe})_2$ promoveu a ativação e translocação nuclear do fator Nrf2 com apenas 1 hora de incubação e que isto ocorreu de maneira dependente do tempo. Isto poderia explicar o aumento dos níveis de GSH uma vez que a regulação da expressão da GGCS é dependente do fator de transcrição Nrf2.

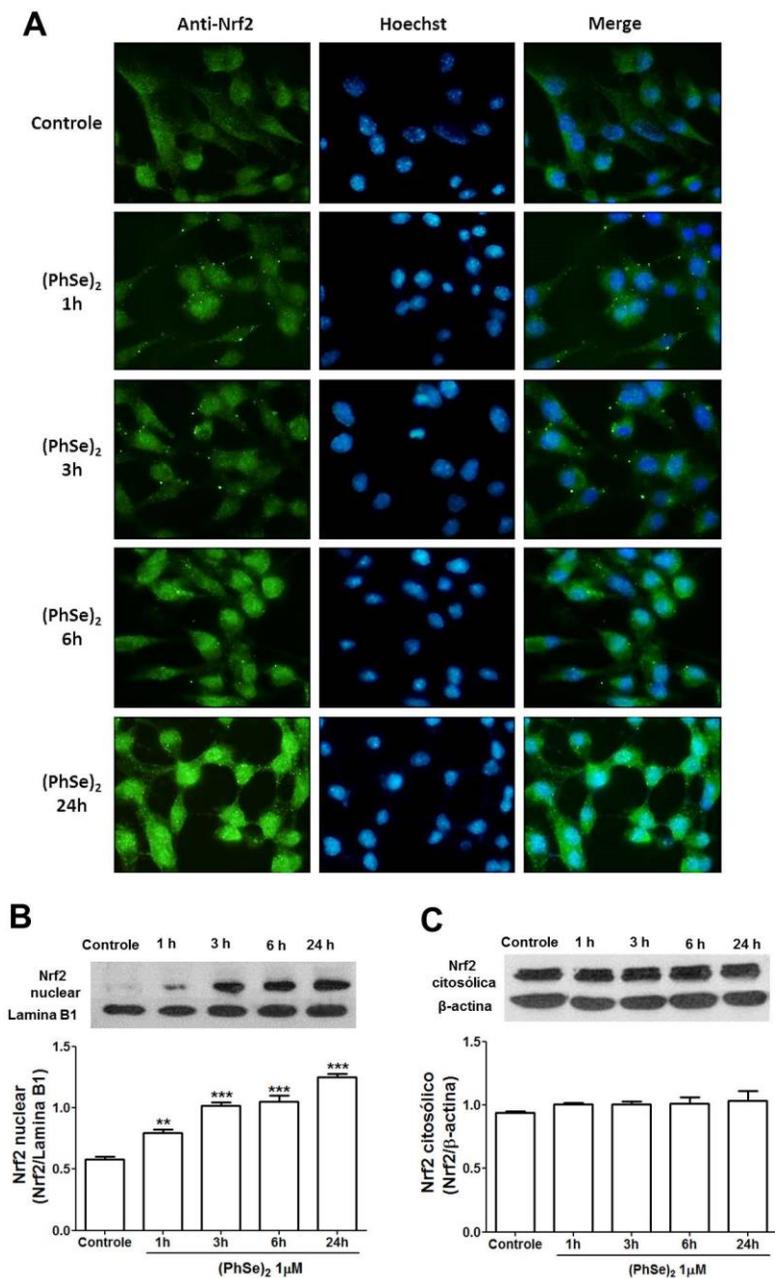


Figura 13: (PhSe)₂ induziu a translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2 em macrófagos. Macrófagos foram incubados com 1 μ M de (PhSe)₂ nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas. (A) Imagem representativa da imunofluorescência para Nrf2, núcleo marcado com Hoescht 33358 (azul) e merge (colocalização) das imagens (verde e azul). Magnitude 1000x. O imunoc conteúdo de Nrf2 nuclear (B) e Nrf2 citosólico (C) foram determinados por *Western blotting*. O conteúdo proteico da fração nuclear foi normalizado utilizando Lamina B1 e a fração citosólica através de β -actina. Cada barra representa a média \pm erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indica a diferença quando comparado com o controle (ANOVA de uma via, seguida do teste de *post hoc* Tukey).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a liberação do Nrf2 do seu repressor citosólico Keap1 e sua translocação para o núcleo, seja por ataque direto por eletrófilos ou ERO em resíduos de cisteína presentes no Keap1 e/ou por ação indireta como a fosforilação de resíduos de tirosina no Nrf2 (Itoh et al., 2004). Proteínas cinases como ERK, p38, JNK, PKC e PI3K podem fosforilar Nrf2 e promover sua translocação para o núcleo, ativando assim a transcrição gênica de enzimas antioxidantes e de detoxificação (Huang et al., 2002).

Com o intuito de investigar o efeito do (PhSe)₂ nas vias de sinalização responsáveis pela ativação e translocação nuclear de Nrf2, avaliamos através de *Western blotting*, os níveis proteicos de Nrf2 nuclear na presença de inibidores específicos das vias p38 (SB203580), JNK (SP600125) e PI3K (LY294002), conforme descrito em material e métodos. O resultado da Figura 14, mostra que o (PhSe)₂ aumentou significativamente o conteúdo nuclear de Nrf2 após 3 horas de incubação. Por outro lado, a presença de SB203580, SP600125 ou LY294002 inibiu completamente a translocação nuclear de Nrf2 induzida pelo (PhSe)₂, sugerindo, desta forma, que estas vias são importantes para a ativação e translocação do fator Nrf2 induzidos pelo (PhSe)₂. A incubação dos macrófagos somente com os inibidores não demonstrou diferença em relação ao controle.

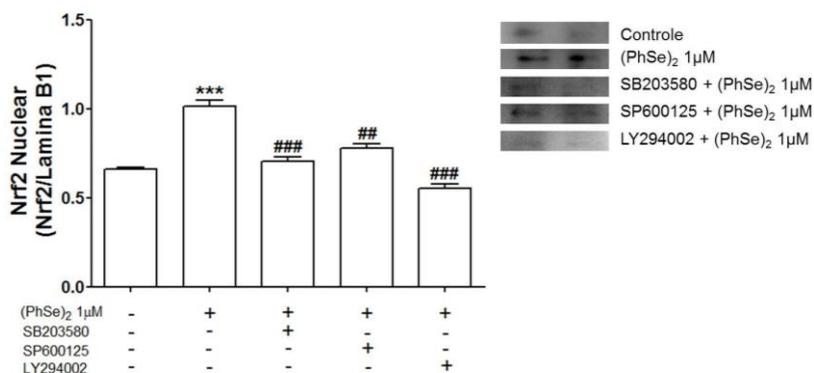


Figura 14: Inibidores das vias p38, JNK e PI3K impedem o efeito do (PhSe)₂ na translocação nuclear de Nrf2. Macrófagos foram incubados com SB203580 (10 µM), SP600125 (10 µM) e LY294002 (10 µM) por 1 hora, seguidos da incubação com 1 µM de (PhSe)₂ por 3 horas. O conteúdo proteico do fator de transcrição Nrf2 nuclear foi determinado por *Western blotting* e expressos como a razão Nrf2 e Lamina B1. O conteúdo proteico da fração nuclear foi normalizado utilizando Lamina B1. Cada barra representa a média ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ indica a diferença quando comparado com o controle; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indicam a diferença quando comparado com (PhSe)₂ (ANOVA de uma via, seguida do teste de *post hoc* Tukey).

Considerando a rápida resposta de indução do sistema antioxidante vinculado à síntese de GSH e a modulação da translocação do fator Nrf2 induzido pelo (PhSe)₂ na presença de inibidores em macrófagos, buscamos confirmar o papel destas vias de sinalização através da análise da atividade da enzima GGCS. Para isso, macrófagos foram incubados por 1 hora com os inibidores das vias p38 (SB203580), JNK (SP600125) e PI3K (LY294002) seguidos da incubação com (PhSe)₂ 1µM por 3 horas adicionais.

De acordo com a Figura 15, o (PhSe)₂ aumentou significativamente a atividade da enzima GGCS após 3 horas de incubação. Por outro lado, o inibidor da via p38 inibiu completamente a atividade da enzima GGCS, enquanto os inibidores de JNK e de PI3K diminuíram parcialmente a atividade desta enzima. Esses resultados demonstram que essas vias de sinalização celular, desempenham um papel fundamental na ação do (PhSe)₂ sobre a modulação da atividade

da enzima GGCS e que são dependentes da translocação nuclear do fator Nrf2.

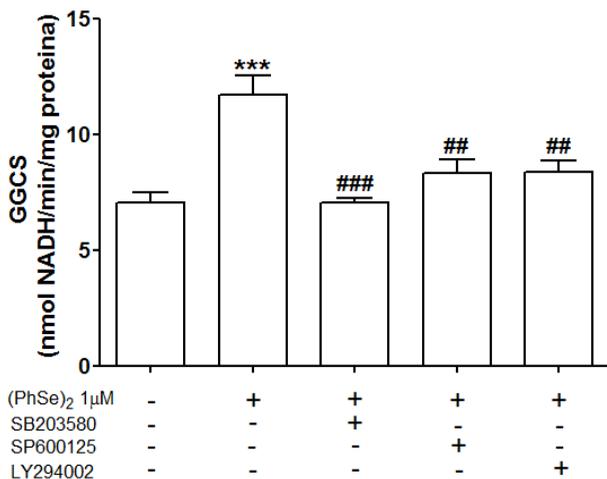


Figura 15: Inibidores das vias p38, JNK e PI3K modulam o efeito do (PhSe)₂ na atividade da enzima GGCS. Macrófagos foram incubados com SB203580 (10 μM), SP600125 (10 μM) e LY294002 (10 μM) por 1 hora, seguidos de incubação com 1 μM de (PhSe)₂ por 3 horas. A atividade da enzima GGCS foi determinada e expressa como nmol NADH consumido por minuto por mg de proteína. Os resultados representam a média ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ indica a diferença quando comparado com o controle; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indicam a diferença quando comparado com (PhSe)₂ (ANOVA de uma via, seguida do teste de *post hoc* Tukey).

O fator de transcrição Nrf2 regula a expressão de outras proteínas importantes na defesa contra o estresse oxidativo, como a Heme oxigenase (HO-1) e a Peroxiredoxina-1 (Prx-1). Desta forma, buscamos avaliar por *Western blotting* o efeito do (PhSe)₂ sobre estas duas enzimas em macrófagos. De acordo com a Figura 16A e B, o (PhSe)₂ promoveu um aumento significativo do imunocontéudo de HO-1 e Prx-1, respectivamente, apenas no tempo de 24 horas de incubação, não sendo observados aumentos na expressão em tempos menores. Desta forma, esses resultados sugerem que o composto promove aumento do conteúdo proteico dessas enzimas e que este aumento possivelmente está relacionado com ativação do fator Nrf2.

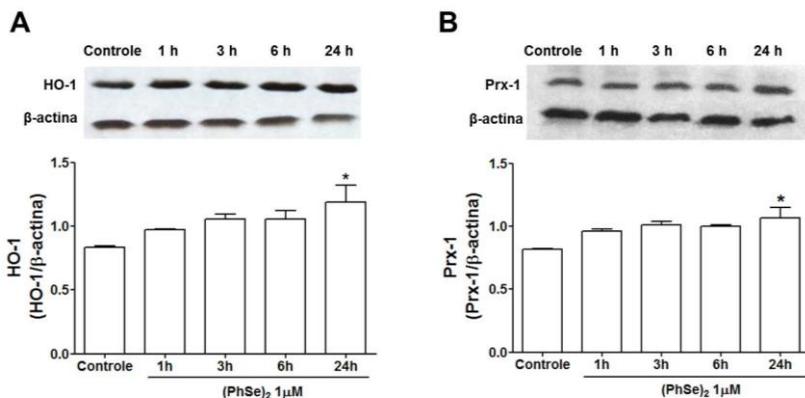


Figure 16: O $(\text{PhSe})_2$ aumentou imunoc conteúdo de HO-1 e Prx-1. Macrófagos foram incubados com $1 \mu\text{M}$ de $(\text{PhSe})_2$ nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas. (A) A expressão da HO-1 e (B) Prx-1 foram determinadas por ensaio de *Western blotting* e os resultados expressos como razão proteína/ β -actina. Os resultados representam a média \pm erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. * $p < 0,05$ indica a diferença quando comparado com o controle (ANOVA de uma via, seguida do teste de *post hoc* Tukey).

Várias enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes são reguladas pelo fator de transcrição Nrf2, entre elas a GPx2. Apesar de ser encontrada preferencialmente no epitélio intestinal, também é encontrada em macrófagos (Goven et al., 2008, Brigelius-Flohe e Maiorino, 2013). Uma vez que o composto $(\text{PhSe})_2$ possui atividade mimética a GPx, inicialmente avaliamos seu efeito sobre a atividade enzimática da GPx, independente da isoforma. Nosso resultado mostra que com apenas 1 hora de incubação com o composto a atividade da GPx aumentou significativamente permanecendo aumentada por 24 horas, como demonstrado na Figura 17A. Para identificar qual isoforma de GPx poderia estar sendo regulada pelo $(\text{PhSe})_2$, investigamos as isoformas GPx1 e GPx2, determinando seus níveis proteicos através de *Western blotting*.

Como demonstrado na Figura 17B, o $(\text{PhSe})_2$ aumentou os níveis proteicos da isoforma GPx2 somente após 24 horas de exposição. Esta modulação na expressão da GPx2 pode estar relacionada a ativação de Nrf2, visto que esta isoforma é regulada por este fator de transcrição. Uma vez que o aumento da atividade da GPx ocorreu em curto período

de tempo e não foi acompanhado pelo aumento da expressão da GPx2 neste mesmo tempo, investigamos a isoforma GPx1. Esta isoforma encontra-se presente no citosol e na mitocôndria, porém não é regulada pelo fator Nrf2 (Brigelius-Flohe e Maiorino, 2013) e sim pelo fator de transcrição FoxO (Klotz et al., 2015). De acordo com a Figura 17C, os níveis proteicos de GPx1 aumentaram significativamente após 1 hora de incubação com $(\text{PhSe})_2$, coincidindo com o aumento da atividade da GPx no mesmo período. Desta forma, podemos sugerir que a atividade da GPx pode estar associada com o aumento da expressão de outras isoformas da enzima, não reguladas pelo fator Nrf2.

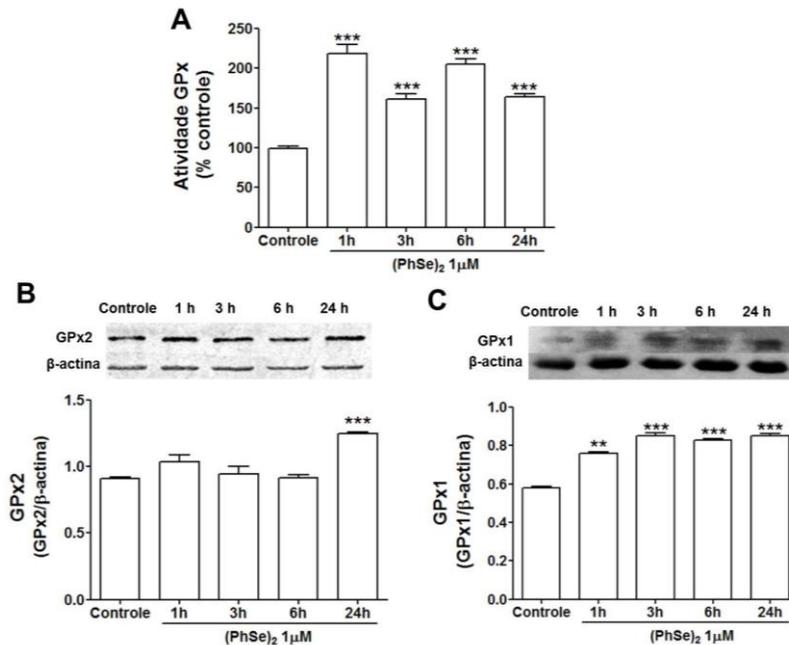


Figura 17: O $(\text{PhSe})_2$ aumentou atividade da enzima GPx e imunoc conteúdo das isoformas GPx1 e GPx2. Macrófagos foram incubados com 1 μM de $(\text{PhSe})_2$ nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas. (A) A atividade da enzima GPx foi expressa como percentual em relação ao controle. O imunoc conteúdo das isoformas GPx2 (B) e GPx1 (C) foram determinados por *Western blotting* e os resultados expressos como razão proteína/ β -actina. Os resultados representam a média \pm erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. ** $p < 0,01$

e *** $p < 0,001$ indicam a diferença quando comparado com o controle (ANOVA de uma via, seguida do teste de *post hoc* Tukey).

Uma vez que o $(\text{PhSe})_2$ promoveu um aumento na expressão da isoforma GPx1, a qual não é regulada pelo fator de transcrição Nrf2, buscamos avaliar o efeito do $(\text{PhSe})_2$ na expressão de enzimas antioxidantes não reguladas por Nrf2. Desta forma, investigamos se a expressão da enzima MnSOD (SOD2), isoforma que está presente na mitocôndria pode ser modulada por $(\text{PhSe})_2$. O aumento da expressão da MnSOD está relacionada ao fator de transcrição FoxO (Hagenbuchner e Ausserlechner, 2013, Kim et al., 2013). Conforme a Figura 18, podemos observar que o $(\text{PhSe})_2$ induz um aumento significativo nos níveis proteicos da MnSOD em 6 e 24 horas de incubação. Este resultado sugere que o $(\text{PhSe})_2$ tem a capacidade de promover uma melhora no sistema enzimático antioxidante em macrófagos, não somente através da ativação do fator de transcrição Nrf2, mas, também, por ativar outros fatores de transcrição responsáveis pela regulação de enzimas antioxidantes, tais como FoxO.

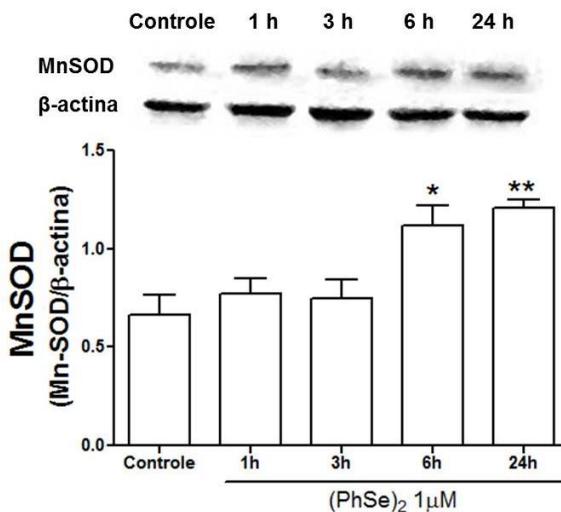


Figure 18: O $(\text{PhSe})_2$ aumentou os níveis proteicos da MnSOD. Macrófagos foram incubados com $1 \mu\text{M}$ de $(\text{PhSe})_2$ nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas. Os níveis proteicos da MnSOD foram determinados por *Western blotting* e o resultado expresso como razão proteína/ β -actina. Os resultados representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

indicam a diferença quando comparado com o controle (ANOVA de uma via, seguida do teste de *post hoc* Tukey).

Finalizando este segundo capítulo, podemos concluir que o composto $(\text{PhSe})_2$ possui a capacidade de promover, de forma dependente do tempo, aumento nos níveis de GSH e isto pode estar relacionado com o aumento da atividade da enzima responsável por sua síntese, a GGCS. Além disso, o tratamento de macrófagos com $(\text{PhSe})_2$ induziu um aumento nos níveis proteicos das enzimas GPx2, HO-1 e Prx-1. Estes efeitos podem ser atribuídos à capacidade deste composto em ativar e promover a translocação para o núcleo do fator de transcrição Nrf2, responsável pela indução gênica dessas enzimas, aumentando as defesas antioxidantes. Ainda, demonstramos pela primeira vez que a inibição das vias p38, JNK e PI3K modulam a capacidade que o $(\text{PhSe})_2$ apresenta na ativação e translocação nuclear de Nrf2 e conseqüentemente na atividade da enzima GGCS. Surpreendentemente, o $(\text{PhSe})_2$ promoveu um aumento nos níveis proteicos de GPx1 e MnSOD. Estes dados sugerem que este composto pode ativar também outro fator de transcrição, como FoxO, e, desta forma, contribuir para a melhora das defesas antioxidantes em macrófagos, o que precisa ser confirmado.

5.3 CAPITULO 3

Disseleneto de difenila (PhSe)₂ protege células endoteliais do dano promovido pela privação transitória de oxigênio e glicose

Diphenyl diselenide (PhSe)₂ protects endothelial cells from damage promoted by transient of oxygen and glucose deprivation

Marcos Raniel Stralio¹, Simone Pinton², Madia Trujilo⁴, Silvina Bartesaghi⁴, Carla Inês Tasca¹, João Batista da Rocha³, Rafael Radi⁴, Andreza Fabro de Bem¹

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil;

²Departamento de Química, Universidade Federal do Pampa, Uruguiana, RS, Brazil;

³Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

⁴Departamento de Bioquímica and Center for Free Radical and Biomedical Research, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Manuscrito em elaboração.

O terceiro bloco experimental desta tese busca investigar o efeito protetor do composto $(\text{PhSe})_2$ em células endoteliais expostas a privação transitória de oxigênio e glicose (OGD - oxygen and glucose deprivation) seguido por reperfusão, simulando o processo metabólico característico do quadro de isquemia-reperfusão.

Recente estudo do nosso grupo determinou a constante cinética de reação entre ONOO^- e $(\text{PhSe})_2$, na sua forma reduzida, ou seja, o selenol, em pH 7,4 e a 37°C , no qual o valor foi de $2,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (de Bem et al., 2013). De fato o valor da constante de reação do $(\text{PhSe})_2$ com o ONOO^- é menor que a determinada para o ebselen $2,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em pH 8,0 (Masumoto et al., 1996). Ainda tendo em vista o valor da constante, a reação direta entre o ONOO^- e $(\text{PhSe})_2$ só seria favorecida em tão altas concentrações de $(\text{PhSe})_2$ como $100 \mu\text{M}$. Isto porque outros alvos celulares, como a GSH e o CO_2 reagiriam preferencialmente com o ONOO^- e seus produtos de decomposição. Por outro lado, considerando que o processo isquêmico pode estar relacionado a modificações do pH intracelular e que a constante de reação pode variar dependendo do pH, hipotetizamos que a reação entre o ONOO^- e o $(\text{PhSe})_2$ pudesse ser favorecida em pH “mais ácidos”. Assim, avaliamos a influência de variações do pH sobre a constante de reação entre o ONOO^- e o $(\text{PhSe})_2$.

Utilizando do sistema “stopped flow”, foi possível determinar as constantes de reação entre o ONOO^- e $(\text{PhSe})_2$ em diferentes pH. Como o ONOO^- não reage diretamente com $(\text{PhSe})_2$, mas somente com o selenol, ditioneitol (DTT) $500 \mu\text{M}$ foi usado como agente redutor do $(\text{PhSe})_2$.

As constantes de reação foram determinadas em pH 8,00, pH 7,45, pH 6,95 e pH 6,40. De acordo com a Figura 19, na medida em que o pH torna-se mais ácido, a velocidade da reação entre ONOO^- e $(\text{PhSe})_2$ aumenta. Em pH abaixo de 6,40 não foi possível avaliar a constante de reação, devido ao fato que tanto ONOO^- quanto o $(\text{PhSe})_2$ encontram-se protonados, ou seja, condição que não permite ocorrer reação entre o composto e o ONOO^- .

De acordo com os resultados abaixo, podemos inferir que o $(\text{PhSe})_2$ reage mais rapidamente com o ONOO^- em pH mais ácido. Baseado nestas informações, o $(\text{PhSe})_2$ mostra-se promissor na perspectiva de explicar seus efeitos protetores em modelos de isquemia, condição na qual observa-se uma acidose tecidual.

