



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO DITELURETO DE DIFENILA E
MECANISMOS DE AÇÃO RELACIONADOS EM CÉLULAS TUMORAIS

ANDRÉ LUIZ MENDES JUCHEM

Tese de Doutorado

Porto Alegre
2021

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO DITELURETO DE DIFENILA E
MECANISMOS DE AÇÃO RELACIONADOS EM CÉLULAS TUMORAIS

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em **Genética e Biologia Molecular.**

ANDRÉ LUIZ MENDES JUCHEM

Orientador: João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre
2021

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCEIRAS

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reparação de DNA em Eucariotos do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS e orientado pelo professor João Antonio Pêgas Henriques. Parte das atividades experimentais foram desenvolvidas durante estágio sanduíche no laboratório *Biologie et Thérapeutiques du Cancer, Centre de Recherche Saint Antoine, Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale (INSERM), UPMC, Paris, França*, com supervisão do Professor Dr. Alexandre Escargueil. O estágio sanduíche foi subsidiado pelo projeto CAPES/COFECUB 04/2017, N° 922/2018 e pelo INSERM, França. O projeto foi também subsidiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

SUMÁRIO

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCEIRAS	2
SUMÁRIO.....	3
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Câncer Colorretal	12
1.2. Etiologia e Biologia Molecular	14
1.3. Tratamento	18
1.4. Terapias e Estratégias Combinatórias	21
1.5. Topoisomerase I e agentes inibidores de TOP1	23
1.6. Irinotecano.....	25
1.7. Novos Inibidores de TOP1 e compostos <i>non-camptothecin</i>	29
1.8. Compostos Organocalcogênicos, Selenados e Telurados	30
1.9. Compostos de Telúrio	31
1.10. Telurados e Aplicações Terapêuticas	34
1.11. Ditelureto de Difenila	36
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivo Geral	42
2.2. Objetivos Específicos	42

3. CAPÍTULO I	43
Diphenyl Ditelluride: Redox-Modulating and Antiproliferative Properties	43
4. CAPÍTULO II	59
<i>The anticancer action of Diphenyl Ditelluride in human colon cancer HCT116 cells: A relation with topoisomerase I inhibition and reactive oxygen species production</i>	60
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU:	5-fluorouracil
AS101:	<i>ammonium trichloro (dioxoethylene-o,o') tellurate</i>
ATM:	Cinase serina/treonina ataxia telangiectasia mutada (ataxia (telangiectasia mutated serine/trheonine kinase).
ATR:	Cinase serina/treonina ataxia telangiectasia e RAD3 relacionada (ATM (RAD3-related serine/trheonine kinase).
APC:	Adenomatous polyposis coli
BER:	Reparo por excisão de base (<i>Base Excision Repair</i>)
BRAF:	<i>proto-oncogene B-Raf</i>
CPT:	Camptotecina
DSB:	Quebras de fita dupla (<i>Double strand break</i>)
CCR:	Câncer Colorretal
ccTOP:	Complexos cliváveis de topoisomerase
Chk1:	Checkpoint de Cinase 1 (<i>Checkpoint kinase 1</i>)
Chk2:	Checkpoint de Cinase 1 (<i>Checkpoint kinase 2</i>)
Cdk1:	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
Cdk2:	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CIMP:	CpG island methylator phenotype
DCC:	<i>Deleted in Colorectal Carcinoma</i>
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
ECA:	Ensaio Cometa Alcalino
EGRF:	Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico
Endo III:	Endonuclease-III
DTDF	Ditelureto de Difenila
ETOP	Etoposídeo
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
FPG:	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase
FRC:	Fator de Replicação C
FOLFORI:	5-FU + leucovorin + irinotecano
FOLFOXIRI:	5-FU + leucovorin + oxaliplatina + irinotecano
FOLFOX:	5-FU + leucovorin + oxaliplatina