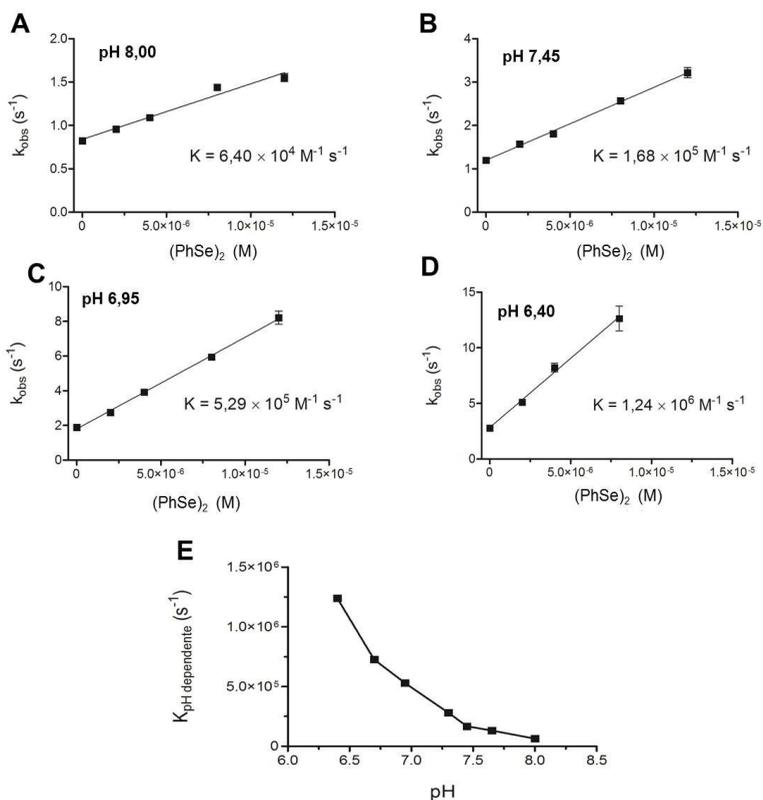


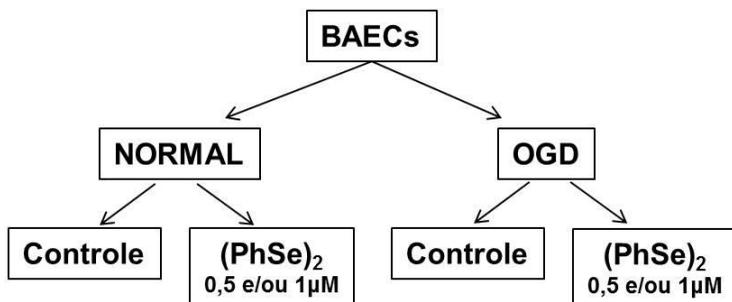
Figura 19: Determinação das constantes de reação (k) do ONOO⁻ com o (PhSe)₂ em diferentes pHs na presença de DTT. (A) em pH 8,00; (B) em pH 7,45; (C) em pH 6,95; (D) em pH 6,40; (E) curva demonstrando a K dependente do pH ($k_{\text{pH dependente}}(\text{s}^{-1})$). Estes resultados representam a média de pelo menos três diferentes experimentos e o *slope* foi determinado para calcular a constante k.

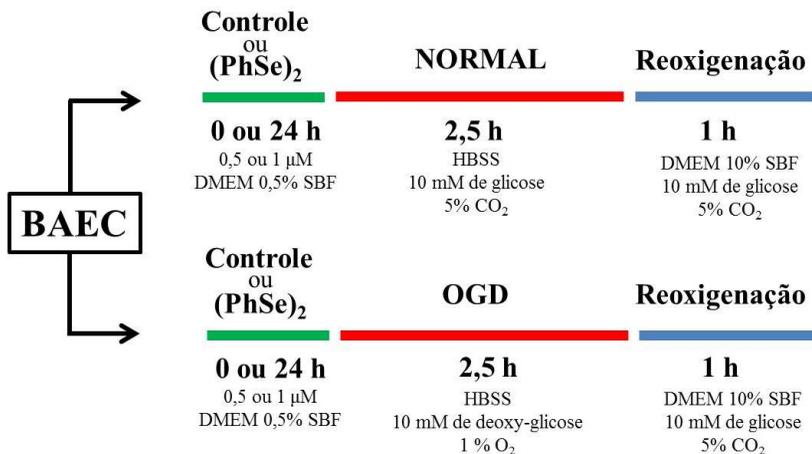
Baseado no fato do (PhSe)₂, na sua forma reduzida, apresentar uma constante de reação com ONOO⁻ mais efetiva em pH mais ácido, utilizamos um protocolo *in vitro* de OGD mimetizando o quadro de isquemia/reperfusão para avaliar o possível efeito protetor do (PhSe)₂ em cultivo de BAEC.

De acordo com o protocolo experimental apresentado abaixo (Esquema 2), células endoteliais foram separadas em dois grupos: Normal e OGD. No grupo chamado Normal, as células permaneceram com HBSS contendo 10 mM de glicose e mantidas em incubadora com

5% de CO₂ a 37°C por 2,5 horas. O grupo chamado de OGD consistiu em manter as células em HBSS contendo 10 mM de deoxi-glicose por 2,5 horas em câmara de hipóxia com 1% de oxigênio a 37°C. Em ambos os grupos, após o período de 2,5 horas, o HBSS foi substituído por meio de cultivo DMEM 10% SBF e as células foram mantidas por 1 hora em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C, para simular um quadro de reoxigenação ou reperusão.

Com o objetivo de verificar o possível efeito protetor do (PhSe)₂ em BAEC frente a OGD, diferentes concentrações de (PhSe)₂ (0,5 e 1,0 μM) e tempos de incubação (0 e 24 horas) foram utilizados de acordo com o protocolo experimental (Esquema 2). Consideramos como pré-incubação o tempo de 24 horas e como co-incubação o tempo 0 hora, ou seja, o (PhSe)₂ foi adicionado no momento inicial de OGD. Desta forma, os grupos Normal e OGD foram divididos novamente em mais dois grupos, o controle e o (PhSe)₂. O grupo Controle recebeu apenas o veículo (DMSO 0,05%).





Esquema 2: Protocolo experimental de OGD.

Uma vez padronizado o protocolo experimental, inicialmente avaliamos o efeito da OGD sobre a viabilidade celular das BAEC e o provável efeito protetor do (PhSe)₂ neste modelo. Através do método de MTT, podemos verificar que as células expostas ao modelo de OGD diminuíram significativamente a viabilidade celular e que o (PhSe)₂, nas concentrações de 0,5 e 1 μM, foi efetivo em prevenir o dano induzido pela OGD. Além disso, tanto a pré-incubação (Figura 20A) quanto o tratamento concomitante (Figura 20B) com (PhSe)₂ no momento da OGD (co-incubação), foram eficientes em prevenir a morte celular. Vale ressaltar que a avaliação da morte celular foi verificada 24 horas após a OGD, assim mesmo no grupo de co-incubação o (PhSe)₂ permaneceu no meio de cultivo por 24 horas.

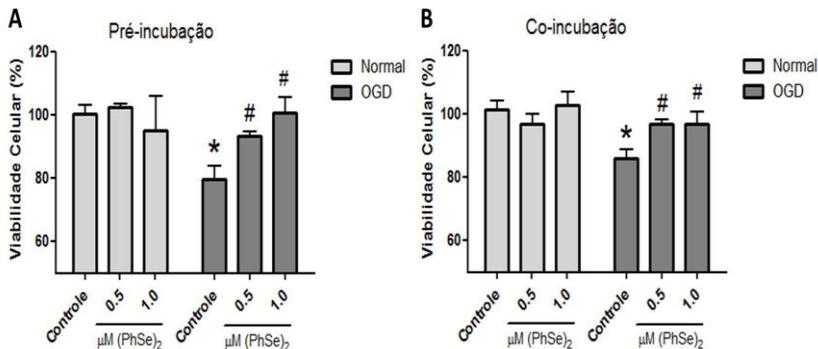


Figura 20: O (PhSe)₂ protege as células endoteliais da morte induzida pela OGD no teste de MTT. (A) Células endoteliais pré-incubadas com o (PhSe)₂ por 24 horas antes da OGD nas concentrações de 0,5 e 1 μM. (B) Células endoteliais incubadas com o (PhSe)₂ concomitantemente à OGD. O ensaio do MTT foi realizado após 24 horas da OGD. Os resultados estão expressos como porcentagem do Normal-controle e são médias ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. * $p < 0,05$ indica a diferença em relação ao grupo Normal-controle; # $p < 0,05$ indica a diferença em relação ao grupo OGD-controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan).

Para caracterizar a morfologia nuclear induzida pela OGD, utilizamos o método morfológico de Hoechst, em que as células apoptóticas apresentam o núcleo com cromatina condensada e fragmentada. Hoechst 33342 é um corante que marca DNA nuclear. De acordo com a Figura 21, podemos observar que as BAEC expostas a OGD diminuíram sua viabilidade e que a morte celular está relacionada à indução de apoptose, caracterizada pela fragmentação nuclear e condensação da cromatina. Da mesma forma que no teste do MTT, tanto a pré-incubação (Figura 21B) quanto a co-incubação (Figura 21C) com (PhSe)₂ foram efetivos em prevenir a apoptose provocada pelo OGD. Desta forma, podemos concluir que o método de privação de glicose e oxigênio, seguido de reoxigenação, promoveu diminuição na viabilidade celular e isto se deve a ativação de morte por apoptose. Por outro lado, a presença do composto (PhSe)₂ foi capaz de prevenir este dano celular, confirmando seu efeito citoprotetor.

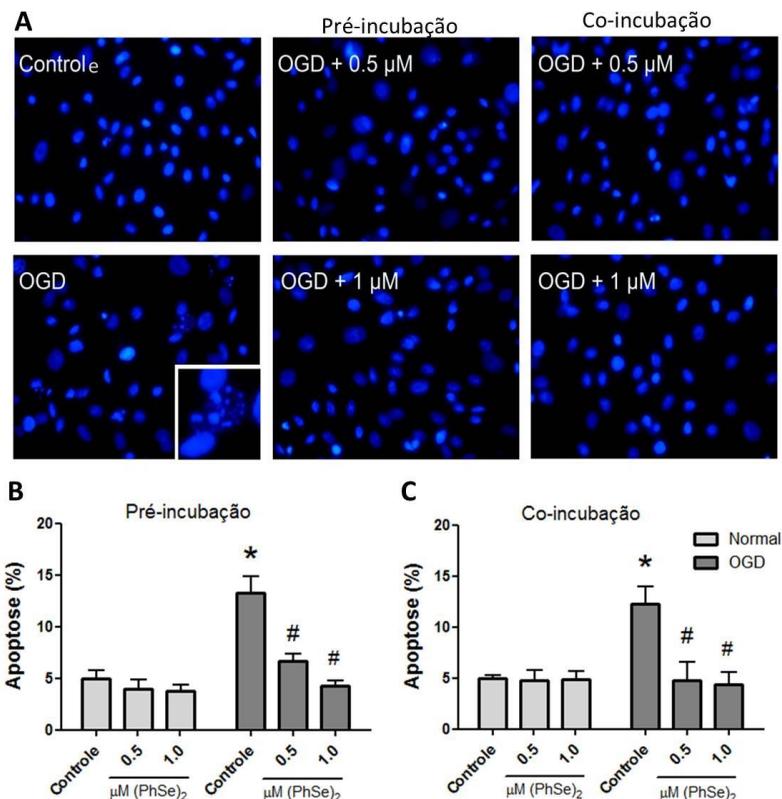


Figura 21: O (PhSe)₂ protegeu as células endoteliais da morte apoptótica induzida pela OGD. (A) Microfotografia representativa marcando em azul as células coradas com Hoeschst 33342. Magnitude 20x. Detalhe no quadrante OGD, com aumento (40x) demonstrando células com núcleo picnótico. (B) Células endoteliais incubadas com o (PhSe)₂ nas concentrações 0,5 e 1 μM por 24 horas antes da OGD e em (C) concomitantemente à OGD. Os resultados foram expressos como porcentagem de células apoptóticas presentes no Normal-controle e são médias ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. * $p < 0,05$ indica a diferença em relação ao grupo Normal-controle; # $p < 0,05$ indica a diferença em relação ao grupo OGD-controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan).

Durante o processo de isquemia-reperfusão, observa-se um intenso dano oxidativo e geração de $O_2^{\cdot -}$ tanto pela indução da disfunção mitocondrial quanto pela ativação de enzimas oxidativas

citoplasmáticas, como as isoformas da NOX. Este desequilíbrio redox favorece a disfunção endotelial caracterizada pela diminuição na biodisponibilidade de NO nas células endoteliais, através de sua reação com o excesso de $\text{O}_2^{\cdot-}$ para formar ONOO^- , a uma constante de reação de $k \sim 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Ferrer-Sueta e Radi, 2009). Desta forma, através da avaliação da oxidação da sonda dihidrorodamina (DHR), pode-se determinar de forma indireta a produção de ONOO^- em células endoteliais (Radi et al., 2001).

De acordo com a Figura 22, a OGD promoveu um aumento da oxidação da DHR, evidenciado pela intensa fluorescência celular no grupo OGD, indicando um aumento na produção de ONOO^- . Conforme a Figura 22A e B, a pré-incubação com o $(\text{PhSe})_2$ na concentração de $0,5 \mu\text{M}$ protegeu parcialmente as células endoteliais do aumento na geração de ONOO^- , enquanto a concentração de $1 \mu\text{M}$ foi mais efetiva. Em contrapartida, a co-incubação (Figura 22A e C) não foi efetiva em impedir a produção de ONOO^- induzida pela OGD nas células endoteliais.

Através desses resultados, podemos inferir que o pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ por 24 horas foi capaz de proteger as células contra a OGD, provavelmente por ativar sistemas de defesas antioxidantes através da indução de fatores de transcrição relacionadas a síntese de enzimas antioxidantes, melhorando as defesas antioxidantes celulares e, desta forma, protegendo as células endoteliais contra a geração de ONOO^- e os danos oxidativos. Por outro lado, verificamos que o co-tratamento não foi eficaz em diminuir a produção de ONOO^- , reforçando a ideia de que o efeito do $(\text{PhSe})_2$ não é apenas um efeito *scavenger* direto e que necessita de uma resposta antioxidante intracelular.

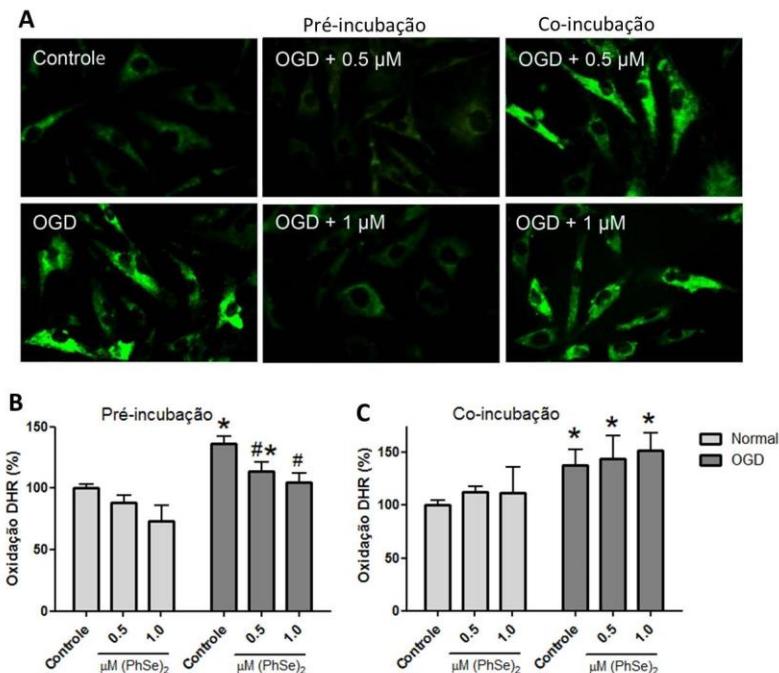


Figura 22: O (PhSe)₂ diminuiu a geração de ONOO⁻ promovido pela OGD. (A) Imagem representativa do grupo OGD marcando em verde a sonda fluorescente DHR. Magnitude 20x. Representação gráfica das leituras fluorimétricas de (B) pré-incubação e (C) co-incubação com o (PhSe)₂ nas concentrações 0,5 e 1 μM. Os resultados foram expressos como porcentagem de oxidação da DHR e representam médias ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. * $p < 0,05$ indica a diferença em relação ao grupo Normal-controle; # $p < 0,05$ indica a diferença em relação ao grupo OGD-controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan).

Reforçando os dados obtidos com as imagens celulares, na Figura 23, através da avaliação da cinética de oxidação da DHR, acompanhamos o aumento na produção de ONOO⁻ durante o período de 60 minutos, após as células endoteliais terem sido expostas ao protocolo experimental de OGD. Este aumento observado na produção de ONOO⁻ pode estar relacionado com uma disfunção endotelial promovida pela OGD, uma vez que o aumento na geração de ONOO⁻ pode comprometer a biodisponibilidade de [•]NO. Além disso, corroborando com os

resultados apresentados na Figura 22, a co-incubação das BAEC com $(\text{PhSe})_2$ não foi efetiva em prevenir a formação de ONOO^- , porém a pré-incubação diminuiu a produção de ONOO^- induzida pela OGD.

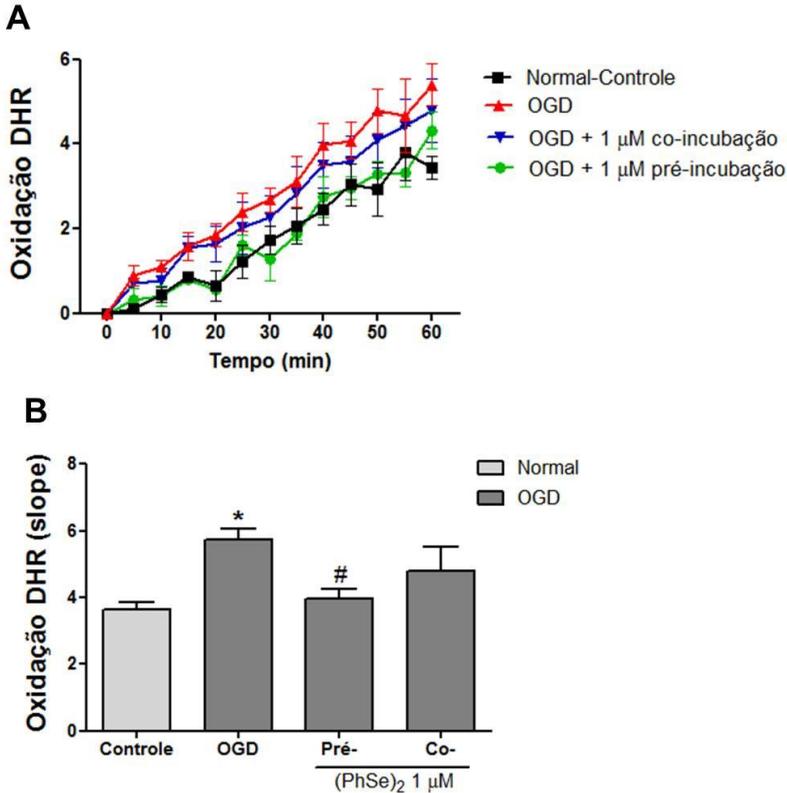


Figura 23: O $(\text{PhSe})_2$ preveniu a geração de ONOO^- induzido pela OGD em células endoteliais. As células endoteliais foram submetidas ao protocolo de OGD e depois a cinética de oxidação da DHR foi acompanhada por 60 minutos. O $(\text{PhSe})_2$ foi pré-incubado por 24 horas antes ou co-incubado no momento da OGD. (A) Taxa de oxidação de DHR calculada a partir da cinética representada na figura A. Os resultados representam a média \pm erro padrão de pelo menos três determinações independentes. * $p < 0,05$ indica a diferença em relação ao grupo Normal-controle; # $p < 0,05$ indica a diferença em relação ao grupo OGD-controle (ANOVA de uma via, seguida do teste de *post hoc* Tukey).

A produção de ERO/ERN pelas mitocôndrias tem um papel importante no dano causado pela isquemia-reperfusão (De Pascali et al., 2014). Embora a mitocôndria possa ser considerada como a principal fonte geradora de espécies reativas, ela também pode ser alvo destas, podendo levar a disfunção mitocondrial. Neste sentido, avaliamos o efeito da OGD no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e o papel do $(\text{PhSe})_2$ como agente protetor. O $\Delta\Psi_m$ foi determinado através da sonda fluorescente JC-1, conforme descrito em material e métodos.

Através da razão entre a fluorescência emitida pela forma agregado/monômero (vermelho/verde) da sonda, verificamos que a OGD promoveu uma diminuição do $\Delta\Psi_m$ nas células expostas ao protocolo experimental, enquanto o pré-tratamento por 24 horas com 1 μM de $(\text{PhSe})_2$ preveniu este dano, conforme demonstrado na Figura 24. Este dado fortalece a hipótese de que a OGD promove disfunção mitocondrial e que o composto, quando pré-incubado, desempenha um efeito protetor por melhorar o ambiente antioxidante celular e prevenir a perda do potencial de membrana mitocondrial.

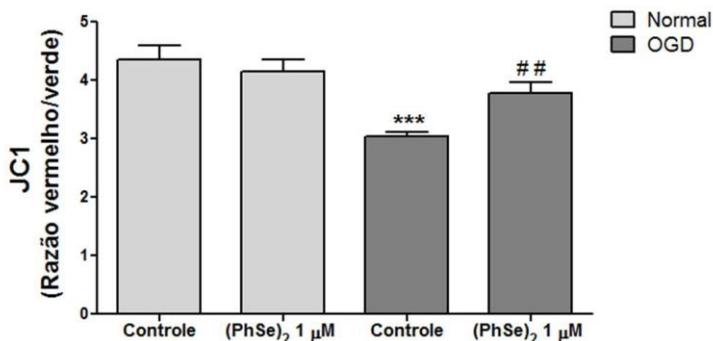


Figura 24: O $(\text{PhSe})_2$ preveniu a perda do $\Delta\Psi_m$ provocado pela OGD. As células endoteliais foram pré-incubadas por 24 horas com $(\text{PhSe})_2$ ou veículo antes de serem submetidas ao protocolo de OGD. O resultado da fluorescência da sonda JC-1 foi quantificada e expressa como razão vermelho/verde. Os resultados representam média \pm erro padrão de pelo menos três determinações independentes. *** $p < 0,001$ indica a diferença em relação ao grupo Normal-controle; ## $p < 0,01$ indica a diferença em relação ao grupo OGD-controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan).

Uma vez que a OGD promoveu diminuição do $\Delta\Psi_m$, indicando uma disfunção mitocondrial nas células endoteliais, nosso próximo

passo foi avaliar o consumo de oxigênio nestas células expostas ao protocolo de OGD, utilizando respirometria de alta resolução (Oroboros Oxygraph-O2K) com as células não permeabilizadas. As células endoteliais foram incubadas com $(\text{PhSe})_2$ na concentração de $1 \mu\text{M}$ por 24 horas e após submetidas ao protocolo de OGD. Após o protocolo experimental, as células foram coletadas e adicionadas ao oxígrafo e os parâmetros respiratórios foram determinados conforme descritos em material e métodos.

Inicialmente o estado basal respiratório mitocondrial foi determinado, e depois a ATP sintase foi inibida com a adição de oligomicina, sendo assim possível determinar o consumo de oxigênio acoplado a síntese de ATP (ATP Linked). Para determinar o máximo consumo de oxigênio que as células podem sustentar, foi adicionado através de uma titulação um ionóforo de próton, o desacoplador FCCP. Após atingir a máxima capacidade respiratória através do uso de FCCP, o fluxo de elétrons da cadeia transportadora de elétrons foi bloqueado utilizando Antimicina A, um inibidor do complexo III mitocondrial. O fluxo de oxigênio detectado após a inibição do complexo III foi definido como consumo de oxigênio extra-mitocondrial.

Através do RCR (respiratory control ratio), podemos avaliar a eficiência respiratória da mitocôndria na utilização de oxigênio, acoplada ou não a síntese de ATP. Como mostram as Figuras 25B e D, o RCR e ATP Linked, respectivamente, das células endoteliais expostas ao protocolo de OGD não sofreram alterações, indicando que o modelo experimental usado neste trabalho não alterou o fluxo de consumo de O_2 mitocondrial relacionado a síntese de ATP.

Quando utilizamos FCCP, o gradiente de prótons foi dissipado e o fluxo de oxigênio mitocondrial levado a capacidade máxima na célula. Esta máxima capacidade respiratória menos a respiração basal é chamada de capacidade de reserva. De acordo com a Figura 25C, células expostas ao protocolo de OGD, apresentam uma capacidade de reserva significativamente menor que as células controle. Em contrapartida, o pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ por 24 horas antes da OGD, preveniu a diminuição da capacidade de reserva das mitocôndrias endoteliais. De acordo com esses dados, podemos sugerir que o modelo utilizado de OGD neste trabalho modificou a capacidade de reserva mitocondrial, diminuindo, assim, sua capacidade respiratória frente a uma situação em que a mitocôndria é exposta a um agressor oxidativo, como ocorre em condições de hipóxia seguido de reoxigenação.