GPx:	Glutathione peroxidase
HO-1:	Heme Oxygenase-1
HR:	<i>Homologous Recombination</i>
KRAS:	<i>Kirsten ras viral oncogene</i>
MMR:	<i>mismatch repair</i>
LV:	Leucovorin
MRN:	Complexo Mre11-Rad50-Nbs1
mRNA:	RNA mensageiro
OCLF:	Oxaliplatina + irinotecano + folinato + 5-FU
OMS:	Organização Mundial da Saúde
OT:	Organotelurados
OS:	Organoselenado
SAS:	<i>Octa-O-bis-(R,R)-tartarate ditellurane</i>
TARDIS:	<i>Trapped in agarose DNA immunostaining</i>
TGF-β:	<i>Transforming growth factor-beta</i>
TOP1:	Topoisomerase I
TOP2:	Topoisomerase II
TopoBP1:	<i>Topoisomerase II Binding Protein 1</i>
PRA:	Proteína de Replicação A
VEGF:	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WNT	<i>Wingless-related integration site</i>

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é uma doença de grande impacto econômico e social, principalmente em países emergentes, ocupando a posição de terceiro lugar entre as neoplasias malignas mais frequentes no mundo, além de apresentar elevada taxa de mortalidade. Nesse cenário, os compostos organotelurados (OT) se apresentam como agentes com potencial futuro emprego na terapia antitumoral. O ditelureto de difenila (DTDF), um composto OT, induziu citotoxicidade, genotoxicidade, clastogenicidade e parada do ciclo celular em células de mamífero (V79) reportado em estudos. Esses efeitos, em parte, são devido a inibição da enzima topoisomerase I (TOP1) e indução de estresse oxidativo, os quais sugeriram a possibilidade de investigar a ação citotóxica dessa molécula em células de câncer. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do DTDF em HCT116 (CCR) em comparação a células não tumorais MRC5 (fibroblasto humano), determinando possíveis mecanismos de ação que estão envolvidos no processo citotóxico. Os resultados indicaram que as células HCT116 são mais sensíveis aos efeitos citotóxicos do DTDF quando comparadas à linhagem MRC5. Nesta direção, também ocorreu a diminuição da viabilidade celular em células HeLa expostas ao DTDF. No contexto de morte celular, foi observada a indução de apoptose nas linhagens HCT116 e HeLa expostas ao DTDF por 24 e 48 h, sendo que o processo apoptótico ocorreu de maneira dependente de caspases. Além disso, nas linhagens HCT116 e MRC5 tratadas com o DTDF ocorreu a parada no ciclo celular, expressa pelo acúmulo de células em fase G2/M em 24 e 48 h de exposição. Esses efeitos observados podem ser consequência de danos no DNA, e a avaliação pelo ensaio cometa mostrou o aumento de danos de DNA em HCT116 e MRC5 expostas ao DTDF em relação ao controle em ambas as condições de 3 e 24 h. De modo interessante, foi constatado que o aumento de quebras duplas de DNA foi induzido em HCT116 e HeLa expostas ao DTDF por 1 h, efeito que foi verificado pelo aumento da fosforilação da histona H2AX, ocorrendo principalmente em células que se encontram em fase S do ciclo celular. Uma causa possível da formação de quebras duplas é a inibição de TOP1 e/ou indução de estresse oxidativo. Tendo isso em vista, foi observado que a exposição de HCT116 e MRC5 ao DTDF levou a estabilização de complexos clicáveis de topoisomerase I