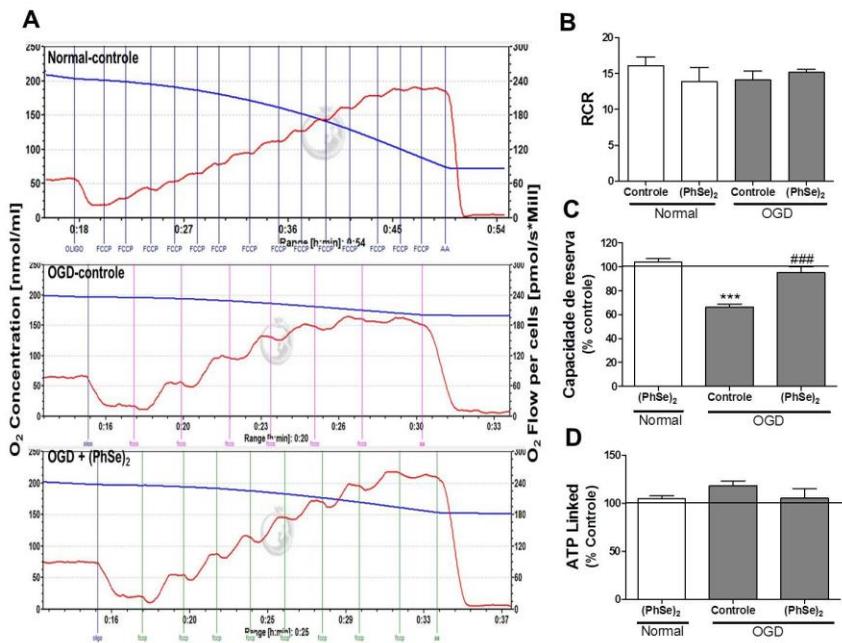


Figura 25: O (PhSe)₂ preservou a capacidade de reserva respiratória mitocondrial de células endoteliais expostas a OGD. As células endoteliais foram pré-incubadas por 24 horas com (PhSe)₂ ou veículo antes de serem submetidas ao protocolo de OGD. (A) Histogramas representativos do consumo de oxigênio registrado pelo Oxígrafo. (B) Determinação do RCR (Máxima capacidade respiratória/oligomicina). (C) Capacidade de reserva respiratória (Máxima capacidade respiratória/ respiração basal) expressa como porcentagem em relação ao grupo Normal-controle. (D) Consumo de O₂ acoplado a síntese de ATP (Respiração basal – oligomicina) expresso como porcentagem em relação ao grupo Normal-controle. Os resultados representam a média ± erro padrão de pelo menos três determinações independentes. *** $p < 0,001$ indica a diferença em relação ao grupo Normal-controle; ### $p < 0,001$ indica a diferença em relação ao grupo OGD-controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan).

De acordo com os resultados apresentados neste terceiro e último bloco experimental, podemos sugerir que o (PhSe)₂, na sua forma reduzida selenol, aumenta a constante de reação com ONOO⁻ na medida em que o pH diminui, sugerindo apresentar um efeito protetor em casos de acidose metabólica, como ocorre na hipóxia.

Além disso, a pré-incubação por 24 horas com $(\text{PhSe})_2$ apresentou efeito protetor em células endoteliais submetidas ao protocolo de OGD seguido de reperfusão. Este composto preveniu a diminuição da viabilidade celular e morte por apoptose, bem como foi eficaz na prevenção da geração de ONOO^- e disfunção mitocondrial, eventos promovidos pela OGD.

Esta proteção proporcionada pelo $(\text{PhSe})_2$ frente aos danos induzidos pela OGD neste protocolo experimental, pode estar relacionada, ao menos em parte, a sua atividade antioxidante como mimético da GPx e por outro lado, pela capacidade de ativar fatores de transcrição responsáveis por promover aumento da expressão de enzimas antioxidantes, diminuindo desta forma os efeitos nocivos provocados por espécies reativas, tanto de oxigênio quanto de nitrogênio e melhorando, assim, o ambiente redox celular.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos os mecanismos moleculares referentes ao efeito protetor do composto organoselênio (PhSe)₂ através de diferentes modelos celulares *in vitro* relacionados à aterosclerose. Nossos resultados demonstram que o (PhSe)₂ preveniu vários eventos relacionados à toxicidade da LDLox e melhorou a resposta antioxidante celular em macrófagos, verificado pela diminuição na geração de ERO/ERN e aumento na biossíntese de GSH dependente da ativação do fator de transcrição Nrf2, bem como pela modulação da atividade e expressão de importantes enzimas antioxidantes dependentes ou não deste fator. Paralelamente, verificamos que o (PhSe)₂ foi capaz de prevenir diversas alterações metabólicas em células endoteliais submetidas ao protocolo de privação de oxigênio e glicose (OGD).

Considerando que os efeitos citotóxicos mediados pelas espécies reativas são eventos circunstanciais no processo aterogênico, a busca e investigação de compostos com propriedades antioxidantes são relevantes. Neste sentido, nos últimos anos o composto organoselênio (PhSe)₂ tem recebido relativo destaque devido as suas propriedades antioxidante e antiaterogênica (de Bem et al., 2009, Hort et al., 2014).

Estudos têm demonstrado que macrófagos expostos à LDLox são estimulados a produzirem espécies reativas, levando estas células ao desenvolvimento de estresse oxidativo (Deng et al., 2008, Levitan et al., 2010). Em nosso estudo, demonstramos que macrófagos pré-tratados com (PhSe)₂ diminuíram significativamente, a produção de ERO induzida pela LDLox, indicando que este composto apresenta propriedades antioxidantes. Inicialmente as propriedades antioxidantes do (PhSe)₂ foram atribuídas a sua capacidade de mimetizar a enzima GPx e, desta forma, diminuir o estresse oxidativo (Nogueira e Rocha, 2010). Corroborando com nosso trabalho, Rosenblat e Aviram (1998) demonstraram que a inibição química da atividade da GPx1 em macrófagos resulta em aumento na geração de peróxidos e superóxidos.

Apesar de a mitocôndria ser a principal fonte geradora de ERO/ERN, esta organela também pode sofrer danos causados por espécies reativas (Perfettini et al., 2005). Estudos anteriores demonstraram que a LDLox diminuiu a atividade da cadeia respiratória mitocondrial e induziu aumento de ERO em células endoteliais (Matsunaga et al., 2001). Em nosso trabalho, observamos que a LDLox promoveu uma diminuição do $\Delta\Psi_m$ em macrófagos. Corroborando com os nossos resultados, Asmis e Begley (2003) demonstraram que a LDLox induziu um aumento na geração de peróxidos e diminuição do

$\Delta\Psi_m$ em macrófagos humanos. Em contrapartida, quando pré-tratamos os macrófagos com $(\text{PhSe})_2$, este composto preveniu a dissipação do $\Delta\Psi_m$ induzida pela LDLox e esse efeito pode ser atribuído, em parte, às suas propriedades antioxidantes. Da Silva e colaboradores (2012) demonstraram que o $(\text{PhSe})_2$ restaurou o $\Delta\Psi_m$ em mitocôndrias isoladas de cérebro e inibiu a geração de ERO em cérebro de camundongos após a exposição ao acetaminofen.

O aumento da produção de ERO induzidos pela LDLox pode ser responsável por ativar diferentes vias relacionadas com a morte celular, que pode ocorrer devido a disfunção mitocondrial ou por regulação negativa de proteínas anti-apoptóticas (Tan et al., 1998, Ou et al., 2007). Em nosso estudo, a produção de ERO e a disfunção mitocondrial induzidas pela LDLox foram relacionadas com uma diminuição na viabilidade dos macrófagos, enquanto o pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ preveniu estes eventos, reforçando a hipótese de que este composto pode prevenir os efeitos citotóxicos da LDLox através da inibição na geração de ERO.

Os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 são fatores sensíveis à variação redox e podem ser ativados durante processos inflamatórios (Karin et al., 2001). A ativação destes fatores de transcrição podem induzir aumento em vários mediadores inflamatórios, como a iNOS, MMPs, receptor CD36, entre outros (Napoli, 2003, Maziere e Maziere, 2009). O fator de transcrição NF- κ B é um forte candidato para mediar os efeitos das ERO, porque a interação entre a proteína inibitória I κ B e NF- κ B é regulada por proteínas cinases que contêm vários resíduos de cisteína sensíveis a variações redox. Neste sentido, H_2O_2 aumentou a translocação nuclear de AP-1 e NF- κ B em células de hepatocarcinoma (Chiu et al., 2010).

Em nosso trabalho, verificamos que a exposição de macrófagos à LDLox rapidamente induziu a ativação de NF- κ B, promovendo a sua translocação para o núcleo, enquanto que o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ inibiu a translocação do NF- κ B e atividades relacionadas a este fator. Consistente com este resultado, recentemente demonstramos que o aumento mediado pela LDLox nos níveis de TNF- α e MCP-1, mediadores inflamatórios regulados pelo fator de transcrição NF- κ B, foi inibido pelo tratamento com $(\text{PhSe})_2$ em macrófagos (Hort et al., 2011).

A internalização de LDLox com a formação de células espumosas em macrófagos ocorre através de mecanismos envolvendo diferentes receptores de superfície celular. Neste contexto, o receptor CD36 desempenha um papel importante. Está bem estabelecido que as ERO promovem a ativação do fator NF- κ B e este regula positivamente a

expressão do receptor CD36 (Rios et al., 2012). Verificamos que o $(\text{PhSe})_2$ eficientemente diminuiu a internalização de LDLox e consequente formação de células espumosas. Este efeito pode estar relacionado com a capacidade do $(\text{PhSe})_2$ em decompor os hidroperóxidos orgânicos da LDLox através da ação do seu intermediário selenol e/ou por diminuir a produção de ERO pelos macrófagos ativados, melhorando a resposta antioxidante celular e consequentemente diminuindo a expressão e atividade do receptor CD36 no reconhecimento e captação de LDLox.

Os macrófagos expressam altos níveis de MMPs, principalmente MMP-2 e MMP-9, em resposta a estímulos oxidativos e inflamatórios. Estas MMPs estão altamente expressas em regiões vulneráveis da placa aterosclerótica e estão envolvidas no processo de remodelamento vascular associado à aterogênese e a ruptura da placa (Loftus et al., 2000, Galis e Khatri, 2002). Xu e colaboradores (1999) demonstraram que LDLox induz aumento na expressão de MMP-9 em linhas celulares de macrófagos. Em nosso trabalho, demonstramos por duas diferentes abordagens metodológicas que LDLox induziu um aumento significativo na atividade da MMP-9 e Colagenases tipo IV em macrófagos, a qual foi atenuada pelo pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$. Este efeito pode estar relacionado à inibição da ativação do fator NF- κ B.

O $\cdot\text{NO}$ tem papel relevante no processo aterogênico por induzir vasorelaxamento e reduzir a proliferação de células musculares lisas vasculares e diminuindo a agregação plaquetária (Patel et al., 2000). Persson e colaboradores (2009) demonstraram que a LDLox aumenta a expressão de iNOS e produção de $\cdot\text{NO}$ em macrófagos. Em nosso modelo experimental, a exposição de macrófagos à LDLox induziu um aumento significativo tanto no imunocontéudo de iNOS, quanto nos níveis de $\cdot\text{NO}$, enquanto que o pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ preveniu estes eventos. Corroborando com nossos resultados, Shin e colaboradores (2009) relataram que outro disseleneto, bis-(3-hidroxifenil) disseleneto (DSE-B), inibiu significativamente a produção de $\cdot\text{NO}$ e diminuiu os níveis proteicos de iNOS em macrófagos estimulados com LPS. Recentemente, Rupil e colaboradores (2012) demonstraram que $(\text{PhSe})_2$ inibiu a produção de $\cdot\text{NO}$ de maneira dose dependente em macrófagos peritoneais ativados por LPS e este efeito foi correlacionado com uma diminuição na expressão de iNOS.

Os resultados até aqui apresentados sugerem que os efeitos citoprotetores do $(\text{PhSe})_2$ estão relacionados com sua ação antioxidante. Acreditamos que seu efeito na prevenção da geração de radicais livres mediado pela LDLox pode proporcionar um ambiente celular favorável,

inibindo a ativação de NF- κ B e a morte celular. Este efeito antioxidante do (PhSe)₂ pode ser explicado, em parte, à sua capacidade em decomposição de hidroperóxidos orgânicos de LDLox através da atividade mimética a GPx. Por outro lado, este composto poderia estar agindo via ativação de fatores de transcrição responsáveis pela expressão gênica de enzimas antioxidantes e de fase II, levando a melhora nas defesas antioxidantes celulares. Neste sentido, nosso próximo trabalho buscou investigar quais mecanismos estão envolvidos no efeito do (PhSe)₂ em melhorar o ambiente redox celular.

O (PhSe)₂ possui atividade mimética a GPx e de acordo com seu ciclo catalítico utiliza GSH como equivalente redutor para formar selenol, o qual é o responsável pela atividade antioxidante deste composto (Nogueira e Rocha, 2010). A GSH é um tripeptídeo ubiquamente presente nas células de mamíferos em concentrações milimolares (1-10 mM) (Pastore et al., 2003). De grande relevância, verificamos que o (PhSe)₂ induziu aumento nos níveis de GSH em macrófagos mesmo quando expostos por curto tempo (1 hora), estando este resultado relacionado ao aumento na atividade da enzima de síntese de GSH, a GGCS. Esses dados estão de acordo com resultados preliminares de nosso grupo (de Bem et al., 2013) em que o (PhSe)₂ promoveu aumento dos níveis de GSH e atividade de GGCS em células endoteliais. Um aumento nos níveis de GSH pode promover maior resistência celular frente aos danos oxidativos decorrentes do processo aterosclerótico.

A indução de síntese da GGCS se dá por mecanismo dependente da ativação do fator de transcrição Nrf2. O Nrf2 é um fator de transcrição que, em condições basais, encontra-se na forma inativa e retido no citosol ligado ao seu repressor Keap1 e está marcado para a degradação proteossomal dependente de ubiquitina (Itoh et al., 2004). Uma das formas de desfazer a interação Nrf2/Keap1 e induzir a translocação do Nrf2 para o núcleo se dá através da oxidação dos resíduos de cisteína presentes no Keap1. Uma vez no núcleo, o Nrf2 se liga ao elemento responsivo antioxidante (ARE) e induz a transcrição de genes que estão envolvidos na biossíntese da GSH, de enzimas de detoxicação e outras enzimas envolvidas na melhora da defesa antioxidante celular (Turpaev, 2013).

Verificamos que (PhSe)₂, quando incubado em macrófagos, induziu uma rápida ativação e translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2, enquanto os níveis citosólicos não foram alterados. Isto pode estar relacionado ao fato que o Nrf2 é uma proteína que possui uma meia vida (T_{1/2}) relativamente curta de 18,5 minutos em macrófagos

peritoniais de camundongos (Tkachev et al., 2011, Zenkov et al., 2013), o que poderia justificar um aumento na síntese constitutiva de novas moléculas Nrf2 e desta forma mantendo a concentração no ambiente citosólico.

Nosso resultado está de acordo com um recente estudo realizado pelo nosso grupo com células endoteliais, onde os compostos ebselen e $(\text{PhSe})_2$ induziram a ativação e translocação do fator Nrf2, aumentando os níveis de GSH e atividade da GGCS (de Bem et al., 2013). De fato, este composto é capaz de ativar a translocação de Nrf2 e induzir a biossíntese de GSH em curto tempo. Isto explicaria o fato do $(\text{PhSe})_2$ promover aumento dos níveis de GSH e não uma diminuição, uma vez que este composto reage com grupamentos $-\text{SH}$, principalmente da GSH, como agente redutor para gerar sua forma biologicamente ativa, o selenol. Desta forma, sugerimos que o $(\text{PhSe})_2$ possa promover a oxidação de resíduos de cisteína do Keap1 e, assim, favorecer a translocação do Nrf2 do citosol ao núcleo e sua ligação ao ARE.

Adicionalmente à oxidação de Keap1, outra forma de ativação e translocação nuclear do Nrf2 podem ser mediada pela fosforilação de resíduos específicos do Nrf2. Este processo de regulação requer a participação de vias de sinalização, como proteínas cinases p38MAPK, ERK, JNK, PI3K e PKC (Huang et al., 2002, Rojo et al., 2008, Vrba et al., 2013). Neste sentido, com o intuito de verificar se a ativação na cascata de fosforilação está também relacionada com a translocação do Nrf2, nós avaliamos o papel das vias p38, JNK e PI3K na modulação da translocação nuclear do Nrf2 e na atividade da enzima GGCS, a qual foi claramente induzida pelo $(\text{PhSe})_2$. Quando inibidores específicos das vias p38, JNK e PI3K foram utilizados, a translocação de Nrf2 foi significativamente inibida, assim como a atividade da GGCS induzida pelo $(\text{PhSe})_2$, demonstrando que a modulação da atividade desta enzima, dependente de Nrf2 induzida pelo $(\text{PhSe})_2$, é também dependente da fosforilação do fator Nrf2.

Relatos da literatura demonstraram que a inibição das cinases p38 e JNK impedem a ativação de Nrf2 e a indução de genes responsáveis pela transcrição de enzimas relativas à síntese de GGCS (Zipper e Mulcahy, 2000). Posser e colaboradores (2011) descreveram que concentrações menores que $3 \mu\text{M}$ do $(\text{PhSe})_2$ induziram a fosforilação de p38, ERK1/2 e PKC em células de neuroblastoma humano e em células de hepatocarcinoma humano. Em adição, o ebselen induziu a ativação do fator Nrf2 dependente da ativação de ERK1/2 (Tamasi et al., 2004). Estes dados reforçam a hipótese que o $(\text{PhSe})_2$ ativa o fator Nrf2, tanto via fosforilação do Nrf2, quanto pela oxidação

de resíduos de cisteína do Keap1. Estudos adicionais necessitam ser realizados para melhor compreensão da modulação via fosforilação do Nrf2 pelo (PhSe)₂.

Várias enzimas envolvidas no sistema antioxidante celular são reguladas pelo fator de transcrição Nrf2. Neste sentido, avaliamos ainda o efeito do (PhSe)₂ nos níveis proteicos das enzimas HO-1 e Prx-1 em macrófagos, as quais também são moduladas pelo fator Nrf2 (Huang et al., 2002). Podemos observar que a resposta modulatória na indução destas enzimas foi mais tardia, sendo observada somente após 24 horas de exposição ao (PhSe)₂. Resultados semelhantes foram observados em células endoteliais, em que somente após 24 horas de exposição ao (PhSe)₂ ocorreu aumento na expressão da Prx-1 (Fiuza et al., 2015). Adicionalmente, Glaser e colaboradores (2014) verificaram que células astrogliais C6, apresentaram um aumento na expressão de HO-1 após 24 horas da exposição ao (PhSe)₂, reforçando nosso resultado em que vimos um efeito tardio na indução destas enzimas, vinculadas ao fator Nrf2.

O sistema antioxidante vinculado a GPx é um importante sistema de defesa celular relacionado a proteção contra o processo aterosclerótico. Uma vez que o (PhSe)₂ possui atividade mimética a GPx (Nogueira et al., 2004), avaliar a atividade desta enzima após exposição a este composto é de grande importância. Observamos que já em baixa concentração o (PhSe)₂ promoveu um aumento da atividade de GPx nos macrófagos, após um curto período de exposição. Faz-se importante salientar que o meio de cultura foi completamente removido para a determinação da atividade de GPx, descartando a possibilidade que o aumento da atividade seja devido a presença do composto no meio. Desta forma, podemos sugerir que o aumento promovido pelo (PhSe)₂ na atividade de GPx pode ser atribuído à sua ação sobre as células e não pela sua ação direta pela presença no meio de reação.

Considerando que o (PhSe)₂ promove uma rápida ativação e translocação do fator Nrf2 ao núcleo, avaliamos a expressão da isoforma GPx2, a qual é dependente de Nrf2. Verificamos que os níveis proteicos de GPx2 aumentaram somente 24 horas após exposição ao (PhSe)₂, ou seja, uma resposta tardia provavelmente vinculada à ativação do fator de transcrição, não coincidindo com o rápido aumento observado sobre a atividade da GPx. Resultado semelhante foi verificado em células endoteliais, em que a atividade da GPx e os níveis proteico de GPx4, isoforma dependente de Nrf2, aumentaram após 24 horas de incubação com (PhSe)₂ (de Bem et al., 2013). Isto demonstra que a resposta na

expressão das isoformas de GPx dependentes de Nrf2 ocorre tardiamente.

O selênio é um micronutriente essencial e além de estar presente em selenoproteínas com atividades antioxidantes, ele também integra a estrutura de compostos organoselênio, como o $(\text{PhSe})_2$. Para descartar que o $(\text{PhSe})_2$ possa atuar como um doador de selênio e este estar induzindo aumento da expressão de selenoproteínas como GPx, recente estudo do nosso grupo demonstrou que o tratamento de células endoteliais com selênio inorgânico (0,1 a 1 μM) não apresentou efeito protetor na detoxificação de ONOO^- , diferente de quando as células foram tratadas com $(\text{PhSe})_2$, demonstrando desta forma que o efeito citoprotetor é devido ao composto $(\text{PhSe})_2$ e não pela liberação de selênio no meio (Fiuza et al., 2015).

Buscando encontrar uma resposta ao rápido aumento da atividade da GPx promovida pelo $(\text{PhSe})_2$ avaliamos os níveis proteicos da isoforma GPx1. Observamos que o imunoconteúdo de GPx1 aumentou em apenas 1 hora após a exposição ao $(\text{PhSe})_2$, sendo que a ativação desta isoforma específica poderia contribuir para o aumento na atividade da enzima GPx, visto que verificamos o aumento dos níveis proteicos desta isoforma e atividade da GPx no mesmo tempo. Relatos na literatura associam a deficiência de GPx1 com disfunção endotelial e estresse oxidativo vascular em modelo animal de aterosclerose, demonstrando sua importância na aterosclerose (Forgione et al., 2002). Interessante é o fato que esta isoforma não é modulada pelo fator Nrf2, sugerindo que o $(\text{PhSe})_2$ pode atuar também através de mecanismo não dependente da via Nrf2. A isoforma GPx1 está presente no citosol e mitocôndria e é modulada através do fator de transcrição FoxO (Klotz et al., 2015).

A família FoxO em mamíferos tem um importante papel no metabolismo, diferenciação, sobrevivência e proliferação celular, além de controlar os níveis de espécies reativas celulares através da indução da transcrição de enzimas antioxidantes (Hagenbuchner e Ausserlechner, 2013, Klotz et al., 2015). O aumento da expressão da GPx1 induzida pelo $(\text{PhSe})_2$ sugere que este composto possa ativar FoxO. Esta via regula a expressão de uma importante enzima de detoxificação de $\text{O}_2^{\cdot-}$, a MnSOD (Eijkelenboom e Burgering, 2013). Corroborando com a nossa hipótese, verificamos que o $(\text{PhSe})_2$ aumentou a expressão de MnSOD em macrófagos após 6 horas de incubação. Também, no trabalho de Fiuza em colaboradores (2015) verificaram que o $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de aumentar a expressão de MnSOD

em células endoteliais, reforçando a evidência de que este composto possa ativar as vias de transcrição Nrf2 e FoxO.

Assim como Keap1, FoxO também possui resíduos de cisteína passíveis de serem oxidados (Dansen et al., 2009), desta forma, sugerimos que o (PhSe)₂ promova ativação de FoxO através de sua interação com resíduos de cisteína, promovendo sua translocação para o núcleo e desencadeando a transcrição de enzimas antioxidantes como a GPx1 e a MnSOD. Além disso, não descartamos a possibilidade da ativação de FoxO pelo (PhSe)₂ via fosforilação. Assim como Nrf2, FoxO também pode ser ativada por fosforilação em vários resíduos por proteínas cinases, como AMPK, JNK, ERK e p38MAPK e inibida pela fosforilação de PI3K-AKT (Webb e Brunet, 2014), porém ainda não está descrito como (PhSe)₂ ativa e modula o fator de transcrição FoxO.

Buscando compreender melhor os mecanismos citoprotetores do (PhSe)₂ em modelos experimentais relacionados a aterosclerose, avaliamos seus efeitos em relação a alterações metabólicas em células endoteliais da aorta bovina submetidas ao modelo isquemia-reperfusão. A isquemia-reperfusão ocorre quando o fluxo sanguíneo é interrompido temporariamente e após é restaurado. O processo de reperfusão é essencial ao tecido isquêmico para a sobrevivência, porém desencadeia um processo de dano oxidativo podendo levar à morte celular, através de uma intensa e rápida geração de ERO mitocondriais (Chouchani et al., 2014).

Em células endoteliais, a isquemia-reperfusão está caracterizada pelo estresse oxidativo com aumento da geração de O₂^{•-} e a consequente diminuição na biodisponibilidade de [•]NO, promovendo disfunção endotelial (Cai e Harrison, 2000, De Pascali et al., 2014). A geração aumentada de O₂^{•-}, principalmente pela mitocôndria, reage rapidamente com [•]NO produzindo ONOO⁻, uma espécie reativa de nitrogênio que está relacionada ao dano celular, disfunção mitocondrial, morte apoptótica, inibição da respiração celular e superprodução de ERO (Szabo et al., 2007, Ferrer-Sueta e Radi, 2009).

Neste sentido, utilizamos o protocolo de OGD para simular um quadro de isquemia-reperfusão e avaliamos as consequências geradas por este processo em cultivo celular de BAEC, bem como o efeito do (PhSe)₂ na proteção das funções endoteliais e mitocondriais. Nossos resultados demonstram o importante papel citoprotetor do (PhSe)₂ em prevenir a apoptose, geração de ONOO⁻ e consequente disfunção endotelial, bem como a prevenção da disfunção mitocondrial induzida nestas células pelo protocolo de OGD.

Embora a hipóxia sozinha possa ser capaz de gerar dano tecidual, evidências sugerem que uma grande geração de ERO/ERN coincide com o momento da reoxigenação e isto tornaria o dano ainda maior (Therade-Matharan et al., 2005). O envolvimento do ONOO⁻ em lesões ateroscleróticas humanas tem sido sugerido por sua capacidade em oxidar a LDL ou por nitrar resíduos de tirosina de proteínas celulares (Graham et al., 1993, Peluffo e Radi, 2007), além de promover disfunção endotelial e mitocondrial em modelos *in vitro* (de Bem et al., 2013).

Em nosso trabalho, inicialmente determinamos as constantes de reação entre o ONOO⁻ e (PhSe)₂ em diferentes pHs. Utilizando o sistema *stopped flow*, através do qual verificamos que à medida que o pH diminui, a constante de reação aumenta, ou seja, quanto mais ácido o ambiente, maior a velocidade de reação entre o ONOO⁻ e o (PhSe)₂. De fato, a constante de reação em pH 6,4 ($k = 1,24 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) foi cerca de 10 vezes maior que em pH 7,4 ($k = 1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), pH considerado fisiológico na circulação sanguínea humana. Este resultado é importante pelo fato que o tecido isquêmico apresenta acidose devido ao metabolismo anaeróbico que passa a predominar, diminuindo o pH celular (Kalogeris et al., 2012). Assim, o (PhSe)₂ poderia estar contribuindo para diminuir os danos teciduais gerados pelo ONOO⁻. Para ocorrer a reação entre ONOO⁻ e (PhSe)₂, primeiramente o (PhSe)₂ precisa ser reduzido a forma ativa, ou seja, selenol, as custas de um agente redutor (Nogueira et al., 2004). De Bem e colaboradores (2013) demonstraram que a constante cinética de reação entre ONOO⁻ e (PhSe)₂ é de $2,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7,4, o que confirma nosso resultado. Além disso, Masumoto e colaboradores (Masumoto et al., 1996, Masumoto e Sies, 1996) verificaram que a constante de reação do ebselen com ONOO⁻ foi de $2,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 8,0, sugerindo maior eficiência deste composto comparado com o (PhSe)₂.

O grau de disfunção celular, danos celulares e/ou morte é influenciado tanto pela magnitude quanto pela duração da isquemia (Kalogeris et al., 2012). Durante a isquemia, além do oxigênio, o fornecimento de nutrientes também pode ser severamente diminuído, sendo restaurado após a reperfusão. Os dados encontrados em nosso trabalho demonstram que o protocolo de OGD empregado promove uma diminuição na viabilidade celular via indução de morte por apoptose.

Durante muitos anos, a morte celular induzida por isquemia/reperfusão foi atribuída a fatores extrínsecos, como privação de nutrientes, mediadores inflamatórios e oxidantes, induzindo morte celular denominada de necrose. No entanto, recentes trabalhos

demonstram que a morte celular induzida por isquemia se dá por mecanismos extrínsecos e intrínsecos de sinalização celular, acarretando morte por apoptose (Kroemer et al., 2009, Kalogeris et al., 2012). Verificamos que quando as células foram incubadas previamente ou concomitante a OGD com $(\text{PhSe})_2$ a viabilidade celular foi preservada. Este efeito protetor do $(\text{PhSe})_2$ pode ser devido sua ação já demonstrada anteriormente em melhorar o ambiente redox por indução de síntese de enzimas antioxidantes quando pré-incubado por 24 horas e também devido sua capacidade em reagir diretamente com espécies reativas devido sua atividade mimética a GPx quando tratado concomitante a OGD. Ghisleni e colaboradores (2003) demonstraram que o $(\text{PhSe})_2$ e o ebselen preveniram a diminuição da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos expostos a OGD e que este efeito foi atribuído a sua atividade antioxidante e anti-inflamatória, reforçando nossa hipótese.

A disfunção endotelial está fortemente relacionada à progressão de doenças cardiovasculares e caracteriza-se pela diminuição na biodisponibilidade de NO e aumento na produção de ONOO^- (Cai e Harrison, 2000). Neste sentido, avaliamos o efeito $(\text{PhSe})_2$ frente a geração de ONOO^- induzido pela OGD em células endoteliais. O pré-tratamento das células com $(\text{PhSe})_2$ preveniu a geração de ONOO^- induzido pela OGD e isto nos sugere que esta proteção tenha ocorrido devido a melhora nas defesas antioxidantes celulares induzida pelo composto. Recente estudo do nosso grupo mostrou que o pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ aumentou os níveis proteicos de Prx-1 e Prx-3, eficientes enzimas de detoxificação de ONOO^- além de prevenir células endoteliais da disfunção mitocondrial induzida pelo ONOO^- (Fiuza et al., 2015). Apesar de termos demonstrado que o $(\text{PhSe})_2$, na forma selenol, pode reagir diretamente com ONOO^- , não observamos efeito protetor do composto quando co-incubado durante a OGD. Isto nos sugere que a reação direta entre ONOO^- e $(\text{PhSe})_2$ só seria favorecida utilizando altas concentrações intracelulares de $(\text{PhSe})_2$ como $100 \mu\text{M}$, concentração muito superior da utilizada em nosso protocolo experimental de OGD.

Vários estudos apontam a mitocôndria como sendo responsável pela maior parte da geração de espécies reativas após a reoxigenação e também pode ser alvo das ERO/ERN, o que comprometeria a sua função e consequentemente culminando com a morte celular (Brand e Nicholls, 2011). Em nosso protocolo experimental, verificamos que a OGD induziu dano mitocondrial verificado através da diminuição do $\Delta\Psi_m$ e que o $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de prevenir este evento. Resultados semelhantes foram observados em macrófagos e células endoteliais em que o $(\text{PhSe})_2$

preveniu a dissipação do $\Delta\Psi_m$ após exposição a LDLox ou ONOO⁻ (Hort et al., 2014, Fiuza et al., 2015). Este efeito protetor pode ser atribuído a capacidade do (PhSe)₂ em promover uma melhora do ambiente redox através da ativação de fatores de transcrição responsáveis pela síntese de importantes enzimas antioxidantes vinculadas a mitocôndria, como Prx-3, GPx1 e MnSOD.

Em adição, a disfunção mitocondrial pode aumentar a produção de ERO, através dos complexos da cadeia respiratória I e III, e comprometer a bioenergética celular (Balaban et al., 2005, Granger e Kvietys, 2015). Desta forma, investigamos o efeito da OGD sobre a respiração mitocondrial, usando respirometria de alta resolução. Podemos observar que o protocolo de OGD empregado neste estudo não alterou o RCR, que significa a eficiência respiratória mitocondrial, e nem o consumo de oxigênio relacionado à síntese de ATP, o ATP Linked. No entanto, as células endoteliais apresentaram uma capacidade de reserva mitocondrial significativamente menor comparada às células não expostas a OGD e isto significa uma menor eficiência respiratória em responder a situações de estresse celular, como a isquemia/reperusão e aterosclerose.

As células endoteliais vasculares são altamente glicolíticas, sendo essa via a principal responsável pela síntese de ATP, e por esse motivo essas células consomem relativamente baixa quantidade de O₂, quando comparadas a outros tipos celulares, como, por exemplo, os cardiomiócitos, em que a fosforilação oxidativa é a principal fonte geradora de ATP (Quintero et al., 2006). Adicionalmente, a hipóxia induz a ativação do fator induzível a hipóxia (HIF-1 α) o qual aumenta a expressão de diversos genes, incluindo os envolvidos no metabolismo glicolítico (Galkin et al., 2007). Desta forma, podemos sugerir que a preservação dos parâmetros de respiração mitocondrial analisados em nosso trabalho se deve ao fato que a fosforilação oxidativa não é a principal fonte geradora de energia em células endoteliais.

Constatamos que o pré-tratamento das células endoteliais com (PhSe)₂ preveniu a diminuição da capacidade de reserva mitocondrial induzida pela OGD. Recente estudo realizado pelo nosso grupo, mostrou que o (PhSe)₂ melhorou a capacidade respiratória mitocondrial e a respiração relacionada a síntese de ATP em células endoteliais expostas a LDLox, demonstrando uma maior capacidade de prevenir os efeitos da LDLox nestes parâmetros respiratórios. Além disso, o (PhSe)₂ *per se* aumenta a capacidade de reserva mitocondrial e consumo de oxigênio ligado a síntese de ATP em células endoteliais (Hort et al., 2014).

O aumento do metabolismo mitocondrial de células geralmente esta correlacionada com um aumento no número de mitocôndrias. O fator de transcrição Nrf2 está envolvido na expressão de muitos genes relacionados à mitocôndria e cadeia transportadora de elétrons (Scarpulla, 2011). Como vimos neste trabalho, e também demonstrado por de Bem e colaboradores (2013), o (PhSe)₂ promove a ativação e translocação nuclear de Nrf2 e provavelmente, poderia induzir a expressão de alguns componentes mitocondriais aumentando a biogênese mitocondrial. Adicionalmente, Glaser e colaboradores (2014) demonstraram que o (PhSe)₂ induziu um aumento no número de mitocôndrias no córtex de camundongos em modelo *in vivo*, porém *in vitro* não sabemos se este composto demonstra tal capacidade.

Em conjunto, os dados apresentados nesse trabalho contribuem para demonstrar os efeitos benéficos do (PhSe)₂ sobre o sistema antioxidante celular em dois tipos celulares intimamente ligados ao processo aterosclerótico (macrófagos e células endoteliais). Nossos resultados demonstram que a melhora no sistema antioxidante celular em macrófagos induzido pelo (PhSe)₂ está relacionado a indução de fatores de transcrição responsáveis pelo aumento de enzimas antioxidantes importantes para a defesa celular. Corroborando com esses resultados, o efeito citoprotetor conferido pelo (PhSe)₂ sobre as células endoteliais expostas ao protocolo de OGD está relacionado a prevenção da disfunção mitocondrial e endotelial, provavelmente pela melhora da capacidade redox celular. Sendo assim, nossos resultados sugerem que o (PhSe)₂ possa ser um futuro agente farmacológico na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, podemos concluir que:

- O pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ diminuiu a formação intracelular de ERO, o dano mitocondrial, a produção de MMP-9 e a ativação do fator de transcrição NF- κ B em macrófagos J774 expostos a LDLox.
- O $(\text{PhSe})_2$ em macrófagos induziu a translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2, aumentou os níveis de GSH e o conteúdo proteico de enzimas, como HO-1, Prx-1 e GPx2, as quais são relacionadas com a ativação de Nrf2.
- As vias de sinalização celular p38, JNK e PI3K modulam a capacidade que o $(\text{PhSe})_2$ apresenta na ativação e translocação nuclear de Nrf2 e consequentemente na atividade da enzima GGCS.
- O $(\text{PhSe})_2$ apresenta capacidade de induzir aumento no conteúdo proteico das enzimas MnSOD e GPx1, sugerindo estar ativando outro fator de transcrição, que não o Nrf2, como FoxO, o qual modula a expressão gênica destas enzimas.
- A constante de reação entre $(\text{PhSe})_2$, na forma reduzida selenol, com o ONOO^- aumenta a medida que o pH diminui.
- O pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ preveniu a diminuição da viabilidade celular e apoptose, geração de ONOO^- e disfunção mitocondrial induzidos pela OGD em células endoteliais.

8 REFERÊNCIAS

- Asmis R, Begley JG (2003) Oxidized LDL promotes peroxide-mediated mitochondrial dysfunction and cell death in human macrophages: a caspase-3-independent pathway. *Circ Res* 92:e20-29.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495.
- Bartolini D, Piroddi M, Tidei C, Giovagnoli S, Pietrella D, Manevich Y, Tew KD, Giustarini D, Rossi R, Townsend DM, Santi C, Galli F (2015) Reaction kinetics and targeting to cellular glutathione S-transferase of the glutathione peroxidase mimetic PhSeZnCl and its D,L-poly lactide microparticle formulation. *Free Radic Biol Med* 78:56-65.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner KJ (2003) Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 349:1605-1613.
- Bleys J, Miller ER, 3rd, Pastor-Barriuso R, Appel LJ, Guallar E (2006) Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 84:880-887; quiz 954-885.
- Brand MD, Nicholls DG (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *The Biochemical journal* 435:297-312.
- Brasil (2014) Ministério da Saúde. Saúde Brasil 2013 : uma análise da situação de saúde e das doenças transmissíveis relacionadas à pobreza /Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brigelius-Flohe R, Maiorino M (2013) Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1830:3289-3303.
- Brodsky SV, Gealekman O, Chen J, Zhang F, Togashi N, Crabtree M, Gross SS, Nasjletti A, Goligorsky MS (2004) Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen. *Circ Res* 94:377-384.
- Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844.
- Chepelev NL, Zhang H, Liu H, McBride S, Seal AJ, Morgan TE, Finch CE, Willmore WG, Davies KJ, Forman HJ (2013) Competition of nuclear factor-erythroid 2 factors related transcription factor

- isoforms, Nrf1 and Nrf2, in antioxidant enzyme induction. *Redox Biol* 1:183-189.
- Chiribau CB, Cheng L, Cucoranu IC, Yu YS, Clempus RE, Sorescu D (2008) FOXO3A regulates peroxiredoxin III expression in human cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 283:8211-8217.
- Chiu WC, Chen CJ, Lee TS, Chen ZJ, Ke PH, Chiang AN (2010) Oxidative stress enhances AP-1 and NF-kappaB-mediated regulation of beta(2)-glycoprotein I gene expression in hepatoma cells. *Journal of cellular biochemistry* 111:988-998.
- Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord EN, Smith AC, Eyassu F, Shirley R, Hu CH, Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa AS, Brookes PS, Davidson SM, Duchon MR, Saeb-Parsy K, Shattock MJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T, Murphy MP (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515:431-435.
- Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C (1993) A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochemical and biophysical research communications* 197:40-45.
- da Silva MH, da Rosa EJ, de Carvalho NR, Dobrachinski F, da Rocha JB, Mauriz JL, Gonzalez-Gallego J, Soares FA (2012) Acute brain damage induced by acetaminophen in mice: effect of diphenyl diselenide on oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Neurotox Res* 21:334-344.
- Dansen TB, Smits LM, van Triest MH, de Keizer PL, van Leenen D, Koerkamp MG, Szypowska A, Meppelink A, Brenkman AB, Yodoi J, Holstege FC, Burgering BM (2009) Redox-sensitive cysteines bridge p300/CBP-mediated acetylation and FoxO4 activity. *Nat Chem Biol* 5:664-672.
- de Bem AF, Farina M, Portella Rde L, Nogueira CW, Dinis TC, Laranjinha JA, Almeida LM, Rocha JB (2008) Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 201:92-100.
- de Bem AF, Fiuza B, Calcerrada P, Brito PM, Peluffo G, Dinis TC, Trujillo M, Rocha JB, Radi R, Almeida LM (2013) Protective effect of diphenyl diselenide against peroxynitrite-mediated

- endothelial cell death: a comparison with ebselen. *Nitric Oxide* 31:20-30.
- de Bem AF, Portella Rde L, Colpo E, Duarte MM, Frediane A, Taube PS, Nogueira CW, Farina M, da Silva EL, Teixeira Rocha JB (2009) Diphenyl diselenide decreases serum levels of total cholesterol and tissue oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 105:17-23.
- De Pascali F, Hemann C, Samons K, Chen CA, Zweier JL (2014) Hypoxia and reoxygenation induce endothelial nitric oxide synthase uncoupling in endothelial cells through tetrahydrobiopterin depletion and S-glutathionylation. *Biochemistry* 53:3679-3688.
- Deng T, Xu K, Zhang L, Zheng X (2008) Dynamic determination of Ox-LDL-induced oxidative/nitrosative stress in single macrophage by using fluorescent probes. *Cell Biol Int* 32:1425-1432.
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11908-11913.
- Dobrachinski F, da Silva MH, Tassi CL, de Carvalho NR, Dias GR, Golombieski RM, da Silva Loreto EL, da Rocha JB, Figuera MR, Soares FA (2014) Neuroprotective effect of diphenyl diselenide in a experimental stroke model: maintenance of redox system in mitochondria of brain regions. *Neurotox Res* 26:317-330.
- Dranka BP, Hill BG, Darley-Usmar VM (2010) Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 48:905-914.
- Eijkelenboom A, Burgering BM (2013) FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:83-97.
- Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, Schnabel R, Genth-Zotz S, Torzewski M, Lackner K, Munzel T, Blankenberg S (2007) Glutathione peroxidase-1 activity, atherosclerotic burden, and cardiovascular prognosis. *Am J Cardiol* 99:808-812.
- Ferrer-Sueta G, Radi R (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol* 4:161-177.
- Fiuza B, Subelzu N, Calcerrada P, Straliootto MR, Piacenza L, Cassina A, Rocha JB, Radi R, de Bem AF, Peluffo G (2015) Impact of SIN-1-derived peroxynitrite flux on endothelial cell redox

- homeostasis and bioenergetics: protective role of diphenyl diselenide via induction of peroxiredoxins. *Free Radic Res* 49:122-132.
- Forgione MA, Weiss N, Heydrick S, Cap A, Klings ES, Bierl C, Eberhardt RT, Farber HW, Loscalzo J (2002) Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 282:H1255-1261.
- Frederiksen H, Mortensen A, Schroder M, Frandsen H, Bysted A, Knuthsen P, Rasmussen SE (2007) Effects of red grape skin and seed extract supplementation on atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Mol Nutr Food Res* 51:564-571.
- Galis ZS, Khatri JJ (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90:251-262.
- Galkin A, Higgs A, Moncada S (2007) Nitric oxide and hypoxia. *Essays Biochem* 43:29-42.
- Ghisleni G, Porciuncula LO, Cimarosti H, Batista TRJ, Salbego CG, Souza DO (2003) Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain Res* 986:196-199.
- Giedt RJ, Yang C, Zweier JL, Matzavinos A, Alevriadou BR (2012) Mitochondrial fission in endothelial cells after simulated ischemia/reperfusion: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 52:348-356.
- Glaser V, Martins Rde P, Vieira AJ, Oliveira Ede M, Straliootto MR, Mukdsi JH, Torres AI, de Bem AF, Farina M, da Rocha JB, De Paul AL, Latini A (2014) Diphenyl diselenide administration enhances cortical mitochondrial number and activity by increasing hemeoxygenase type 1 content in a methylmercury-induced neurotoxicity mouse model. *Mol Cell Biochem* 390:1-8.
- Glass CK, Witztum JL (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104:503-516.
- Glavind J, Hartmann S, Clemmesen J, Jessen KE, Dam H (1952) Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. *Acta Pathol Microbiol Scand* 30:1-6.

- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, 3rd, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB (2014) Heart disease and stroke statistics 2014: a report from the American Heart Association. *Circulation* 129:e28-e292.
- Goven D, Boutten A, Lecon-Malas V, Marchal-Somme J, Amara N, Crestani B, Fournier M, Leseche G, Soler P, Boczkowski J, Bonay M (2008) Altered Nrf2/Keap1-Bach1 equilibrium in pulmonary emphysema. *Thorax* 63:916-924.
- Graham A, Hogg N, Kalyanaraman B, O'Leary V, Darley-Usmar V, Moncada S (1993) Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett* 330:181-185.
- Granger DN, Kvietys PR (2015) Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol* 6:524-551.
- Grassi D, Desideri G, Ferri C (2010) Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients* 2:889-902.
- Guo Z, Ran Q, Roberts LJ, 2nd, Zhou L, Richardson A, Sharan C, Wu D, Yang H (2008) Suppression of atherogenesis by overexpression of glutathione peroxidase-4 in apolipoprotein E-deficient mice. *Free Radic Biol Med* 44:343-352.
- Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ (2013) Mitochondria and FOXO3: breath or die. *Front Physiol* 4:147.
- Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:1685-1695.
- Hansson GK, Libby P (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 6:508-519.
- Hissin PJ, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74:214-226.
- Hort MA, Stralio MR, de Oliveira J, Amoedo ND, da Rocha JB, Galina A, Ribeiro-do-Valle RM, de Bem AF (2014) Diphenyl diselenide protects endothelial cells against oxidized low density lipoprotein-induced injury: Involvement of mitochondrial function. *Biochimie* 105:172-181.

- Hort MA, Stralioetto MR, Netto PM, da Rocha JB, de Bem AF, Ribei-rodo-Valle RM (2011) Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr $-/-$ mice by attenuation of oxidative stress and inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 58:91-101.
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB (2002) Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 277:42769-42774.
- Hutter E, Renner K, Pfister G, Stockl P, Jansen-Durr P, Gnaiger E (2004) Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *The Biochemical journal* 380:919-928.
- Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM (2011) Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med* 32:234-246.
- Itabe H (2003) Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull* 26:1-9.
- Itoh K, Tong KI, Yamamoto M (2004) Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36:1208-1213.
- Kadar A, Glasz T (2001) Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovasc Surg* 9:109-121.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ (2012) Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 298:229-317.
- Karin M, Takahashi T, Kapahi P, Delhase M, Chen Y, Makris C, Rothwarf D, Baud V, Natoli G, Guido F, Li N (2001) Oxidative stress and gene expression: the AP-1 and NF-kappaB connections. *Biofactors* 15:87-89.
- Kasprzak JD, Klosinska M, Drozd J (2006) Clinical aspects of assessment of endothelial function. *Pharmacol Rep* 58 Suppl:33-40.
- Kim DH, Hossain MA, Kang YJ, Jang JY, Lee YJ, Im E, Yoon JH, Kim HS, Chung HY, Kim ND (2013) Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis* Georgi, induces apoptosis in human colon cancer cells and prevents AOM/DSS-induced colon cancer in mice. *Int J Oncol* 43:1652-1658.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1994) Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 218:325-329.

- Klotz LO, Sanchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbanek P, Steinbrenner H, Monsalve M (2015) Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol* 6:51-72.
- Kluge MA, Fetterman JL, Vita JA (2013) Mitochondria and endothelial function. *Circ Res* 112:1171-1188.
- Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M (2006) Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 26:221-229.
- Koopman R, Schaart G, Hesselink MK (2001) Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol* 116:63-68.
- Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM (2002) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419:316-321.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16:3-11.
- Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Mezzetti A, Ucchino S, Calafiore AM, Napolitano AM, Di Ilio C, Cuccurullo F (1998) Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 97:1930-1934.
- Levitan I, Volkov S, Subbiah PV (2010) Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 13:39-75.
- Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-874.
- Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E (2010) Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 74:213-220.
- Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PR, Thompson MM (2000) Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 31:40-47.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241.
- Masumoto H, Kissner R, Koppenol WH, Sies H (1996) Kinetic study of the reaction of ebselen with peroxynitrite. *FEBS Lett* 398:179-182.
- Masumoto H, Sies H (1996) The reaction of ebselen with peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 9:262-267.
- Matsunaga T, Iguchi K, Nakajima T, Koyama I, Miyazaki T, Inoue I, Kawai S, Katayama S, Hirano K, Hokari S, Komoda T (2001) Glycated high-density lipoprotein induces apoptosis of endothelial cells via a mitochondrial dysfunction. *Biochemical and biophysical research communications* 287:714-720.
- Maziere C, Maziere JC (2009) Activation of transcription factors and gene expression by oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 46:127-137.
- McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312:159-163.
- Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-760.
- Mimura J, Itoh K (2015) Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 88:221-232.
- Moncada S, Higgs EA (2006) Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 213-254.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Napoli C (2003) Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1010:698-709.
- Nogueira CW, Rocha JB (2010) Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule. *J Braz Chem Soc*.
- Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104:6255-6285.
- Otero P, Herrera E, Bonet B (2002) Dual effect of glucose on LDL oxidation: dependence on vitamin E. *Free Radic Biol Med* 33:1133-1140.
- Ou HC, Chou FP, Sheu WH, Hsu SL, Lee WJ (2007) Protective effects of magnolol against oxidized LDL-induced apoptosis in endothelial cells. *Arch Toxicol* 81:421-432.