(ccTOP1), indicando efeito de inibição da enzima TOP1 do tipo poison. A exposição das células HCT116 e MRC5 ao DTDF por 3 e 24 h induziu o aumento de estresse oxidativo, verificado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os resultados apresentados nesse estudo apontam os mecanismos de ação que induzem a formação de quebras duplas de DNA induzidos pelo DTDF em células replicativas, efeito que pode ser explicado pela estabilização de ccTOP1 e indução de EROs. Como consequência destes efeitos, a diminuição de viabilidade celular e indução de processo apoptótico por via de caspases induzidos pelo DTDF afirmam o efeito antiproliferativo em células de CCR e o potencial dessa molécula de ser aplicada na terapia antitumoral.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) presents high economic and social impact, especially in emerging countries, occupying the third position among the most frequent malignant neoplasms in the world, in addition presenting a high mortality index. Organotellurium compounds (OT) stand out in this emerging scenario in the search for new anticancer compounds presenting high cytotoxicity in cancer cells. Diphenyl ditelluride (DPDT), an OT compound, presents antigenotoxic and antimutagenic activity at non cytotoxic doses, while in cytotoxic doses the antiproliferative activity was evidenced in mammalian cells (V79). In cytotoxic doses the DPDT showed effects of genotoxicity, clastogenicity and cycle arrest induction. Furthermore, inhibition of topoisomerase I (TOP1) enzyme was evidenced for the first time in *Saccharomyces cerevisiae* and by plasmid DNA relaxation assay. The aim of the study was to evaluate the cytotoxicity of this DPDT in CRC (HCT116) and human fibroblast (MRC5) cell lines, determining the mechanisms of action occurring in cellular level. Results showed that CRC HCT116 cells are more sensitive to DPDT-induced cytotoxicity when compared to the human fibroblast MRC5. Evaluated by the comet assay, the DNA damage increased in HCT116 treated with DPDT presented higher DNA damage index when compared to MRC5 in both 3 and 24 h of exposure. The DNA double strand breaks induction was evidenced by histone H2AX phosphorylation induction in HCT116 and cervical cancer cell (HeLa) exposed to DTDF at 1 h, an event that occurred mainly in replicative (S phase) cells. The exposure of HCT116 and MRC5 to DPDT induced the stabilization of TOP1-DNA cleavable complexes (TOP1cc), indicating a poison effect induced by DPDT in TOP1 enzyme. The HCT116 and MRC treated with DPDT at 3 and 24 h increase oxidative stress, evidenced by the increasing of reactive oxygen species (ROS). In addition, exposure of cells to DTDF led to cell cycle arrest, expressed by accumulation in G2/M phase in HCT116 and MRC5 at 24 and 48 h of exposure. The evaluation of apoptosis induction, when cells are exposed to DPDT, occurs the accumulation of cells in late apoptosis after 24 and 48 h of DPDT exposure. The same methodology to detect apoptosis was performed pre-incubating condition with caspase inhibitor, which inhibit the induction of apoptosis e increasing the cell viability, showing that DPDT-induced apoptosis occurs in a caspase dependent

manner. The results presented in this study points the mechanisms of action that leads the double strand breaks formation, effect that leads to TOP1cc stabilization and ROS induction. Consequently, these effects of cell viability decreased and apoptosis induction in DPDT-induced cytotoxicity process, affirm the antiproliferative effect on CCR cells and the potential of this molecule to be applied in antitumor therapy.



1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer Colorretal

O câncer é uma doença resultante de múltiplas etapas, as quais são dirigidas por alterações genéticas denominadas mutações somáticas, levando ao surgimento de células proliferativas, sendo essas mutações as responsáveis pelo início de uma neoplasia (FEARON 1995; HENRIKSON *et al.* 2015). O câncer colorretal (CCR) é o segundo tipo de câncer mais comum no Brasil no âmbito mundial ocupa o terceiro lugar em causas de mortes dentre os diversos tipos de câncer (RAWLA *et al.* 2019; GUIMARAES *et al.* 2021). Nos Estados Unidos, segundo a *American Cancer Society*, dentre as mortes causadas por câncer, CCR aparece em segundo lugar (SIEGEL *et al.* 2020). Em números absolutos, no ano de 2018 foram registrados 1,8 milhões de novos casos e 881.000 mortes foram relatadas, um contagem que representa quase 10 % dos novos casos de CCR descritos no mundo entre 185 países (BRAY *et al.* 2018). De acordo com estatísticas apresentadas pelo Estados Unidos, as taxas de óbitos apresentaram um declínio de 50 % em 2016 quando comparados com o ano de 1970 devido ao rápido desenvolvimento de métodos de diagnóstico e a melhora expressiva nos protocolos de tratamento. Entretanto essa tendência foi observada somente em países desenvolvidos (DEKKER *et al.* 2019). Ainda assim, entre os anos de 1975 e 2013 a incidência de CCR aumentou de 10 para 15 casos por 100 mil habitantes americanos entre 20 e 49 anos de idade (SIEGEL *et al.* 2017), ao mesmo tempo que em países como Brasil e Argentina foi observado um aumento de 20% na incidência e mortalidade (ARNOLD *et al.* 2017).