- Papanicolaou KN, Izumiya Y, Walsh K (2008) Forkhead transcription factors and cardiovascular biology. *Circ Res* 102:16-31.
- Park KH, Park WJ (2015) Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci* 30:1213-1225.
- Parnham M, Sies H (2000) Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. *Expert Opin Investig Drugs* 9:607-619.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 333:19-39.
- Patel RP, Levonen A, Crawford JH, Darley-Usmar VM (2000) Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 47:465-474.
- Paulmier C (1986) Selenium reagents and intermediates in organic synthesis. Pergamon Books.
- Peluffo G, Calcerrada P, Piacenza L, Pizzano N, Radi R (2009) Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 296:H1781-1792.
- Peluffo G, Radi R (2007) Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* 75:291-302.
- Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G (2005) Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol* 15:179-183.
- Persson K, Sauma L, Safholm A, Xu L, Li W, Yuan XM (2009) LDL and UV-oxidized LDL induce upregulation of iNOS and NO in unstimulated J774 macrophages and HUVEC. *APMIS* 117:1-9.
- Porciuncula LO, Rocha JB, Cimarosti H, Vinade L, Ghisleni G, Salbego CG, Souza DO (2003) Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immunocontent of inducible nitric oxide synthase. *Neurosci Lett* 346:101-104.
- Posser T, de Paula MT, Franco JL, Leal RB, da Rocha JB (2011) Diphenyl diselenide induces apoptotic cell death and modulates ERK1/2 phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Arch Toxicol* 85:645-651.
- Posser T, Moretto MB, Dafre AL, Farina M, da Rocha JB, Nogueira CW, Zeni G, Ferreira Jdos S, Leal RB, Franco JL (2006) Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human

- platelets and erythrocyte membranes: an in vitro evaluation. *Chem Biol Interact* 164:126-135.
- Quintero M, Colombo SL, Godfrey A, Moncada S (2006) Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5379-5384.
- Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 30:463-488.
- Reers M, Smith TW, Chen LB (1991) J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 30:4480-4486.
- Renaud S, de Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339:1523-1526.
- Rios FJ, Koga MM, Ferracini M, Jancar S (2012) Co-stimulation of PAFR and CD36 is required for oxLDL-induced human macrophages activation. *PloS one* 7:e36632.
- Rojo AI, Sagarra MR, Cuadrado A (2008) GSK-3beta down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem* 105:192-202.
- Rosenblat M, Aviram M (1998) Macrophage glutathione content and glutathione peroxidase activity are inversely related to cell-mediated oxidation of LDL: in vitro and in vivo studies. *Free Radic Biol Med* 24:305-317.
- Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126.
- Rupil LL, de Bem AF, Roth GA (2012) Diphenyl diselenide-modulation of macrophage activation: Down-regulation of classical and alternative activation markers. *Innate immunity*.
- Scarpulla RC (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta* 1813:1269-1278.
- Schewe T (1995) Molecular actions of ebselen--an antiinflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol* 26:1153-1169.
- Schulz K, Kerber S, Kelm M (1999) Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO₂- in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide* 3:225-234.
- Seelig GF, Meister A (1985) Glutathione biosynthesis; gamma-glutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Methods Enzymol* 113:379-390.

- Shay KP, Michels AJ, Li W, Kong AN, Hagen TM (2012) Cap-independent Nrf2 translation is part of a liponic acid-stimulated detoxification stress response. *Biochim Biophys Acta* 1823:1102-1109.
- Shin KM, Shen L, Park SJ, Jeong JH, Lee KT (2009) Bis-(3-hydroxyphenyl) diselenide inhibits LPS-stimulated iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophage cells through the NF-kappaB inactivation. *J Pharm Pharmacol* 61:479-486.
- Sies H (1993) Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med* 14:313-323.
- Sies H, Masumoto H (1997) Ebselen as a glutathione peroxidase mimic and as a scavenger of peroxynitrite. *Adv Pharmacol* 38:229-246.
- Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, Lottenberg AM, Chacra AP, Faludi AA, Loures-Vale AA, Carvalho AC, Duncan B, Gelonese B, Polanczyk C, Rodrigues Sobrinho CR, Scherr C, Karla C, Armaganijan D, Moriguchi E, Saraiva F, Pichetti G, Xavier HT, Chaves H, Borges JL, Diamant J, Guimaraes JI, Nicolau JC, dos Santos JE, de Lima JJ, Vieira JL, Novazzi JP, Faria Neto JR, Torres KP, Pinto Lde A, Bricarello L, Bodanese LC, Introcaso L, Malachias MV, Izar MC, Magalhaes ME, Schmidt MI, Scartezini M, Nobre M, Foppa M, Forti NA, Berwanger O, Gebara OC, Coelho OR, Maranhao RC, dos Santos RD, Costa RP, Barreto S, Kaiser S, Ihara S, Carvalho T, Martinez TL, Relvas WG, Salgado W (2007) [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. *Arq Bras Cardiol* 88 Suppl 1:2-19.
- Stary HC (1990) The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J* 11 Suppl E:3-19.
- Steinberg D, Carew TE, Fielding C, Fogelman AM, Mahley RW, Sniderman AD, Zilversmit DB (1989) Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation* 80:719-723.
- Steinbrecher UP (1987) Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J Biol Chem* 262:3603-3608.
- Straliotto MR, Hort MA, Fiuza B, Rocha JB, Farina M, Chiabrando G, de Bem AF (2013) Diphenyl diselenide modulates oxLDL-

- induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling. *Biochimie* 95:1544-1551.
- Surh YJ (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3:768-780.
- Swirski FK, Nahrendorf M (2013) Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* 339:161-166.
- Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* 6:662-680.
- Tamasi V, Jeffries JM, Arteel GE, Falkner KC (2004) Ebselen augments its peroxidase activity by inducing nrf-2-dependent transcription. *Arch Biochem Biophys* 431:161-168.
- Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D (1998) The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 141:1423-1432.
- Therade-Matharan S, Laemmel E, Carpentier S, Obata Y, Levade T, Duranteau J, Vicaut E (2005) Reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to reoxygenation after hypoxia and glucose depletion is mediated by ceramide. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 289:R1756-1762.
- Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK (2011) Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Mosc)* 76:407-422.
- Tousoulis D, Simopoulou C, Papageorgiou N, Oikonomou E, Hatzis G, Siasos G, Tsiamis E, Stefanadis C (2014) Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacol Ther* 144:253-267.
- Turpaev KT (2013) Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biochemistry (Mosc)* 78:111-126.
- Vrba J, Gazak R, Kuzma M, Papouskova B, Vacek J, Weiszenstein M, Kren V, Ulrichova J (2013) A novel semisynthetic flavonoid 7-O-galloyltaxifolin upregulates heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells via MAPK/Nrf2 pathway. *J Med Chem* 56:856-866.
- Wang K, Zhang T, Dong Q, Nice EC, Huang C, Wei Y (2013) Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Death Dis* 4:e537.

- Webb AE, Brunet A (2014) FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci* 39:159-169.
- Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-333.
- WHO (2004) Cardiovascular diseases. . World Health Organization.
- Widlansky ME, Gutterman DD (2011) Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* 15:1517-1530.
- Xu XP, Meisel SR, Ong JM, Kaul S, Cercek B, Rajavashisth TB, Sharifi B, Shah PK (1999) Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 99:993-998.
- Yamaguchi Y, Kunitomo M, Haginaka J (2002) Assay methods of modified lipoproteins in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 781:313-330.
- Yokoyama M (2004) Oxidant stress and atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 4:110-115.
- Zenkov NK, Menshchikova EB, Tkachev VO (2013) Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target. *Biochemistry (Mosc)* 78:19-36.
- Zipper LM, Mulcahy RT (2000) Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochemical and biophysical research communications* 278:484-492.
- Zonov EV, Voronina EI, Zenkova MA, Ageeva TA, Ryabchikova EI (2013) Influence of polychemotherapy on the morphology of metastases and kidney of resistant RLS-bearing mice. *Exp Oncol* 35:30-36.

ANEXO I

Artigo publicado

Biochimie 95 (2013) 1544–1551



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi



Research paper

Diphenyl diselenide modulates oxLDL-induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling



Marcos Raniel Stralio^a, Mariana Appel Hort^a, Bianca Fiuza^a,
João Batista Teixeira Rocha^b, Marcelo Farina^a, Gustavo Chiabrando^c,
Andreza Fabro de Bem^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^c Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CBICI-CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2012

Accepted 9 April 2013

Available online 23 April 2013

Keywords:

Diphenyl diselenide

Selenium

Atherosclerosis

Macrophage

Glutathione peroxidase

LDL oxidation

Inflammation

Oxidative stress

ABSTRACT

It has been reported that oxidized LDLs (oxLDL) are involved in the pathogenesis of atherosclerosis, and that macrophages as well as other cells of the arterial wall can oxidize LDL *in vitro*, depending on the balance between intracellular prooxidant generation and antioxidant defense efficiency. Because of their potential beneficial role in preventing atherosclerosis and other oxidative stress-related diseases, organoselenium compounds such as diphenyl diselenide (PhSe)₂, are receiving increased attention. In the present work, we investigated the mechanisms underlying the protective effect exerted by (PhSe)₂ on oxLDL-mediated effects in murine J774 macrophage-like cells. (PhSe)₂ pretreatment reduced atherogenic signaling triggered by oxLDL in macrophages *in vitro*, namely: ROS generation, disturbance of NO homeostasis, activation of matrix metalloproteinase, foam cell formation, and mitochondrial dysfunction. Moreover, the redox signaling effects of (PhSe)₂ presented herein were accompanied by a down-regulation of NF-κB-binding activity. The relatively strong performance of (PhSe)₂ makes it an ideal candidate for further, expanded trials as a new generation of antioxidants for preventing atherosclerotic lesion.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Accumulation of modified low-density lipoprotein (LDL), such as oxidized LDL (oxLDL), in the arterial wall, and the recruitment of monocytes to the subendothelial space are known to be the main early events in the development of atherosclerosis [1].

Blood-circulating monocytes adhere to the endothelium, migrate to the intima, and differentiate to macrophages. Macrophages express receptors (CD36 and SR-A) that bind and internalize oxidized forms of LDL, and these processes give rise to the arterial foam cell, a hallmark of arterial lesion [2–6]. Macrophage activation and foam cell formation are involved in both the initiation and the progression and ultimate instability of advanced lesions. Macrophages taking up oxLDL could modify the production of inflammatory mediators, such as cytokines, proteases, reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS), metalloproteinases (MMPs)

[7–9] and other factors through oxidative sensitive signaling pathways [10].

In oxLDL-stimulated macrophages, the intracellular ROS/RNS are generated by several pathways, including the NADPH oxidase (NOX) system, the lipoxygenase/cyclooxygenase system, inducible NO synthase (iNOS), and mitochondrial respiratory chain [11]. Moreover, intracellular ROS generated by oxLDL stimulation can activate a wide variety of proinflammatory and proapoptotic pathways that are regulated by transcription factors, such as nuclear factor-κB (NF-κB) [12,13]. These events will culminate in the death of macrophages by activation of apoptosis.

Recent clinical studies have suggested an important anti-atherogenic role for the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) [14], which uses glutathione to reduce hydrogen peroxide to water and lipid peroxides to their respective alcohols [15], and it also acts as a peroxynitrite reductase [16]. Therefore, the investigation of antiatherogenic properties of synthetic organoselenium compounds with GPx-mimetic activity has attracted considerable attention. In this scenario, we have been studying the pharmacological properties of diphenyl diselenide (PhSe)₂, a

* Corresponding author. Tel.: +55 48 37215565; fax: +55 48 37219672.
E-mail address: andrezaдебem@ccb.ufsc.br (A.F. de Bem).

simple diaryl diselenide with high GPx-mimetic activity [17]. In addition to its GPx-like activity, we recently demonstrated that (PhSe)₂ is able to promote the nuclear translocation of the Nuclear (erythroid-derived 2)-related factor (Nrf2) increasing the expression of enzymes related to antioxidant defenses, as gamma-glutamylcysteine synthetase (GGCS) and GPx [18].

This compound was very efficient in reducing the human LDL oxidation and Cu²⁺-induced lipid peroxidation in rat aortic slices [19] and it decreased hypercholesterolemia and oxidative stress in cholesterol-fed rabbits [20]. Furthermore, the treatment with (PhSe)₂ reduced the atherosclerotic lesion in hypercholesterolemic LDLr^{-/-} mice by modulating pathways related to antioxidant and anti-inflammatory responses [21]. In the present study, we therefore aimed at determining whether pretreatment with (PhSe)₂ attenuates oxLDL-induced effects in murine J774A.1 macrophage cells and, if so, whether the mechanisms underlying the process involve the redox signaling pathway.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Diphenyl diselenide (PhSe)₂ was synthesized according to published methods [22]. Analysis of the ¹H NMR and ¹³C NMR spectra showed that the compound obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of (PhSe)₂ (99.9%) was determined by GC/HPLC. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.2. LDL isolation and oxidation

This study was approved by our Ethic Committee at Federal University of Santa Catarina (n° 943/11). LDL was isolated from fresh human plasma by discontinuous density-gradient ultracentrifugation as previously described [19] and the protein concentration in LDL solution was determined by Lowry [23]. LDL isolated samples (1 mg of protein/mL) were oxidized at 37 °C in the presence of 10 μM CuSO₄ for 16 h to produce oxLDL. Then EDTA 1.5 mM was added and the samples were dialyzed against 148 mM phosphate buffer for 24 h at 4 °C. LDL oxidation was monitored by following the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) production.

2.3. Cell culture

Murine J774A.1 macrophage cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). These cells were maintained with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine, 10 mM HEPES, 100 units/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37 °C. The exposition of cells with (PhSe)₂ and/or oxLDL was carried out in DMEM without FBS.

2.4. Measurement of reactive oxygen species (ROS) production

Intracellular ROS production was detected using the non-fluorescent cell permeating compound, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). In order to evaluate the protective effect of (PhSe)₂ on ROS production induced by oxLDL, macrophage (2.0 × 10⁵ cells/well) seeded in 24 well plates were firstly stimulated to an increasing concentration curve of oxLDL (25, 50, 100 and 200 μg/mL) for 1 h. After that, cells were incubated with DCFH-DA (10 μM) for 30 min at 37 °C, washed twice with PBS,

harvested and collected for immediate determination of ROS generation by flow cytometry (FACS Canto II, BD Bioscience, United States). The protective effect of (PhSe)₂ was also evaluated by flow cytometry by pretreating cells for 24 h with (PhSe)₂ (1 μM) or vehicle before oxLDL (100 μg/mL) stimulation for 1 h. The results were expressed as percentage of control (non-stimulated cells; 100%).

2.5. Measurement of mitochondrial membrane potential (ΔΨ_m)

The mitochondrial membrane potential (ΔΨ_m) was assessed using the lipophilic cationic probe fluorochrome JC-1 [24]. In presence of physiological mitochondrial membrane potentials, JC-1 forms aggregates that fluoresce with an emission peak at 588 nm. Loss of membrane potential favors the monomeric form of JC-1, which has an emission peak at 530 nm. To examine the effect of (PhSe)₂ on modifications in ΔΨ_m induced by oxLDL, macrophages were plated into 24 well plates (2.0 × 10⁵ cells/well) and pretreated with (PhSe)₂ (1 μM) or vehicle for 24 h, followed by stimulation with oxLDL (100 μg/mL) or FCCP 1 μM (a positive control) for additional 3 h. After, macrophages were incubated with JC-1 (5 μM) for 20 min at 37 °C and JC-1 fluorescence intensity was measured using a fluorometric microplate reader (Tecan, Grödig/Salzburg, Austria) with excitation at 488 nm and an emission at 525 nm and 590 nm. Mitochondrial membrane potential was inferred from the ratio of fluorescence intensity red/green. The images were acquired from three randomly chosen fields using an inverted epifluorescence microscope (Olympus IX70).

2.6. Cell viability assay

The cell viability in the presence or absence of (PhSe)₂ was measured by MTT assay as described by Siqueira and cols [25]. Macrophage (1 × 10⁵ cells/well) seeded in 96 well plates were pretreated with (PhSe)₂ (1 μM) or vehicle for 24 h, followed by stimulation with oxLDL (100 or 200 μg/mL) for additional 24 h. After this, 200 μL of MTT solution (0.5 mg/mL) was added and incubated for 2 h. Then, the MTT was removed and 200 μL of DMSO/well was added to dissolve the intracellular crystalline formazan product. The absorbance at 550 nm was read spectrophotometrically using a microplate reader. The results were expressed as a percentage of the absorbance of non-treated cells.

2.7. Foam cell formation assay

Foam cell formation assay was performed with the Oil Red O staining method [26]. Macrophages (2.5 × 10⁵ cells/well) plated in coverslip in 12 wells plate were pretreated with (PhSe)₂ (1 μM) or vehicle for 24 h, and then stimulated with oxLDL (100 μg/mL) for additional 3 h. Following oxLDL incubation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained by 0.3% Oil Red O for 10 min. Hematoxylin was used as counterstaining. Images of cells were acquired using confocal microscopy (Leica DM16000 B Microscope) using a 546 nm filter set. Ten images were captured from each group and the total pixels intensity was determined using NIH Image J 1.36b imaging software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), and lipid content was expressed as optical density (OD).

2.8. MMP activity measurement

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-dependent endopeptidases, capable of degrading all the molecular components of extracellular matrix. To evaluate the activity of MMP-9, we used two different techniques, gelatin zymography and

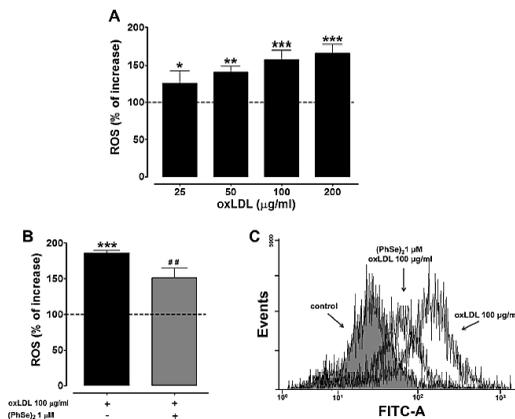


Fig. 1. (PhSe)₂ decreases the oxLDL-induced ROS production in macrophages. (A) Macrophages were exposed to different concentrations of oxLDL (25–200 µg/mL) for 1 h. (B) The macrophages were pretreated with (PhSe)₂ or vehicle for 24 h and exposure to oxLDL (100 µg/mL) for additional 1 h. DCFH-DA (10 µM) was added to the medium for 30 min and the amount of ROS was determined by flow cytometry. The ROS amount was expressed as percentage of increase of control. (C) Representative flow cytometer histogram. Each bar represents the mean ± SEM of at least three independent experiments. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 indicates the difference when compared with control; ##*P* < 0.01 indicates the difference when compared with oxLDL exposure cells (one-way ANOVA, Duncan's test).

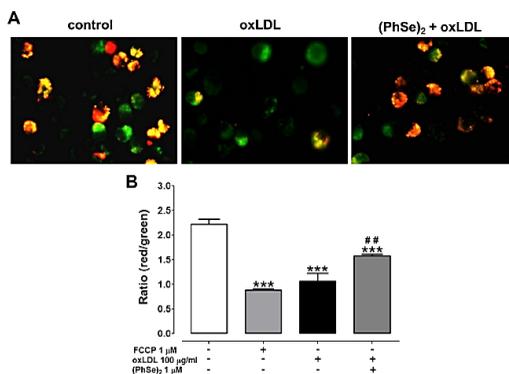


Fig. 2. (PhSe)₂ prevents oxLDL-mediated mitochondrial dysfunction. Macrophages were pretreated 24 h with (PhSe)₂ (1 µM) or vehicle and then exposed to oxLDL (100 µg/mL) for additional 3 h. FCCP (1 µM) was utilized as a positive control. (A) The change in mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) was assessed based on the signal intensity from JC-1 monomeric and aggregate fluorescence (Magnification 400×). (B) JC-1 fluorescence was quantified fluorometrically. Each bar represents the mean ± SEM of the ratio (red/green fluorescence) of at least three independent experiments. ****P* < 0.001 indicates the difference when compared with control; ##*P* < 0.01 indicates the difference when compared with oxLDL exposure cells (one-way ANOVA, Duncan's test).

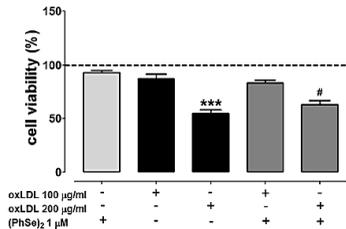


Fig. 3. OxLDL-induced cytotoxicity was prevented by (PhSe)₂. Macrophages were treated 24 h with (PhSe)₂ 1 µM or vehicle and then exposed to oxLDL (100 µg/ml or 200 µg/ml) for additional 24 h. The cell viability was determined by MTT assay and expressed as percentage of control. Each bar represents the mean ± SEM of at least three independent experiments. ****P* < 0.001 indicates the difference when compared with control; #*P* < 0.05 indicates the difference when compared with oxLDL exposure cells (one-way ANOVA, Duncan's test).

the activity of collagenase IV. For these assays, cells (2.5×10^5 cells/well) were seeded in 12 wells plate and then preincubated with (PhSe)₂ (1 µM) or vehicle for 24 h, followed by stimulation with oxLDL (100 µg/ml) for additional 24 h.

2.8.1. Gelatin zymography

Supernatants (50 µg/ml of total protein) were subjected to SDS-PAGE in 7.5% (w/v) polyacrylamide gels copolymerized with 1.5% gelatin as a substrate as previously described [27]. After electrophoresis, the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue. Proteolytic activity in a particular gel location yielded a clear band against the blue background of the stained gelatin. The MMP-9 were identified by molecular size using high-molecular mass (92 kDa) standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Gels were scanned and the intensity of the bands was quantified using Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The results were expressed as intensity of MMP-9 relative to control.

2.8.2. EnzChek Gelatinase/Collagenase assay kit

The activity of gelatinase or collagenase IV in conditioned supernatants was determined using an Enzymatic Gelatinase/Collagenase fluorometric assay kit (Molecular Probes, USA). Briefly, conditioned supernatants (50 µg/ml of protein) were incubated with MMP specific peptide substrate, based on the instructions included with the kit. The cleavage of substrates by MMP (gelatinases or collagenase IV) result in increased fluorescence signal measured using a fluorescence microplate reader (Tecan, Grödig/Salzburg, Austria) with excitation at 495 nm and emission at 515 nm. Data were reported as the collagenase IV activity relative to the control.

2.9. iNOS expression

The expression of iNOS was evaluated by western blot analysis. Macrophages (5.0×10^5 cells/well) were seeded in 6 wells plate and then preincubated with (PhSe)₂ (1 µM) or vehicle for 24 h, followed by stimulation with oxLDL (100 µg/ml or 200 µg/ml) for additional 24 h. Proteins were subjected to 7.5% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blocked with 5% low fat milk in 50 mM PBS for 1 h. Membranes were then probed at room temperature, for 1 h with rabbit polyclonal anti-iNOS antibody (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, USA). For the detection, immunocomplexed membranes were washed in PBS containing 0.6% Tween 20,

and probed with goat anti-rabbit antibody at room temperature for 1 h (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, USA). After extensive washing, blots were visualized using the Perkin Elmer ECL system. Equal loading of gel lanes was verified by probing the blots for β-actin content. The intensity of the bands was quantified using Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.10. Nitrite assay

Nitrite production, an indicator of NO production, was measured in the conditioned culture medium by the Griess reaction [28]. Macrophages (2.0×10^5 cells/well) were cultured in 24 well plates and preincubated with (PhSe)₂ (1 µM) or vehicle for 24 h and then stimulated with oxLDL (100 or 200 µg/ml) for additional 24 h. The supernatants were collected to quantification of nitrite. Briefly, 100 µL of supernatants were mixed with 100 µL of Griess reagent (equal volumes of 1% (w/v) sulphanih acid in 30% (v/v) acetic acid and 0.1% (w/v) N-(1-naphthyl) ethylenediamine in 60% (v/v) acetic acid), incubated at room temperature for 30 min in the dark, and the absorbance at 540 nm was measured in a microplate reader (Tecan, Grödig/Salzburg, Austria). The amount of nitrite was calculated from a standard curve using freshly prepared sodium nitrite in culture medium and the results were expressed as percentage of control (non-treated cells).

2.11. Immunofluorescence (immunohistochemistry)

The effect of (PhSe)₂ on oxLDL-induced NF-κB nuclear translocation was evaluated by immunofluorescence. Macrophages (2.5×10^5 cells/well) seeded in coverslips in 12 wells plate were preincubated with (PhSe)₂ (1 µM) or vehicle for 24 h, followed by stimulation with oxLDL (100 µg/ml) or vehicle for additional 1 h. After which cells were fixed with 4% paraformaldehyde and blocked with 4% of albumin in 0.05% (v/v) Tween 20-PBS (T20) for 15 min. The nuclear translocation of NF-κB was evaluated by immunofluorescence using an anti-NF-κB rabbit monoclonal p-65 antibody (1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA) in PBS-T20 for 24 h at 4 °C, followed by FITC conjugated donkey anti-rabbit IgG secondary antibody (1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA) for 1 h. Cell nuclei were stained with Hoechst 33258. The images were acquired from eight to ten randomly chosen fields using a fluorescent microscope (Olympus BX41).

2.12. Statistical analysis

All data are expressed as mean ± SEM from at least three independent experiments. Differences between mean values of multiple groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the *post-hoc* Duncan multiple range test when *P* was significant. Statistical significance was considered at *P* < 0.05.

3. Results

3.1. (PhSe)₂ prevents the oxLDL-induced ROS production, mitochondrial dysfunction and cell death

As expected, the exposition of J774A.1 macrophage cells for 1 h to oxLDL (25–200 µg/ml) caused a concentration-dependent ($\beta = 0.861$, *P* < 0.001) increase on intracellular ROS production (Fig. 1A). The pretreatment of macrophages with (PhSe)₂ significantly attenuated the oxLDL-induced ROS production (Fig. 1B and C).

Mitochondrial dysfunction and the ensuing bioenergetic impairment are likely to promote ion pump failure and loss of mitochondrial membrane integrity. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was analyzed by JC-1 fluorescence. OxLDL (100 µg/ml) significantly induced a decrease in $\Delta\Psi_m$ by reducing the

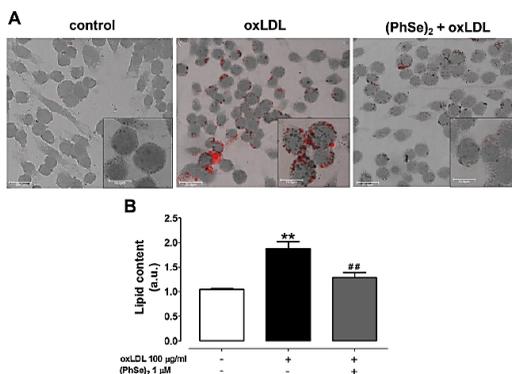


Fig. 4. (PhSe)₂ inhibits the oxLDL-mediated foam cell formation. Macrophages were treated 24 h with (PhSe)₂ 1 µM or vehicle and then exposed to oxLDL (100 µg/ml) for additional 3 h followed by stained with Oil Red O. (A) Representative confocal micrographs of Oil Red O-derived fluorescence in macrophage (Magnification 63×). (B) Quantification of foam cells lipid content (arbitrary units, a.u.). Each bar represents the mean ± SEM of at least three independent experiments. ***P* < 0.01 indicates the difference when compared with control and ##*P* < 0.01 indicates the difference when compared with oxLDL exposure cells (one-way ANOVA, Duncan's test).

red/green [C-1 fluorescence ratio, after 3 h of macrophage exposition. The pretreatment of macrophages with (PhSe)₂ prevents oxLDL-mediated mitochondrial dysfunction (Fig. 2A and B). FCCP (1 µM), a known depolarizing agent, was used as a positive control.

To investigate the potential beneficial effects of (PhSe)₂ on oxLDL-mediated toxicity in macrophage, the cell viability was evaluated by the MTT assay. As shown in Fig. 3, the exposure of macrophage to oxLDL (200 µg/ml) for 24 h significantly decreased (≈ 46%) the cell viability and (PhSe)₂ pretreatment prevented this cytotoxic effect. The exposure of macrophage to oxLDL 100 µg/ml did not decrease the cell viability.

3.2. (PhSe)₂ modulates oxLDL-induced foam cells formation and MMP-9 activation

The Oil Red O staining is ample used to detect the lipid droplets accumulation in cells. As expected, the 3 h oxLDL (100 µg/ml) exposure induced its uptake by macrophages and the consequent foam cell formation. The pretreatment with (PhSe)₂ significantly reduced the uptake of oxLDL by macrophages (Fig. 4).

Since it has been reported that oxLDL triggered the metalloproteinase activation we focus on the effect of (PhSe)₂ in this enzymatic system. First, we verified that the pretreatment with (PhSe)₂ significantly reduced the increment of the collagenase IV activity, that included the MMP-2 and MMP-9 activities, in the conditioned medium after 24 h of oxLDL (100 µg/ml) exposition (Fig. 5A). In the same way, Fig. 5B shows a representative zymography analysis, where it can be observed that oxLDL produced a significant increase in MMP-9 activity that were markedly attenuated by (PhSe)₂ pretreatment.

3.3. (PhSe)₂ modulates oxLDL-induced iNOS expression, NO production and NF-κB nuclear translocation

It is known that iNOS mediated the excessive nitric oxide synthesis in inflammatory conditions. In this way, oxLDL (200 µg/ml)

induced an increase in iNOS expression with consequent NO increased levels in macrophages. Both process were attenuated by the (PhSe)₂ pretreatment (Fig. 6A and B, respectively).

As preview reported, here we demonstrated that the exposure of oxLDL (100 µg/ml) for 1 h induced the NF-κB activation in macrophages. The pretreatment with (PhSe)₂ blocked the NF-κB nuclear translocation retaining this factor in the cytoplasm (Fig. 7).

4. Discussion

In this study, we demonstrated that (PhSe)₂ is capable of preventing several events related to toxicity following oxLDL-stimulation of macrophages.

To determine the effect of oxLDL in oxidative stress, ROS production was evaluated (Fig. 1). In agreement with the results already reported, acute oxLDL exposure increases the production of intracellular ROS/RNS in macrophages [11,29].

Taking into account the exacerbated production of ROS in atherosclerosis, the investigation of organoselenium compounds with GPx-like activity is relevant. When macrophages were pretreated with (PhSe)₂, ROS generation induced by oxLDL significantly decreased (Fig. 1B and C), indicating that this compound has antioxidant properties, as previously described [17]. Accordingly, Rosenblat and Aviram [30] have demonstrated that chemical inhibition of GPx-1 activity in macrophages results in increased cellular peroxide and superoxide production.

ROS and RNS can easily affect the mitochondria, whereas these organelles also generate species by themselves [31]. Earlier studies demonstrated that oxLDL decreases mitochondrial respiratory chain activities and induces ROS overproduction in endothelial cells [32]. In the present study, we found that oxLDL induced damage to mitochondrial function by decreasing Δ*W*_m in macrophages cells. Corroborating our results, Asmis and Begley [33] showed that the exposure to oxLDL impairs mitochondrial function and induces apoptosis and cell lysis in human macrophages. Here, the pretreatment with (PhSe)₂ prevented mitochondrial damage,

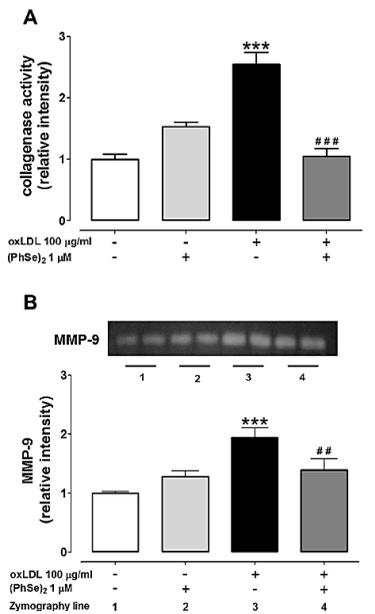


Fig. 5. (PhSe)₂ modulates oxLDL triggered MMP-9 activity. Macrophages were treated 24 h with (PhSe)₂ 1 µM or vehicle and then exposed to oxLDL (100 µg/mL) for additional 24 h. (A) The collagenase IV activity in the supernatant was measured using an EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay kit. (B) Zymography analysis of MMP-9 activity in cell supernatant. Upper panel: representative zymography assays of MMP-9 gelatinolytic activity. Lower panel: densitometry analysis from zymography assays. Results were expressed as relative intensity to control. Each bar represents mean ± SEM of at least three independent experiments. ****P* < 0.001 compared with control and ##*P* < 0.01; ###*P* < 0.001 indicates the difference when compared with oxLDL exposure cells (one-way ANOVA, Duncan's test).

recovering the $\Delta\Psi_m$ (Fig. 2) and this effect could be in part attributed to its antioxidant properties. In agreement with this, recent studies have demonstrated that (PhSe)₂ restores the mitochondrial dysfunction caused by acetaminophen [34] and by methylmercury [35] in mouse brain. This ROS overproduction can be responsible for triggering different pathways related to cell death [36], which can occur either by mitochondrial dysfunction or by downregulation of anti-apoptotic proteins [37]. In accordance with this, here the ROS production and mitochondrial dysfunction promoted by oxLDL were associated with a decrease in macrophage viability, which was prevented by (PhSe)₂ treatment (Fig. 3). These evidences support the hypothesis that (PhSe)₂ could prevent the cytotoxic effects mediated by oxLDL in macrophage by inhibit ROS generation.

NF- κ B and Activator protein-1 (AP-1) are two redox-sensitive transcription factors that can be activated during various

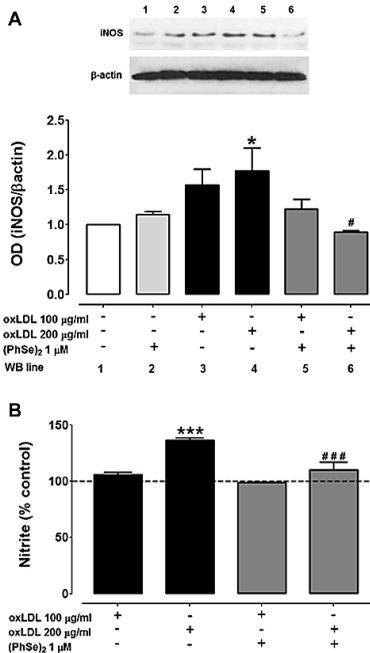


Fig. 6. Effect of (PhSe)₂ on oxLDL-induced INOS expression and NO production. Macrophages were treated 24 h with (PhSe)₂ 1 µM or vehicle and then exposed to oxLDL (100 µg/mL or 200 µg/mL) for additional 24 h. (A) Representative western blot analysis of INOS; β -actin was used as a load control. (B) Nitrite levels in the conditioned culture medium and expressed as percentage of control. Each bar represents the mean ± SEM of at least three independent experiments. **P* < 0.05; ****P* < 0.001 compared with control and #*P* < 0.05; ###*P* < 0.001 indicates the difference when compared with oxLDL (200 µg/mL) exposure cells (one-way ANOVA, Duncan's test).

inflammatory disease processes [38]. The activation of these transcription factors can up regulate several major proinflammatory mediators such as iNOS, MMPs, CD36 receptor and others [36,39–41]. The NF- κ B pathway is an attractive candidate to mediate the effects of ROS because the interaction between the inhibitory protein I κ B and NF- κ B is regulated by protein kinases that contain several redox-sensitive cysteine residues in critical kinase domains [42]. In addition, H₂O₂ stimulation enhanced the nuclear translocation of AP-1 and NF- κ B subunits [43]. Wiesner et al. [44] demonstrated, by exposure of macrophages to the minimally oxidized LDL (mmLDL) and lipopolysaccharide (LPS), that the cooperative engagement of NF- κ B and AP-1 results in additive/synergistic increased transcription of inflammatory cytokines within atherosclerotic lesions. Here, we showed that the exposure of macrophages to oxLDL can rapidly (1 h) lead to the activation of

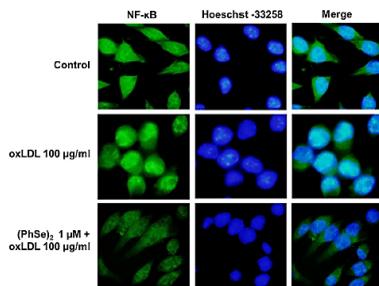


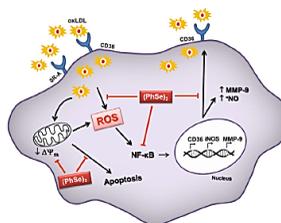
Fig. 7. (PhSe)₂ modulates oxLDL-induced NF-κB nuclear translocation. Macrophages were treated 24 h with (PhSe)₂ 1 µM or vehicle and then exposed to oxLDL (100 µg/ml) for additional 1 h. Nuclear translocation of NF-κB was evaluated by immunofluorescence (green). Nuclear counterstaining was made with Hoeschst 33258 (blue). A representative merge of the two fluorescence images (green and blue) is shown (Magnification 1000×). The representative images were from three independent experiments.

NF-κB, promoting its translocation to the nucleus (Fig. 7) whereas the (PhSe)₂ treatment led to a downregulation of NF-κB-binding activity. Consistent with this, we recently demonstrated that the oxLDL-mediated increase in TNF-α and MCP-1, inflammatory mediators triggered by the NF-κB activation, was prevented by (PhSe)₂ in macrophage [21].

It has been documented that macrophages express high levels of MMPs, mainly the MMP-2 and MMP-9, in response to oxidative and inflammatory stimulus. These MMPs are highly expressed in vulnerable regions of atherosclerotic plaques and are involved in the remodeling processes associated with atherogenesis and plaque rupture [45,46]. Herein, we showed by two different methodological approaches that oxLDL induced a markedly increase in specific MMP-9 and collagenase IV activities, which was attenuated by the pretreatment with (PhSe)₂ (Fig. 5). We elected to evaluate only the specific activity of MMP-9 because its increase is more evident than the others MMPs isoforms [47]. Then, based on our results we can't discard that the increase in collagenase IV activity could be a reflex of the sum of the MMP-2 and MMP-9 activities and that pretreatment with (PhSe)₂ was able of attenuating both MMPs.

Nitric oxide (NO) is known to counteract the atherogenic process by mediating vasorelaxation, reducing vascular smooth muscle cell proliferation, and decreasing platelet aggregation [48]. A recent study shows that oxLDL enhances the expression of iNOS and NO production in macrophages [49]. In our experimental condition, exposure of macrophages to oxLDL caused a significant increase in both iNOS protein expression and NO levels, while pretreatment with (PhSe)₂ prevented it (Fig. 6A and B). Consistent with these observations, Shin et al. [50] reported that another diselenide, bis-(3-hydroxyphenyl) diselenide (DSE-B), potently inhibits NO production and decreases iNOS protein levels in macrophages stimulated with LPS. Recently, Rupit et al. [51] showed that (PhSe)₂ inhibits the NO production in a dose-dependent mode in peritoneal macrophages activated by LPS and this effect was correlated with a decrease in iNOS expression.

The internalization of oxLDL in macrophages occurs through mechanisms involving different cell surface receptors; in this context, the CD36 has an important role [52]. In this study, we demonstrated that (PhSe)₂ efficiently decreased oxLDL uptake and



Scheme 1. Effects of (PhSe)₂ on macrophage oxLDL-induced toxicity. Based on the results appointed in this study, we conclude that the (PhSe)₂ decreased the ROS generation and LDL uptake in macrophages. Moreover, the pretreatment with the organoselenium compound prevented the decrease in $\Delta\Psi_m$ and the consequently cell death induced by oxLDL. In addition, the NF-κB translocation to the nucleus was blocked by (PhSe)₂, diminishing the transcription of genes such as CD36 receptor, iNOS and MMP-9, resulting in a decreasing expression of these proteins and NO production.

consequent foam cell formation (Fig. 4). This effect can be explained by the inhibition of the activation of NF-κB by the organoselenium compound with consequent decrease in the expression of CD36, resulting in less uptake of oxLDL.

Taken together, the effects of (PhSe)₂ here presented, are possibly related to its antioxidant property. We believe that, the downregulation in oxLDL-mediated free radical generation could provide a favorable cellular environment that avoid NF-κB activation and the consequent cell death. This potent antioxidant effect of (PhSe)₂ may be explained in part to its ability in decomposing organic hydroperoxides of oxLDL via GPX-mimetic activity. By the other hand, this organoselenium compound could be acting via Nr1z, which increases the expression of phase II antioxidant genes leading to an improvement in cellular redox environment [53]. This hypothesis is supported by our recent study that reported an improvement in glutathione antioxidant system mediated by (PhSe)₂ via Nr1z activation [18].

5. Conclusion

In this study, we provide evidence that (PhSe)₂ protects macrophages against atherogenic signaling triggered by oxLDL by inhibiting ROS generation and ROS-induced inflammatory pathways modulated by NF-κB (Scheme 1). Our findings suggest that (PhSe)₂ might be a candidate agent for further developments in the prevention of cardiovascular diseases.

Conflicts of interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian institutions Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC). Marcos Raniel Stralio was a recipient of the grant CAPES. Gustavo Chiabrando is member of the Research Career of CONICET (Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina). Andreza Fabro de Bem, João

Batista Teixeira Rocha and Marcelo Farina are supported by research fellowships from CNPq-Brazil.

References

- [1] G.K. Hansson, A.K. Robertson, C. Soderberg-Nauler, Inflammation and atherosclerosis, *Annu. Rev. Pathol.* 1 (2006) 297–329.
- [2] R. Ross, Atherosclerosis – an inflammatory disease, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 115–126.
- [3] A.J. Lusis, Atherosclerosis, *Nature* 407 (2000) 233–241.
- [4] Y. Libby, Inflammation in atherosclerosis, *Nature* 420 (2002) 868–874.
- [5] Y. Yamada, T. Doi, T. Hamakubo, T. Kodama, Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defense and disorders of the central nervous system, *Cell. Mol. Life Sci.* 54 (1998) 628–640.
- [6] W.J. de Villiers, E.J. Smart, Macrophage scavenger receptors and foam cell formation, *J. Leukoc. Biol.* 66 (1999) 740–746.
- [7] G.K. Hansson, P. Libby, U. Schonbeck, Z.Q. Yan, Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis, *Circ. Res.* 91 (2002) 281–291.
- [8] G.K. Hansson, Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1685–1695.
- [9] X.P. Xu, S.R. Meisel, J.M. Ong, S. Kaul, B. Cercek, T.B. Rajavajethi, B. Sharif, P.K. Shah, Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages, *Circulation* 99 (1999) 398–409.
- [10] H. Geng, A. Wang, G. Rong, B. Zhu, Y. Deng, J. Chen, R. Zhong, The effects of ox-LDL in human atherosclerosis may be mediated in part by the toll-like receptor 4 pathway, *Mol. Cell. Biochem.* 342 (2010) 201–206.
- [11] I. Levitan, S. Votlov, P.V. Subbiah, Oxidized LDL diversity, patterns of recognition, and pathophysiology, *Antioxid. Redox Signal.* 13 (2010) 39–75.
- [12] M. Karin, The beginning of the end: kappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 27339–27342.
- [13] F. Robbesyn, V. Garcia, N. Auge, O. Vieira, M.F. Frisach, R. Salvayre, A. Negre-Salvayre, HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells, *FASEB J.* 17 (2003) 743–745.
- [14] S. Blankenberg, H.J. Rupprecht, C. Bickel, M. Torzewski, G. Hafner, L. Tiret, M. Simeg, F. Cambien, J. Meyer, K.J. Lackner, Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1605–1613.
- [15] L. Flohe, Glutathione peroxidase, *Basic Life Sci.* 49 (1988) 663–668.
- [16] H. Sies, Glutathione and its role in cellular functions, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 916–921.
- [17] C.W. Nogueira, J.B. Rocha, Diphenyl diselenide a Janus-faced molecule, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 2055–2071.
- [18] A.F. de Bem, B. Fuza, P. Calcerada, P. Brito, G. Peluffo, T. Dinis, M. Trujillo, J.T. Rocha, R. Radi, L. Almeida, Protective effect of diphenyl diselenide against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: a comparison with ebselen, *Nitric Oxide* 31 (2013) 20–30.
- [19] A.F. de Bem, M. Farina, L. Portella Rde, C.W. Nogueira, T.C. Dinis, J.A. Laranjinha, L.M. Almeida, J.B. Rocha, Diphenyl diselenide: a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro, *Atherosclerosis* 201 (2008) 92–100.
- [20] A.F. de Bem, L. Portella Rde, E. Colpo, M.M. Duarte, A. Frediane, P.S. Taube, C.W. Nogueira, M. Farina, E.L. da Silva, J.B. Teixeira Rocha, Diphenyl diselenide decreases serum levels of total cholesterol and tissue oxidative stress in cholesterol-fed rabbits, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 105 (2009) 17–23.
- [21] M.A. Hort, M.R. Stralioatto, P.M. Netto, J.B. da Rocha, A.F. de Bem, R.M. Ribeiro-do-Valle, Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDL β - β mice by attenuation of oxidative stress and inflammation, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 58 (2011) 91–101.
- [22] C. Paulmier, Selenium reagents and intermediates, in: *Organic Synthesis*, Pergamon, Oxford, 1985.
- [23] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [24] M. Reers, T.W. Smith, L.B. Chen, α -aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential, *Biochemistry* 30 (1991) 4480–4486.
- [25] J.M. Siqueira, A.C. Gazola, M.R. Farias, L. Volkov, N. Rivard, A.J. de Brum-Fernandes, R.M. Ribeiro-do-Valle, Evaluation of the antitumor effect of dihydrocurcubitacin-B in both in vitro and in vivo models, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64 (2009) 529–538.
- [26] R. Koopman, G. Schaart, M.K. Hesselink, Optimization of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids, *Histochem. Cell. Biol.* 116 (2001) 63–68.
- [27] D.E. Kleiner, W.G. Steyer-Stevenson, Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases, *Anal. Biochem.* 218 (1994) 325–329.
- [28] K. Schulz, S. Kerber, M. Klein, Reevaluation of the Griess method for determining NO $_2$ /NO $_3$ in aqueous and protein-containing samples, *Nitric Oxide* 3 (1999) 225–234.
- [29] T. Deng, K. Xu, L. Zhang, X. Cheng, Dynamic determination of Ox-LDL-induced oxidative/nitrosative stress in single macrophage by using fluorescent probes, *Cell Biol. Int.* 32 (2008) 1425–1432.
- [30] M. Rosenblat, M. Aviram, Macrophage glutathione content and glutathione peroxidase activity are inversely related to cell-mediated oxidation of LDL: in vitro and in vivo studies, *Free Radic. Biol. Med.* 24 (1998) 305–317.
- [31] J.L. Perfellini, T. Roumier, G. Kroemer, Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis, *Trends Cell Biol.* 15 (2005) 170–183.
- [32] T. Matsunaga, K. Iguchi, T. Nakajima, I. Koyama, T. Miyazaki, I. Inoue, S. Kawai, S. Katayama, K. Hirano, S. Hokari, T. Komoda, Glycated high-density lipoprotein induces apoptosis of endothelial cells via a mitochondrial dysfunction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287 (2001) 714–720.
- [33] R. Amis, J.C. Begey, Oxidized LDL promotes peroxido-mediated mitochondrial dysfunction and cell death in human macrophages: a caspase-3 independent pathway, *Circ. Res.* 92 (2003) e20–29.
- [34] M.H. da Silva, E.J. da Rosa, N.R. de Carvalho, F. Dobrachinski, J.B. da Rocha, J.L. Mauriz, J. Gonzalez-Gallego, F.A. Soares, Acute brain damage induced by acetaminophen in mice: effect of diphenyl diselenide on oxidative stress and mitochondrial dysfunction, *Neurotoxicity Res.* 21 (2012) 334–344.
- [35] D.F. Meinerz, M.T. de Paula, B. Compari, M.J. Silva, A.E. Schmitz, H.C. Braga, P.S. Taube, A.L. Braga, J.B. Rocha, A.L. Dufre, M. Farina, J.L. Franco, T. Possner, Protective effects of organoselenium compounds against methylmercury-induced oxidative stress in mouse brain mitochondria-enriched fractions, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44 (2011) 1156–1163. *Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica*. [et al.]
- [36] H.C. Ou, F.F. Chou, W.H. Sheu, S.L. Hsu, W.J. Lee, Protective effects of magnolol against oxidized LDL-induced apoptosis in endothelial cells, *Arch. Toxicol.* 81 (2007) 421–432.
- [37] S. Tan, Y. Sagar, Y. Liu, P. Maher, D. Schubert, The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death, *J. Cell. Biol.* 141 (1998) 1423–1432.
- [38] M. Karin, T. Takahashi, P. Kapahi, M. Delhase, Y. Chen, C. Makris, D. Rothwarf, V. Baur, C. Natoli, F. Guido, N. Li, Oxidative stress and gene expression: the AP-1 and NF-kappaB connections, *BioFactors* 15 (2001) 87–89.
- [39] R. Terkeltaub, C.L. Banks, J. Solan, D. Santoro, K. Brand, L.K. Curtis, Oxidized LDL induces monocyte cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte oxidant-mediated activity, *Arterioscler Thromb.* 14 (1994) 47–53.
- [40] C. Napoli, Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010 (2003) 698–709.
- [41] C. Maziere, J.C. Maziere, Activation of transcription factors and gene expression by oxidized low-density lipoprotein, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 127–137.
- [42] D. Impellizzeri, E. Esposito, E. Mazoni, I. Paterniti, R. Di Paola, P. Bramanti, V.M. Moritru, A. Procopio, E. Perri, D. Britti, S. Cuzzocrea, The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice, *Biochem. Pharmacol.* 83 (2012) 1433–1426.
- [43] W.C. Chiu, C.J. Chen, T.S. Lee, Z.J. Chen, P.H. Ke, A.N. Chiang, Oxidative stress enhances AP-1- and NF-kappaB-mediated regulation of beta(2)-glycoprotein 1 gene expression in hepatoma cells, *J. Cell. Biochem.* 111 (2010) 988–998.
- [44] P. Wiesner, S.H. Choi, F. Almazan, C. Benner, W. Huang, C.J. Diehl, A. Gonen, S. Butler, J.L. Witzum, C.K. Glass, Y.L. Miller, Low doses of lipopolysaccharide and minimally oxidized low-density lipoprotein cooperatively activate macrophages via nuclear factor kappa B and activator protein-1: possible mechanism for acceleration of atherosclerosis by subclinical endotoxemia, *Circ. Res.* 107 (2010) 56–65.
- [45] I.M. Loftus, A.R. Naylor, S. Goodall, M. Crowther, L. Jones, P.R. Bell, M.M. Thompson, Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption, *Stroke* 31 (2000) 40–47.
- [46] Z.S. Galis, J.J. Khatri, Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly, *Circ. Res.* 90 (2002) 251–262.
- [47] A. Radhika, S.S. Jacob, P.R. Sudhakar, Influence of oxidatively modified LDL on monocyte-macrophage differentiation, *Mol. Cell. Biochem.* 305 (2007) 133–143.
- [48] R.P. Patel, A. Levenson, J.H. Crawford, V.M. Darley-Usmar, Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis, *Cardiovasc. Res.* 47 (2000) 465–474.
- [49] K. Persson, L. Sauma, A. Sahlholm, L. Xu, W. Li, X.M. Yuan, LDL and iV-oxidized LDL induce upregulation of iNOS and NO in unstimulated J774 macrophages and HUVEC, *APMIS* 117 (2009) 1–9.
- [50] K.M. Shin, L. Shen, S.J. Park, J.H. Jeong, K.T. Lee, Bis-(3-hydroxyphenyl) diselenide inhibits iPS-stimulated iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophage cells through the NF-kappaB inactivation, *J. Pharm. Pharmacol.* 61 (2009) 479–486.
- [51] L.L. Ruppel, A.F. de Bem, G.A. Roth, Diphenyl diselenide-modulation of macrophage activation: down-regulation of classical and alternative activation markers, *Innate Immun.* 18 (2012) 627–637.
- [52] A.C. Nicholson, D.P. Hajjar, CD36, oxidized LDL and PPAR gamma: pathological interactions in macrophages and atherosclerosis, *Vasc. Pharmacol.* 41 (2004) 139–146.
- [53] N. Wakabayashi, A.T. Dinkova-Kostova, W.D. Holtzclaw, M.I. Kang, A. Kobayashi, M. Yamamoto, T.W. Kensler, P. Talalay, Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (2004) 2040–2045.