O prognóstico de pacientes com CCR metastáticos permanece preocupante, apresentando em média em taxas de sobrevivência de cinco anos em 18,5 % dos casos nos Estados Unidos e 27,7 % dos casos na Europa (BRAY *et al.* 2018; SUNG *et al.* 2021). No Brasil, em uma estimativa para ano de 2020 do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o CCR aparece entre o segundo tipo mais frequente para homens e o quarto tipo de maior incidência em mulheres (Tabela 1) (Fig. 1).

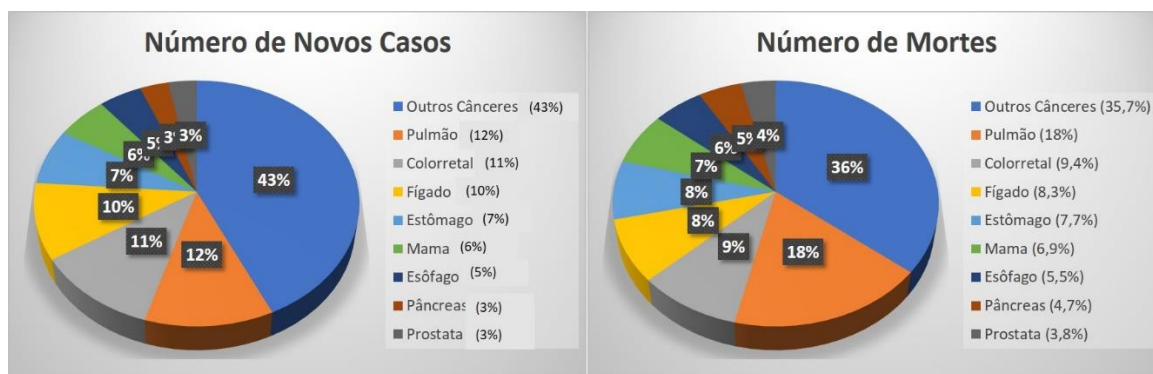


Figura 1 – Gráfico de estimativas do INCA (2020). (A) Estimativa em % do INCA para o ano de 2020 em relação ao número de novos casos de câncer no Brasil; (B) estimativa em % do INCA para o ano de 2020 em relação ao número de óbitos causados por câncer no Brasil.

Tabela 1 - Estimativa do INCA para novos casos de câncer no ano de 2020

Tipo de Neoplasia	Estimativa de Novos Casos ^a			
	Homens		Mulheres	
	Estados	Capitais	Estados	Capitais
Próstata	65.840	13.640	-	-
	*(29,2%)			
Mama	-	-	66.280	19.820
	*(29,7%)			
Colo do Útero	-	-	16.590	4.180
	*(9,2%)			
Cólon e Reto	17.760	3.180	20.470	6.620
	*(9,1%)		*(9,2 %)	

^a Tabela resumida da estimativa do INCA para novos casos de câncer no ano de 2020. São apresentados números totais de casos, segundo sexo e tipo de neoplasia seguido de incidência da população *(%) (total dos Estados).

Fonte: INCA. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>.

1.2. Etiologia e Biologia Molecular

O carcinoma colorretal é caracterizado por um crescimento anormal e descontrolado das células do cólon e do reto, provocado pelo desequilíbrio do ciclo celular (LENZ 2007). Do ponto de vista histológico o CCR pode ser classificado como carcinoma, adenocarcinoma ou sarcoma e pode ser classificado em quatro estágios: Estágio T1: o tumor é iniciado e invade a mucosa intestinal; Estágio T2: o tumor ultrapassa a mucosa e infiltra a camada muscular do cólon ou reto; Estágio T3: invasão do tumor nos linfonodos; Estágio T4: Metástase para outros órgãos e tecidos (DUKES 1932) (Fig.2).