ANEXO II

Manuscrito em elaboração

Different signaling pathways are involved in diphenyl diselenide antioxidant response in macrophages

Marcos Raniel Stralio¹, Daniel da Silva¹, Marcelo Farina¹, Rafael Radi³, João Batista da Rocha², Andreza Fabro de Bem^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil; ²Departamento de Química; Centro de Ciências Naturais e Exatas, UFSM, Santa Maria, RS; ³Departamento de Bioquímica and Center for Free Radical and Biomedical Research, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Abstract

The organoselenium compound, diphenyl diselenide (PhSe)₂, has been shown potential role preventing atherosclerosis and other oxidative stress-related diseases. (PhSe)₂ acts as a glutathione peroxidase mimic, using GSH as substrate in its catalytic cycle. However, this compound increases GSH levels in cells, suggesting that (PhSe)₂ has other effects beyond its previously described properties. Thus, the aim of this study was to investigate the mechanisms underlying the effects of (PhSe)₂ in modulating the synthesis of GSH and other antioxidant defense systems in murine J774 macrophage-like cells. First, we observed that (PhSe)₂ increases GSH levels and the activity of GGCS in macrophage cells in a time-dependent manner. These results are related to the (PhSe)₂ ability in promoting the activation and translocation from the cytosol to the nucleus of the transcription factor Nrf2 (erythroid-derived 2)-related factor. On the other hand, the increase in GGCS activity was reversed by the presence of PI3K, JNK and p38MAPK inhibitors, suggesting that these signaling pathways are involved in the Nrf2 activation and nuclear translocation. Moreover, (PhSe)₂ increases the levels of HO-1 and Prx-1 that are known target of Nrf2 transcription factor. In addition, this compound elevates the total GPx activity. Aimed to investigate what is the isoform of this enzyme responsible for the altered GPx activity, we observed that either GPx1 and GPx2 protein levels are increased after (PhSe)₂ treatment. Interestingly, neither MnSOD nor GPx2 protein levels, increased by (PhSe)₂ treatment, are targets of Nrf2, suggesting that other transcription factor may be involved in the (PhSe)₂ antioxidant effects. Taken together, our results suggest that (PhSe)₂ improves antioxidant defense systems in macrophage cells by modulating different signaling pathways.

1. INTRODUCTION

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease and the leading cause of heart attacks, stroke, and peripheral *vascular disease*. Many studies demonstrated that blood-derived inflammatory cells, particularly monocytes/macrophages and the consequent vascular oxidative stress, have a key role in the initiation and progression of atherosclerosis (Mitchinson et al., 1996, Kockx, 1998, Lusis, 2000, Hansson, 2005, Swirski and Nahrendorf, 2013). In fact, oxLDL-activated macrophages produce cytokines, proteases, reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS), which have a causal role as key mediators signaling oxidative pathways underlying vascular inflammation (Lusis, 2000).

In this context, the investigation of antioxidant and pharmacological properties of synthetic organoselenium compounds has attracted considerable attention in the last years due to protective effects in several experimental models related to atherosclerosis (de Bem et al., 2009, Hort et al., 2011, Stralioetto et al., 2013). Indeed, diphenyl diselenide (PhSe)₂, a simple organoselenium compound, has shown important antiatherogenic actions in both *in vitro* and *in vivo* studies (de Bem et al., 2008, de Bem et al., 2009, Hort et al., 2011, Mancini et al., 2014, Fiuza et al., 2015).

Initially, this compound was described as a mimic of glutathione peroxidase (GPx), reducing a variety of hydroperoxides and protecting cell membranes from oxidative damage (Mugesh et al., 2001, Nogueira et al., 2004, Nogueira and Rocha, 2010, Bartolini et al., 2015). The proposed mechanism of protective effect of (PhSe)₂ is through its interaction with thiol equivalents (i.e glutathione - GSH) generating a selenol, which can react and consequently neutralize hydroperoxides (Nogueira et al., 2004, de Bem et al., 2013). However, later studies have shown that beyond the GPx-Like activity, (PhSe)₂ can also induce the expression of important antioxidant enzymes, especially those related to glutathione (GSH) system (de Bem et al., 2013, Fiuza et al., 2015).

Recently, we demonstrated that (PhSe)₂ reduces atherogenic signaling triggered by oxLDL in macrophage cells, by inhibiting ROS generation and ROS-induced inflammatory pathways modulated by NF- κ B, thus preventing the disturbance of NO homeostasis, activation of matrix metalloproteinase, foam cell formation and mitochondrial dysfunction (Stralioetto et al., 2013). Furthermore, using a primary culture of bovine aortic endothelial cells we verified a prominent protective effect of (PhSe)₂ against peroxynitrite-mediated toxicity, a

powerful oxidant involved since the first steps of atherosclerosis. One of the proposed mechanisms for this effect was evidenced by its ability to induce the activation of nuclear erythroid 2-related factor (Nrf2). This activation induced by (PhSe)₂ causes a general increment in cellular antioxidant response evidenced by the raise in GSH levels and in the expression of GPx and peroxiredoxins, important peroxide-reducing enzymes (de Bem et al., 2013, Fiuza et al., 2015). However, the mechanism of Nrf2 activation by (PhSe)₂ is not completely understood.

Under physiological conditions, the transcription factor Nrf2 is inactive and retained in the cytosol, bound to Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein-1) (Itoh et al., 2004). However, exposure to electrophiles or under oxidative stress conditions, Keap1 has been suggested to be a direct sensor and the interaction between Nrf2 and Keap1 is disrupted, leading to the translocation of the Nrf2 from the cytosol to the nucleus (Kurzawski et al., 2012). Therefore, Nrf2 promotes the transcription of genes encoding antioxidant and phase II detoxification enzymes, such as heme oxygenase-1 (HO-1), gamma-glutamylcysteine synthetase (GGCS), peroxiredoxin-1 (Prx-1), NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (NQO1), glutathione-S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and others (Dinkova-Kostova, 2002, Bea et al., 2003, Kim et al., 2009, Brigelius-Flohe and Maiorino, 2013).

The nuclear accumulation of Nrf2 may also be mediated by phosphorylation of Nrf2 due to activation of several upstream kinases such as the p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase C (PKC) (Zipper and Mulcahy, 2000, Huang et al., 2002, Kobayashi and Yamamoto, 2006, Rojo et al., 2008, Vrba et al., 2013).

In this way, considering our previous evidence that antiatherogenic properties of (PhSe)₂ is in part related to its ability to reduce oxidative stress via Nrf2 induction (de Bem et al., 2013, Stralioetto et al., 2013), we aim to investigate if the mechanism through Nrf2 is activate in macrophage and finally modulate the cellular antioxidant response.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Material

Diphenyl diselenide (PhSe)₂ was synthesized as previously described (Paulmier, 1986). Analysis of the ¹H NMR and ¹³C NMR spectra showed that the compound presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of (PhSe)₂ (99.9%) was determined by GC/HPLC. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.2 Cell culture

Murine J774 A.1 macrophage cells were obtained from *Rio de Janeiro Cell Bank* (BCRJ:0121, Rio de Janeiro, Brazil) and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine, 10 mM HEPES, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS) in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were subcultured at 80% confluence and the exposition of cells to (PhSe)₂ was carried out in DMEM with 0.5% FBS.

2.3 Measurement of cellular reduced glutathione (GSH)

Intracellular levels of GSH were determined by fluorimetric assay as described previously (Hissin and Hilf, 1976). Briefly, macrophages (5.0x10⁵ cells/well) were seeded in 6 wells plate and then incubated with (PhSe)₂ (1 μM) or vehicle for 1, 3, 6 and 24 hours. After treatment, cells were scrapped with 0.6 M perchloric acid and recovered into 100 mM PBS containing 5 mM EDTA, pH 8.0 at 4°C. Samples were centrifuged at 14,000g for 10 min at 4°C. The supernatant (100 μL) was incubated with ortho-phthaldehyde (100 μL, 0.1% w/v in methanol) and 1.8 mL of 100 mM Na₂HPO₄ for 15 min at room temperature. Fluorescence intensity was read at an emission wavelength of 420 nm with an excitation wavelength of 350 nm in a spectrofluorometer (Tecan, Grödig/Salzburg, Austria). Cellular GSH content was calculated by using concurrently run standard curve and expressed as μg of GSH per mg of protein.

2.4 Gamma-glutamylcysteine synthetase activity

Gamma-glutamylcysteine synthetase (GGCS) activity was assayed as described by Seeling and Meister (1985) with slight modifications. Macrophages (5.0×10^5 cells/well) were seeded in 6 wells plate and then incubated with $(\text{PhSe})_2$ (1 μM) or vehicle for 1, 3, 6 and 24 hours. After treatment, macrophages were washed with PBS and scraped in a lysis buffer containing 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl_2 and 0.5% of Triton. Cells were centrifuged at $12.500g$ for 30 min and the supernatants were used for the enzyme activity determination following NADH oxidation at 340 nm in a reaction mix containing 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM KCl, 5 mM ATP- Na_2 , 2 mM phosphoenolpyruvate, 10 mM L-glutamate, 10 mM L- α -aminobutyrate, 20 mM MgCl_2 , 2 mM NADH, 17 μg of pyruvate kinase and lactate dehydrogenase. Data were expressed as nmol NADH/min/mg protein.

2.5 Immunofluorescence analysis of Nrf2 nuclear translocation

Cells (3.0×10^5 cells/well) were seeded in coverslips in 12 wells plate and incubated with $(\text{PhSe})_2$ (1 μM) or vehicle for 1, 3, 6 and 24 hours. After treatment, cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 12 min, and blocked with 5% of albumin in 0.1% (v/v) Tween 20, 50 mM Tris saline buffer (TBS-T20) for 1h. The nuclear translocation of Nrf2 was evaluated by immunofluorescence using an anti-Nrf2 rabbit monoclonal antibody (1:100 dilution) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) in TBS-T20 for 24h at 4°C, followed by FITC conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:400 dilution) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 1h. Cell nuclei was stained with Hoechst dye 33,258 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 min. The images were acquired from eight to ten randomly chosen fields using a fluorescent microscope (Olympus BX41).

2.6 Cytosolic and nuclear expression of Nrf2

The cytosolic and nuclear expression of Nrf2 was evaluated by Western blot analysis. Macrophages (5.0×10^5 cells/well) were seeded in 6 wells plate and incubated with $(\text{PhSe})_2$ (1 μM) or vehicle for 1, 3, 6 and 24 hours. Cells from two wells were used for sample. Initially, cells were washed twice with PBS 37°C and harvested in 200 μL of ice-cold lysis Buffer A, containing 10 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM

EDTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM β-glycerophosphate, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton x-100 and protease inhibitor cocktail (all from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cells homogenate were chilled on ice for 15 minutes, vigorously shaken and centrifuged at 15.000g for 30 minutes at 4°C. The supernatant containing the cytosolic fraction was separated and stored at -80°C. Hereafter, the resulting pellet was resuspended in 200 μL of ice-cold lysis Buffer B, containing 20 mM Hepes (pH 7.9), 50 mM KCl, 420 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 10 mM β-glycerophosphate, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton x-100, 25% glycerol and protease inhibitor cocktail (all from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Samples were then incubated on ice for 15 min and vortex-mixed for 10-15 seconds every 2 min, and finally centrifuged at 15.000g for 30 min at 4 °C. The supernatant containing the nuclear fraction was separated and stored at -80°C until use.

To determinate the expression of Nrf2 in the cytosolic and nuclear fractions, samples (50 μg/mL protein) were separated by 12% SDS-polyacrylamide gels, under reducing conditions and transferred to a nitrocellulose membrane. After washing and blocking, membranes were incubated overnight with the primary anti-Nrf2 rabbit polyclonal antibodies 1:300 dilution (Santa Cruz Biotechnology). After that, membranes were incubated with secondary anti-rabbit antibody 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology). The immunocomplexes were visualized using the ECL chemiluminescence detection system (GE Healthcare). Equal loading of gel lanes of the cytosolic fraction was verified by probing the blots for β-actin (Santa Cruz Biotechnology) content and nuclear fraction for Lamin A/C protein (Cell Signaling Technology). Protein levels were quantified by optical density using Image-J 1.36b Software.

2.7 Glutathione peroxidase activity

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured according to Wendel (1981) using tert-butylhydroperoxide (tBuOOH) as substrate. The enzyme activity was determined by monitoring the NADPH oxidation at 340 nm in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 mM EDTA, 1 mM glutathione (GSH), 0.2 U/mL glutathione reductase (GR), 0.2 mM (tBuOOH), 0.2 mM NADPH and the supernatant containing 0.2-0.3 mg protein/mL. GPx activity was expressed as nmoles of NADPH oxidized/min/mg of protein using an extinction coefficient of 6.22×10^3 M/cm for NADPH.

2.8 Expression of HO-1, Prx-1, GPx1, GPx2 and MnSOD

The expression of HO-1, Prx-1, GPx1, GPx2 and MnSOD were evaluated by Western blot analysis. Macrophages (5.0×10^5 cells/well) were seeded in 6 wells plate and then incubated with $(\text{PhSe})_2$ (1 μM) or vehicle for 1, 3, 6 and 24h. Cell lysates were prepared in lysis buffer containing 1 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2.5 M NaCl, 0.25 M EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, 5 mM Na_3VO_4 , 1 mM β -glycerol phosphate, and protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany). Supernatants obtained after centrifugation (15.000g, 30 min, 4°C) were recovered and the protein content was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951). The protein (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protein) was size-separated by electrophoresis in either 10% (for the HO-1) or 15% (for GPx1, GPx2, Prx-1 and MnSOD) SDS-polyacrylamide gels, under reducing conditions and transferred to a nitrocellulose membrane. After washing and blocking, membranes were incubated overnight with the primary anti-HO-1 goat polyclonal (1:500), anti-GPx1 and anti-GPx2 rabbit polyclonal (1:250), anti-MnSOD rabbit polyclonal (1:1000) and anti-Prx-1 rabbit polyclonal (1:5000) antibodies (Santa Cruz Biotechnology). After washing, membranes were incubated with horse radish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody (1:2000; Santa Cruz Biotechnology) and the immunocomplexes were visualized using the ECL chemiluminescence detection system (GE Healthcare). Equal protein loading in each lane was verified by probing the blots for β -actin (Santa Cruz Biotechnology) content. Protein levels were quantified by optical density using Image-J 1.36b Software.

2.9 Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM from at least three independent experiments. Differences between mean values of multiple groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey *post-hoc* multiple range test when P was significant ($P < 0.05$).

3. RESULTS

3.1 (PhSe)₂ increases the GSH biosynthesis

Figure 1A shows the effect of (PhSe)₂ in the cellular GSH content. The (PhSe)₂ treatment caused a significant increase in the cellular GSH content after 1h, reaching the highest level after 6h of incubation and this effect lasted for at least 24h, suggesting that (PhSe)₂ acts in a time-dependent manner. In parallel, (PhSe)₂ induced the augment in the GGCS activity after 1h of incubation and this effect continued until 24h (Fig. 1B). Thus, our data suggest that (PhSe)₂ is able to improve GSH content by increasing GGCS activity in macrophages.

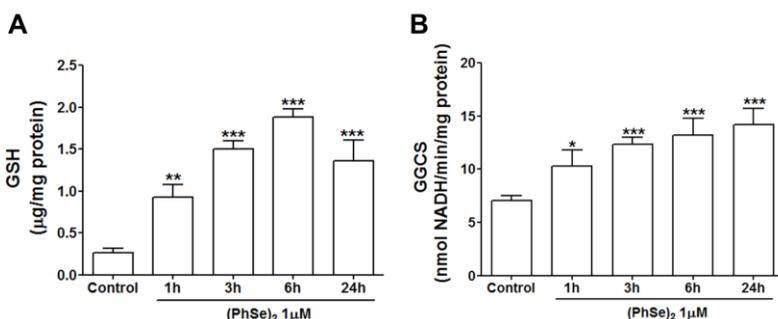


Figure 1: (PhSe)₂ increased GSH biosynthesis in macrophages. Macrophages were incubated with 1 µM of (PhSe)₂ during 1, 3, 6 and 24 hours. (A) Intracellular GSH levels were determined and the results expressed in mg of GSH per mg of protein. (B) GGCS activity was determined and expressed as nmol NADH consumed per minute per mg of protein. Each bar represents the mean ± SEM of at least three independent experiments. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 indicates the difference when compared with control (one-way ANOVA, Tukey' test).

3.2 (PhSe)₂ activates Nrf2 translocation to the nucleus

The increased GGCS activity has been correlated with the translocation from the cytosol to the nucleus of the transcription factor Nrf2 and consequently its increased transcriptional activity (Hybertson et al., 2011). Therefore, the capacity of (PhSe)₂ in promoting the activation and nuclear translocation of Nrf2 transcription factor was evaluated in a time-course manner in macrophages by immunocytochemistry and Western blotting analysis.

As demonstrated in Fig. 2A, (PhSe)₂ promoted an increase in nuclear intensity of immunofluorescence (green) since the first hour of incubation, suggesting that (PhSe)₂ can rapidly induce the translocation of Nrf2 from cytosol to the nucleus. Moreover, this nuclear translocation was maintained until 24h of incubation. To confirm this result, the immunoreactivity of Nrf2 in the nuclear (Fig. 2B) and cytosolic fractions (Fig. 2C) was evaluated by Western blotting, as described in materials and methods section, after exposure of macrophages to (PhSe)₂ by 1, 3, 6 and 24h. As expected, (PhSe)₂ caused a significant increase in the Nrf2 nuclear immunoreactivity in a time-dependent manner (Fig. 2B), whereas its cytoplasm immunoreactivity remained constant during the treatment (Fig. 2C). *Preparations of nuclear and cytoplasmic extracts were confirmed by lamin B1 (Fig. 2B) and β-actin (Fig. 2C) levels, respectively. Thus, it seems that (PhSe)₂ induces the translocation of Nrf2 to the nucleus as fast as 1h of exposure and this effect can be related to the activation of antioxidant enzymes as was evidenced by the increasing in GGCS activity and the consequent increment in cellular GSH levels up to 24h.*

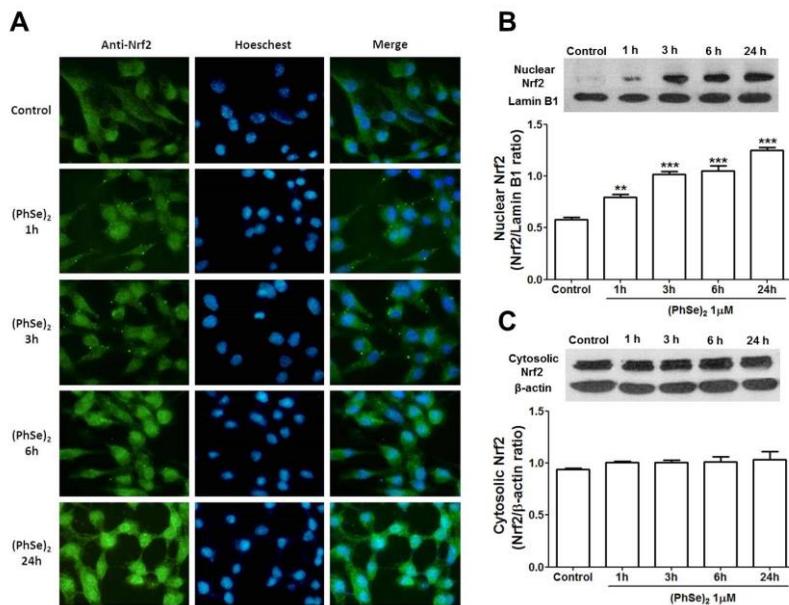


Figure 2: (PhSe)₂ induced nuclear translocation of Nrf2 transcription factor in macrophages. Macrophages were incubated with 1 μ M of (PhSe)₂ during 1, 3, 6 and 24 hours. (A) Representative image of immunofluorescence for the nuclear translocation of Nrf2 (green). Nuclear counterstaining was made with Hoechst 33258 (blue) and representative merge of the two fluorescence images (green and blue) (Magnification 1000x). (B) Representative Western blotting analysis of the transcription factor Nrf2 (B) nuclear and (C) cytosolic were determined. The load control of nuclear protein fraction was normalized using Lamina B1 and the cytosolic fraction with β -actin. Each bar represents the mean \pm SEM of at least three independent experiments. **P<0.01; ***P<0.001 indicates the difference when compared with control (one-way ANOVA, Tukey's test)

3.3 Signaling pathway involved in the (PhSe)₂-mediated activation of GGCS

In order to investigate the effect of (PhSe)₂ on the possible signaling pathway responsible for Nrf2 translocation, we measured the nuclear Nrf2 immunoreactivity in the presence of specific inhibitor for P38 (SB203580), JNK (SP600125) and PI3K (LY294002). Quantification of immunoreactivity bands (left panel) and a representative Western blotting in duplicate (right panel) are demonstrated in the Fig. 3. The result shows that (PhSe)₂ significantly increased the nuclear immunoreactivity of Nrf2 after 3h of incubation. On the other hand, the presence of SB203580, SP600125 or LY294002 inhibitors completely prevent the nuclear translocation induced by (PhSe)₂.