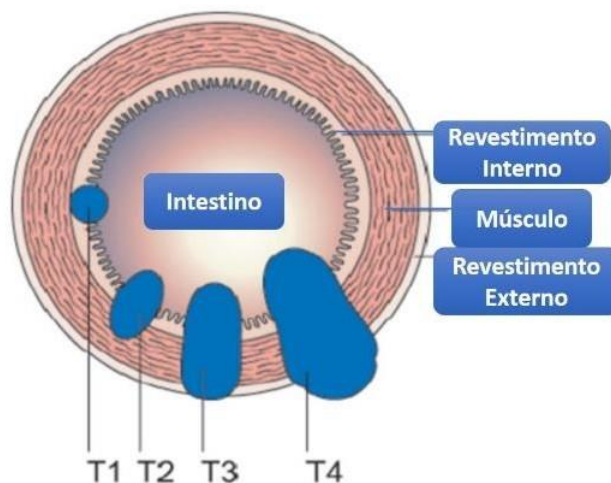


Figura 2. Desenho esquemático dos estágios do CCR proposto por Dukes (1932).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do CCR podem ser hereditários provenientes de síndromes e histórico familiar, assim como os fatores ambientais podem desempenhar papel relevante para o desenvolvimento da doença (DEKKER *et al.* 2019). O histórico familiar como causa é estimado entre 10 a 20 % dos casos de CCR entre todos os pacientes, considerando que há um risco variável, dependendo do grau de parentesco dos afetados e da idade dos pacientes diagnosticados (HENRIKSON *et al.* 2015; SCHOEN *et al.* 2015). Ainda que existam estudos de genômica que associem o CCR a genes de suscetibilidade de risco no

desenvolvimento da doença, os fatores e mecanismos envolvidos na herdabilidade que causam a doença ainda não são bem esclarecidos (JIAO *et al.* 2014).

O desenvolvimento do CCR ocorre a partir de células epiteliais, as quais acumulam diversas mutações epigenéticas, um processo que leva a vantagens seletivas (EWING *et al.* 2014). Esse processo se inicia pela formação de um pólipó que eventualmente, em um período estimado de 10 a 15 anos, evolui para CCR (DEKKER *et al.* 2019). Em uma outra interpretação, presume-se que o CCR também possa ser proveniente de células tronco ou células tronco *like* (MEDEMA 2013; NASSAR & BLANPAIN 2016). A progressão desse carcinoma colorretal tem origem em tecido normal que se modifica através de uma displasia de tecido, um processo acompanhado por alterações gênicas incluindo oncogenes, ativação e desativação de supressores tumorais e *mismatch repair* (MMR) (NAGTEGAAL *et al.* 2020). Até 80% dos CCRs provêm de um mecanismo genético chamado sequencia adenoma-carcinoma, ou sequência de instabilidade cromossômica, na qual estão envolvidos nesse processo o gene *adenomatous polyposis coli* (APC) (LEGGETT *et al.* 2001; CANCER GENOME ATLAS 2012). Os fenótipos de instabilidade cromossômica são tipicamente desenvolvidos em eventos de origem genômica, que podem ser iniciados por uma mutação em APC seguido da ativação de RAS ou perda de função de TP53 (DEKKER *et al.* 2019) (Figura 3). Outros 20 % da incidência de CCR originam-se do tipo pólipos serrilhados, uma via que envolve uma mutação no gene homólogo B1 ao oncogene viral de sarcoma murino, do inglês "*V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*" (*BRAF*) (BAUER & PAPACONSTANTINO 2008). Além disso, nessa via, as mutações em *KRAS* proporcionam a arquitetura para a progressão de carcinoma a adenoma (BAUER & PAPACONSTANTINO 2008), onde essas lesões de pólipos serrilhados podem ocorrer de mutações de vias neoplásicas independentes tanto de *KRAS* ou *BRAF* (NAGTEGAAL *et al.* 2020).