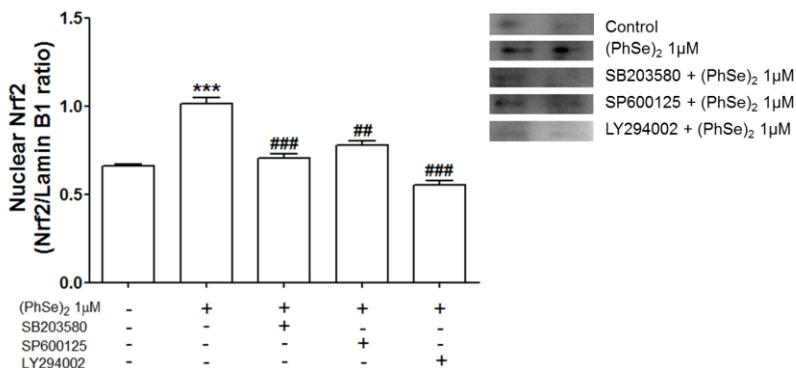


Figure 3: The inhibitors of p38, PI3K and JNK pathways prevent the effect of (PhSe)₂ in the Nrf2 nuclear translocation. Macrophages were incubated with p38 inhibitor SB203580, JNK inhibitor SP600125, PI3K inhibitor LY294002 (10 μ M) or vehicle for 1 hour, following incubation with 1 μ M of (PhSe)₂ for 3 hours. The protein level of nuclear Nrf2 transcription factor was determined by Western blotting and expressed as the ratio between Nrf2 and Lamin B1. The load control of nuclear protein fraction was normalized using Lamin B1. Each bar represents the mean \pm SEM of at least three independent experiments. ***P<0.001 indicates the difference when compared with control; ##P<0.01 and ###P<0.001 indicates the difference when compared with (PhSe)₂ (one-way ANOVA, Tukey's test)

To confirm the role of this signaling pathway, we measured the GGCS activity after (PhSe)₂ and/or kinases inhibitors incubation, as described in material and methods section. As demonstrated in the Fig. 4, the activity of GGCS was significantly increased after 3h of incubation with (PhSe)₂. The presence of SB203580 in the incubation medium completely inhibited the GGCS activity, while the inhibitors SP600125 and LY294002 partially prevented the (PhSe)₂-induced activation of this enzyme. Taken together, these results suggest that p38-MAPK, JNK and PI3K seem to have an important role in the activation and translocation of Nrf2.

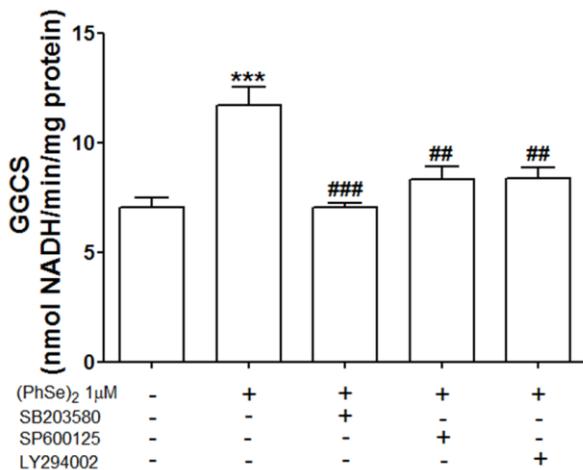


Figure 4: The inhibitors of p38, JNK and PI3K pathways modulate the GGCS activity induced by (PhSe)₂. Macrophages were incubated with p38 inhibitor SB203580, JNK inhibitor SP600125, PI3K inhibitor LY294002 (10 μ M) or vehicle for 1 hour, following incubation with 1 μ M of (PhSe)₂ for 3 hours. The GGCS activity was determined and expressed as nmol NADH consumed per minute per mg protein. Each bar represents the mean \pm SEM of at least three independent experiments. ***P<0.001 indicates the difference when compared with control; ##P<0.01 and ###P<0.001 indicates the difference when compared with (PhSe)₂ (one-way ANOVA, Tukey's test).

3.4 (PhSe)₂ increases the expression of other Nrf2 targets

We assessed the expression of two classical enzymes regulated by Nrf2, heme oxygenase (HO-1) and peroxiredoxin-1 (Prx-1), in macrophages exposed to (PhSe)₂ at different times. As demonstrated in Fig. 5A and 5B, (PhSe)₂ significantly increased the HO-1 and Prx-1 expression, respectively, only after 24h of incubation, without noticeable increase in shorter times. Thus, these results highlight the possible involvement of Nrf2 in the antioxidant effects of (PhSe)₂.

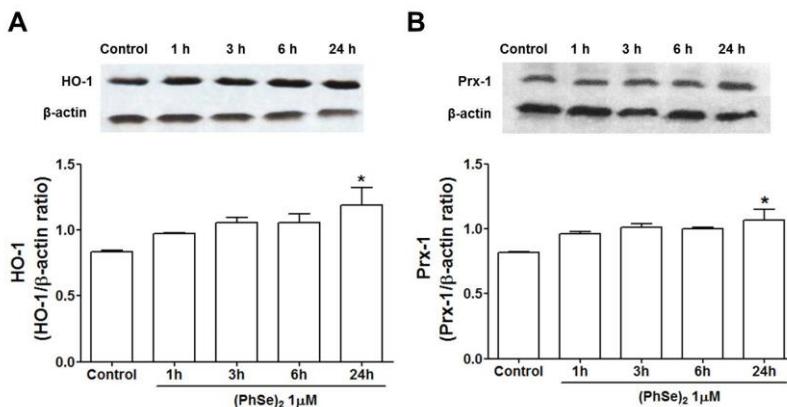


Figure 5: (PhSe)₂ increased the protein level of HO-1 and Prx-1 in macrophage. Macrophages were incubated with 1 μ M of (PhSe)₂ or vehicle during 1, 3, 6 and 24 hours. The protein level of (A) HO-1 and (B) Prx-1 were determined by Western blotting assay. The β -actin was used as loading control. Results were expressed as the ratio between HO-1 or Prx-1 and β -actin. Each bar represents the mean \pm SEM of at least three independent experiments. *P<0.05 indicates the difference when compared with control (one-way ANOVA, Tukey's test).

3.5 (PhSe)₂ increases GPx activity and expression

(PhSe)₂ increased the GPx activity within 1h of incubation and this effect remained for at least 24h (Fig. 6A). In order to clarify which GPx isoform would be regulated by (PhSe)₂, we evaluated the immunoreactivity of GPx1 and GPx2 in macrophages by Western blotting. We observed the effect of (PhSe)₂ on GPx2 expression only after 24h of incubation (Fig. 6B), while there was an increase in the immunoreactivity for GPx1 in a shorter time, i.e. 1 hour, remaining increased until 24h of incubation (Fig. 6C). These results pointing out that other mechanisms, beside Nrf2, could be associated to the effect of (PhSe)₂ in inducing cellular antioxidant responses.

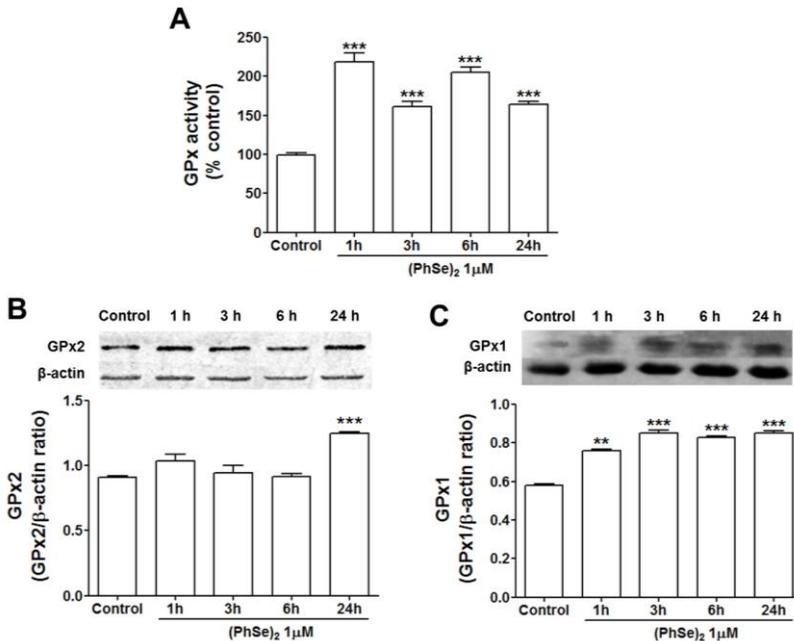


Figure 6: (PhSe)₂ increased the activity of GPx enzyme and protein level of GPx1 and GPx2 isoforms. Macrophages were incubated with 1 µM of (PhSe)₂ or vehicle during 1, 3, 6 and 24 hours. (A) The activity of GPx enzyme was expressed as percentage (%) compared to the control. The protein level of GPx2 (B) and GPx1 (C) isoforms were determined by Western blotting assay and the results expressed as a ratio between GPx2 or GPx1 and β-actin. The β-actin was used as a loading control. Each bar represents the mean ± SEM of at

least three independent experiments. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ indicates the difference when compared with control (one-way ANOVA, Tukey's test).

3.6 (PhSe)₂ increase MnSOD expression

In order to better understand the possible effects of (PhSe)₂ independently of Nrf2 transcription factor, we measured the levels of MnSOD (SOD2), an antioxidant enzymes present in mitochondria. As shown in Fig. 7, (PhSe)₂ induced a significant increase in the immunoreactivity of MnSOD after 6 and 24 hours of incubation.

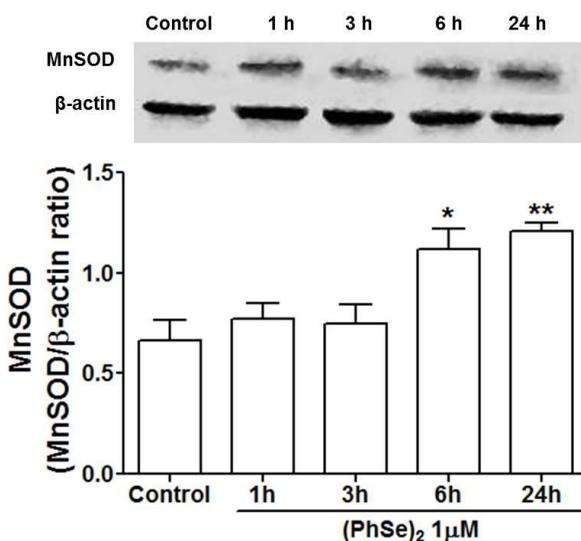


Figure 7: (PhSe)₂ increased the protein level of MnSOD in macrophage. Macrophages were incubated with 1 μ M of (PhSe)₂ or vehicle during 1, 3, 6 and 24 hours. The protein level of MnSOD was determined by Western blotting assay. The β -actin was used as loading control. Result was expressed as a ratio between MnSOD and β -actin. Each bar represents the mean \pm SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ indicate the difference when compared with control (one-way ANOVA, Tukey's test)

4. DISCUSSION

In the present study, we showed that (PhSe)₂ improves the intracellular redox environment in macrophages, as verified by increased in GSH biosynthesis and GGCS activity in a time-dependent manner, being both of them significantly increased after 1h. This result is in agreement with earlier report from our group showing that (PhSe)₂ elevated GSH levels and GGCS activity in endothelial cells (BAEC) (de Bem et al., 2013). In fact, a previous report has demonstrated inverse relationship between macrophage GSH content/GPx activity and atherosclerotic process (Rosenblat and Aviram, 1998). The important fact is that the maintenance of intracellular GSH content and GPx activity in macrophages determine the response to the cytotoxic effects of oxidized lipids and other pro-oxidants (Gotoh et al., 1993, Rosenblat and Aviram, 1998). In this sense, ebselen, an organoselenium compound analog of (PhSe)₂, increased GSH levels in hepatic cell line (HepG2 cell) and this effect was attributed to its ability to activate Nrf2-dependent response with increased GGCS activity (Tamasi et al., 2004).

Interestingly, (PhSe)₂ caused a parallel increase in the levels of GSH and GGCS activity and Nrf2 translocation to nucleus in macrophages, suggesting that the increased GSH biosynthesis and GGCS activity are Nrf2-dependent mechanism. *Nrf2 is sequestered by Keap1* in an inactive form in the *cytoplasm*. However, in the presence of oxidative stress, electrophilic insult or phosphorylation, *Nrf2* is freed from Keap1 and translocate to nucleus (Hayes and McMahon, 2001, Itoh et al., 2004). Indeed, protein kinases, such as ERK, p38-MAPK, JNK, PKC and PI3K phosphorylate Nrf2 and promote its translocation to the nucleus, activating gene transcription of detoxification enzymes and antioxidants (Hayes and McMahon, 2001, Huang et al., 2002, Rojo et al., 2008, Vrba et al., 2013).

More recently, it was demonstrated that (PhSe)₂ and Ebselen promoted, within 3 hours, the Nrf2 nuclear translocation in BAEC cells (de Bem et al., 2013), and it was suggested that the mechanism of this alterations is through by direct interaction between the (PhSe)₂ and the sensor protein Keap1, since (PhSe)₂ can react with sulfhydryl groups of Keap1. In this sense, Ebselen is also able to react with the sulfhydryl groups, by modification in cysteine residues (C151) of Keap1, triggering Nrf2-dependent signaling in HepG2 cells (Tamasi et al., 2004, Sakurai et al., 2006). Thus, (PhSe)₂ besides its direct effect as a GPx-like, it could act indirectly by induction of gene expression of Nrf2 transcription factor. In fact, our results demonstrated that (PhSe)₂

promoted rapid and significant increase at Nrf2 protein level in the nuclear fraction from macrophages, but did not decrease it in the cytosolic fraction. Since, Nrf2 is a short-living protein and its lifetime ($T_{1/2}$) in peritoneal mouse macrophages is 18.5 min (Tkachev et al., 2011, Zenkov et al., 2013), these results could be explained by increased constitutive synthesis of new Nrf2 molecules in the cell and then translocation to the nucleus.

Nrf2 transcription factor regulates the expression of other important proteins in the defense against oxidative stress (Goven et al., 2008, Ishii and Mann, 2014). In fact, $(\text{PhSe})_2$ increases GPx2, HO-1 and Prx-1 levels in macrophages only at 24 hours, being these alterations dependent of Nrf2 transcription factor. The importance of these alterations is based on the fact that HO-1 and heme degradation products can exert vasodilatory, antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and anti-apoptotic effects on vascular cells (Pae et al., 2010). Furthermore, Prx-1 is an antioxidant enzyme with anti-atherogenic properties (Hossain et al., 2013).

The total GPx activity increased in a shorter period of time (i.e., 1h), but it was not accompanied by elevated protein levels of GPx2. However, GPx1, a GPx isoform present in the cytosol and mitochondria, seems to be responsible for the increased total GPx activity, since $(\text{PhSe})_2$ increased GPx1 expression as fast as 1h. However, GPx1 expression has not been reported as a Nrf-2 target (Brigelius-Flohe and Maiorino, 2013). It has been described that GPx1 gene expression is induced by FoxO transcription factor (Transcription factors of the forkhead box, class The Family) (Klotz et al., 2015). In accordance to this hypothesis, $(\text{PhSe})_2$ also increased the expression of MnSOD (SOD2), an antioxidant enzyme present in mitochondria. The activation of MnSOD expression is also related to the FOXO transcription factor (Chen et al., 2011, Hagenbuchner and Ausserlechner, 2013).

Selenium compounds are able to modulate the phosphorylation and activation of MAPKs signaling cascade in different cell types. The treatment of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with Methylseleninic Acid (MSeA) induced the activation of p38MAPK and decreased in AKT, ERK1/2 and JNK1/2 phosphorylation (Wang et al., 2001). In addition, it was demonstrated that $(\text{PhSe})_2$ (3 μM) induced the stimulation of ERK1/2 phosphorylation without altering p38MAPK phosphorylation in human neuroblastoma cells SH-SY5Y, but concentration of 10 μM $(\text{PhSe})_2$ caused an inhibition of ERK1/2, p38MAPK and PKC phosphorylation (Posser et al., 2011). Ebselen also demonstrated to modulate cell signaling pathways in different cell

models. Indeed, (PhSe)₂ increased GGCS activity, being both of them reversed by the presence of p38, JNK and PI3K inhibitors. Together, these results indicate that (PhSe)₂ was able to activate p38-MAPK, JNK and PI3K pathway which in turn have a pivotal role in activating Nrf2 in macrophages, finally regulating the GGCS activity.

Taken together, these results suggested that (PhSe)₂ has the ability to increase the levels of antioxidant enzymes in macrophages, not only through the activation of Nrf2 transcription factor, but also through activation of other transcription factors responsible for the expression of antioxidant enzymes, such as FoxO. However, the role of FoxO, as a transcription factor important for the antioxidant system in macrophages, still needs to be investigated. Thus, these results suggest that (PhSe)₂ may induce an antioxidant response through the activation of different pathways, highlighting this compound as a possible candidate agent for further developments in the prevention of cardiovascular diseases.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

5. REFERENCES

- Bartolini D, Piroddi M, Tidei C, Giovagnoli S, Pietrella D, Manevich Y, Tew KD, Giustarini D, Rossi R, Townsend DM, Santi C, Galli F (2015) Reaction kinetics and targeting to cellular glutathione S-transferase of the glutathione peroxidase mimetic PhSeZnCl and its D,L-poly lactide microparticle formulation. *Free Radic Biol Med* 78:56-65.
- Bea F, Hudson FN, Chait A, Kavanagh TJ, Rosenfeld ME (2003) Induction of glutathione synthesis in macrophages by oxidized low-density lipoproteins is mediated by consensus antioxidant response elements. *Circ Res* 92:386-393.
- Brigelius-Flohe R, Maiorino M (2013) Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1830:3289-3303.
- Chen S, Gai J, Wang Y, Li H (2011) FoxO regulates expression of decidual protein induced by progesterone (DEPP) in human endothelial cells. *FEBS Lett* 585:1796-1800.
- de Bem AF, Farina M, Portella Rde L, Nogueira CW, Dinis TC, Laranjinha JA, Almeida LM, Rocha JB (2008) Diphenyl

- diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 201:92-100.
- de Bem AF, Fiuza B, Calcerrada P, Brito PM, Peluffo G, Dinis TC, Trujillo M, Rocha JB, Radi R, Almeida LM (2013) Protective effect of diphenyl diselenide against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: a comparison with ebselen. *Nitric Oxide* 31:20-30.
- de Bem AF, Portella Rde L, Colpo E, Duarte MM, Frediane A, Taube PS, Nogueira CW, Farina M, da Silva EL, Teixeira Rocha JB (2009) Diphenyl diselenide decreases serum levels of total cholesterol and tissue oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 105:17-23.
- Dinkova-Kostova AT (2002) Protection against cancer by plant phenylpropanoids: induction of mammalian anticarcinogenic enzymes. *Mini Rev Med Chem* 2:595-610.
- Fiuza B, Subelzu N, Calcerrada P, Stralioetto MR, Piacenza L, Cassina A, Rocha JB, Radi R, de Bem AF, Peluffo G (2015) Impact of SIN-1-derived peroxynitrite flux on endothelial cell redox homeostasis and bioenergetics: protective role of diphenyl diselenide via induction of peroxiredoxins. *Free Radic Res* 49:122-132.
- Gotoh N, Graham A, Nikl E, Darley-Usmar VM (1993) Inhibition of glutathione synthesis increases the toxicity of oxidized low-density lipoprotein to human monocytes and macrophages. *The Biochemical journal* 296 (Pt 1):151-154.
- Goven D, Boutten A, Lecon-Malas V, Marchal-Somme J, Amara N, Crestani B, Fournier M, Leseche G, Soler P, Boczkowski J, Bonay M (2008) Altered Nrf2/Keap1-Bach1 equilibrium in pulmonary emphysema. *Thorax* 63:916-924.
- Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ (2013) Mitochondria and FOXO3: breath or die. *Front Physiol* 4:147.
- Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:1685-1695.
- Hayes JD, McMahon M (2001) Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Lett* 174:103-113.
- Hissin PJ, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74:214-226.
- Hort MA, Stralioetto MR, Netto PM, da Rocha JB, de Bem AF, Ribeiro-do-Valle RM (2011) Diphenyl diselenide effectively reduces

- atherosclerotic lesions in LDLr $-/-$ mice by attenuation of oxidative stress and inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 58:91-101.
- Hossain GS, Lynn EG, Maclean KN, Zhou J, Dickhout JG, Lhotak S, Trigatti B, Capone J, Rho J, Tang D, McCulloch CA, Al-Bondokji I, Malloy MJ, Pullinger CR, Kane JP, Li Y, Shiffman D, Austin RC (2013) Deficiency of TDAG51 protects against atherosclerosis by modulating apoptosis, cholesterol efflux, and peroxiredoxin-1 expression. *J Am Heart Assoc* 2:e000134.
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB (2002) Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 277:42769-42774.
- Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM (2011) Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med* 32:234-246.
- Ishii T, Mann GE (2014) Redox status in mammalian cells and stem cells during culture in vitro: critical roles of Nrf2 and cystine transporter activity in the maintenance of redox balance. *Redox Biol* 2:786-794.
- Itoh K, Tong KI, Yamamoto M (2004) Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36:1208-1213.
- Kim SJ, Park C, Han AL, Youn MJ, Lee JH, Kim Y, Kim ES, Kim HJ, Kim JK, Lee HK, Chung SY, So H, Park R (2009) Ebselen attenuates cisplatin-induced ROS generation through Nrf2 activation in auditory cells. *Hear Res* 251:70-82.
- Klotz LO, Sanchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbanek P, Steinbrenner H, Monsalve M (2015) Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol* 6:51-72.
- Kobayashi M, Yamamoto M (2006) Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 46:113-140.
- Kockx MM (1998) Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1519-1522.
- Kurzawski M, Dzieziejko V, Urasinska E, Post M, Wojcicki M, Mietkiewski J, Drozdziak M (2012) Nuclear factor erythroid 2-like 2 (Nrf2) expression in end-stage liver disease. *Environ Toxicol Pharmacol* 34:87-95.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241.
- Mancini G, de Oliveira J, Hort MA, Moreira EL, Ribeiro-do-Valle RM, Rocha JB, de Bem AF (2014) Diphenyl diselenide differently modulates cardiovascular redox responses in young adult and middle-aged low-density lipoprotein receptor knockout hypercholesterolemic mice. *J Pharm Pharmacol* 66:387-397.
- Mitchinson MJ, Hardwick SJ, Bennett MR (1996) Cell death in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol* 7:324-329.
- Mugesh G, Panda A, Singh HB, Punekar NS, Butcher RJ (2001) Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: a mechanistic study. *J Am Chem Soc* 123:839-850.
- Nogueira CW, Rocha JB (2010) Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule. *J Braz Chem Soc*.
- Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104:6255-6285.
- Pae HO, Son Y, Kim NH, Jeong HJ, Chang KC, Chung HT (2010) Role of heme oxygenase in preserving vascular bioactive NO. *Nitric Oxide* 23:251-257.
- Paulmier C (1986) Selenium reagents and intermediates in organic synthesis. Pergamon Books.
- Posser T, de Paula MT, Franco JL, Leal RB, da Rocha JB (2011) Diphenyl diselenide induces apoptotic cell death and modulates ERK1/2 phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Arch Toxicol* 85:645-651.
- Rojo AI, Sagarra MR, Cuadrado A (2008) GSK-3beta down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem* 105:192-202.
- Rosenblat M, Aviram M (1998) Macrophage glutathione content and glutathione peroxidase activity are inversely related to cell-mediated oxidation of LDL: in vitro and in vivo studies. *Free Radic Biol Med* 24:305-317.
- Sakurai T, Kanayama M, Shibata T, Itoh K, Kobayashi A, Yamamoto M, Uchida K (2006) Ebselen, a seleno-organic antioxidant, as an electrophile. *Chem Res Toxicol* 19:1196-1204.

- Seelig GF, Meister A (1985) Glutathione biosynthesis; gamma-glutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Methods Enzymol* 113:379-390.
- Straliotto MR, Hort MA, Fiuza B, Rocha JB, Farina M, Chiabrando G, de Bem AF (2013) Diphenyl diselenide modulates oxLDL-induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling. *Biochimie* 95:1544-1551.
- Swirski FK, Nahrendorf M (2013) Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* 339:161-166.
- Tamasi V, Jeffries JM, Arteel GE, Falkner KC (2004) Ebselen augments its peroxidase activity by inducing nrf-2-dependent transcription. *Arch Biochem Biophys* 431:161-168.
- Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK (2011) Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Mosc)* 76:407-422.
- Vrba J, Gazak R, Kuzma M, Papouskova B, Vacek J, Weiszenstein M, Kren V, Ulrichova J (2013) A novel semisynthetic flavonoid 7-O-galloyltaxifolin upregulates heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells via MAPK/Nrf2 pathway. *J Med Chem* 56:856-866.
- Wang Z, Jiang C, Ganther H, Lu J (2001) Antimitogenic and proapoptotic activities of methylseleninic acid in vascular endothelial cells and associated effects on PI3K-AKT, ERK, JNK and p38 MAPK signaling. *Cancer Res* 61:7171-7178.
- Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-333.
- Zenkov NK, Menshchikova EB, Tkachev VO (2013) Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target. *Biochemistry (Mosc)* 78:19-36.
- Zipper LM, Mulcahy RT (2000) Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochemical and biophysical research communications* 278:484-492.