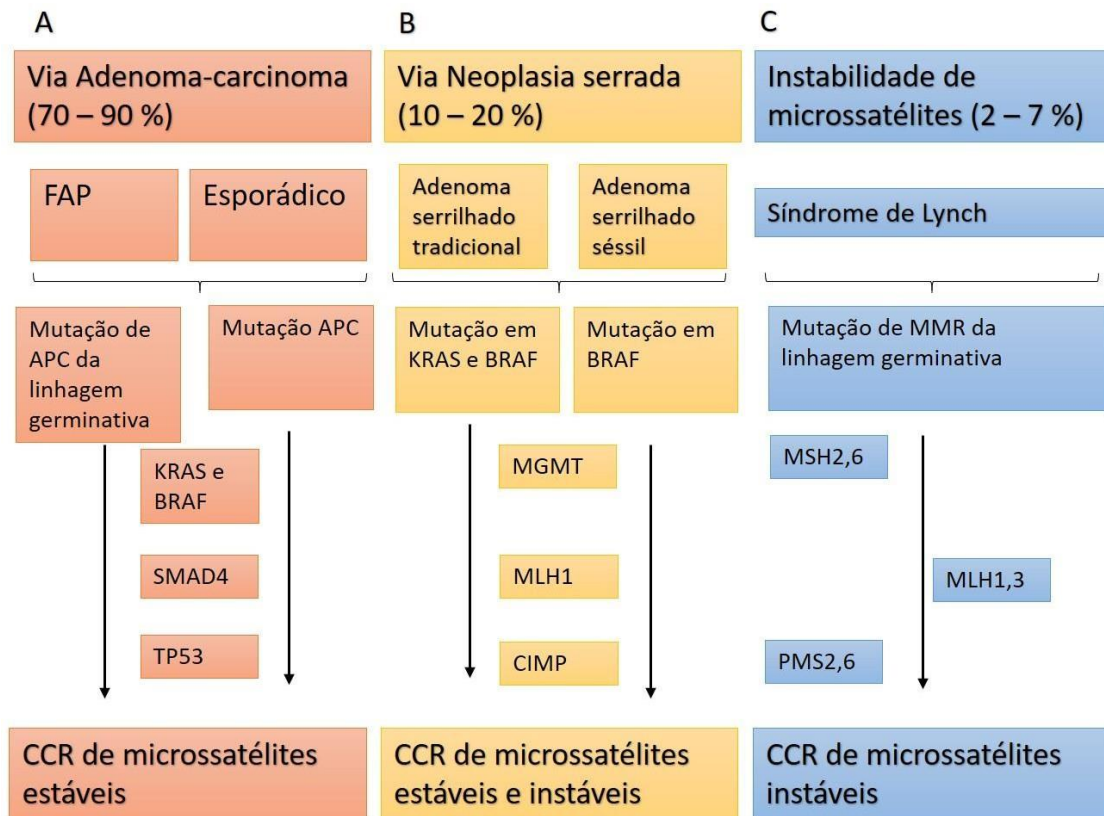


Figura 3. Modelo das vias e alterações genômicas no desenvolvimento do CCR. (A) Via neoplásica serrilhada sésil que frequentemente é iniciada por uma mutação dos genes *BRAF* ou *KRAS*, progredindo para metilação de genes supressores tumorais (fenótipo da ilha de metilação CpG [CIMP]); (B) Via em que os tumores com microsatélites estáveis e não estáveis podem ser desenvolvidos dependendo das alterações epigenéticas. (C) Via geradora de tumores de microsatélites instáveis, pouco conhecida, porém com evidências de serem um subtipo molecular distinto. FAP = *familial adenomatous polyposis*. Figura adaptada (DEKKER *et al.* 2019).

A sequência adenoma – carcinoma foi descrita por Fearon & Vogelstein, que propuseram um modelo de progressão multiestágio de CCR, no qual o evento inicial é a mutação do supressor tumoral APC, seguindo uma sequência de outras modificações genéticas e epigenéticas que induzem a formação do tumor (Fig. 4) (FEARON & VOGELSTEIN 1990). A mutação em APC por si só não resulta em carcinoma, mas prepara um cenário para uma série de alterações de danos genéticos acumulando lesões malignas e perda de heterozigose (MIYOSHI *et al.* 1992; POWELL *et al.* 1992).

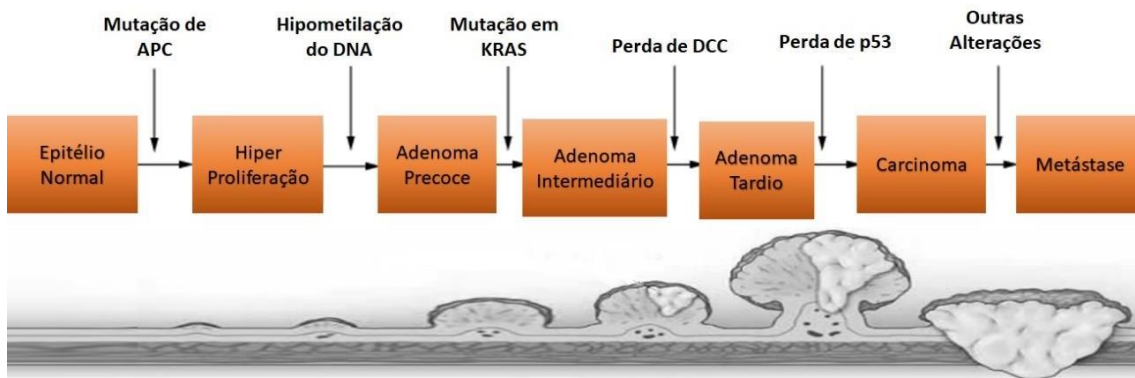


Figura 4. Sequência de eventos genéticos que levam a formação do adenoma seguido de carcinoma colorretal. Modelo proposto por Vogelstein *et al.* *DCC = Deleted in Colorectal Cancer.

Baseado na expressão gênica, em 2014 o CCR foi classificado em quatro subtipos moleculares, o *consensus molecular subtypes* (CMS) (GUINNEY *et al.* 2015). A classificação dos genes ou vias moleculares são: a via imunológica (CMS1), canônica (CMS2), metabólica (CMS3) e mesenquimal (CMS4) como representados na Tabela 2 (GUINNEY *et al.* 2015). No tipo CMS1, que possui mutação em BRAF, um gene humano responsável pela proteína B-Raf (uma proteína quinase serina/treonina) e essa mutação está envolvida na dispersão das células de câncer (SITHANANDAM *et al.* 1990). No subtipo CMS2, ocorre a ativação de Wnt e MYC; Wnt é uma via de sinalização evolutivamente conservada que regula diversos aspectos celulares quanto a migração, polaridade, padrões neuronais e organogêneses (KOMIYA & HABAS 2008); e MYC é um proto-oncogene que está implicado na patologia da maioria dos tipos de cânceres (GABAY *et al.* 2014). No subtipo CMS3A, ocorre a mutação do oncogene *KRAS*, sendo que o status de mutação em comparação às linhagens do tipo selvagem *WT* é determinante no sucesso do uso de anticorpos monoclonais (anti-EGFR) (SULLIVAN & KOZUCH 2011). No subtipo CMS4 A ocorre a ativação de TGF- β , uma via celular importante na manutenção de tecidos em particular no contexto de inflamação e tumorigênese (ITATANI *et al.* 2019).

Tabela 2 - Subtipos Moleculares do Câncer Colorretal

CMS1 Imunológico	CMS2 Canônica	CMS3 Metabólica	CMS4 Mesenquimal
14%	37%	13%	23%
Mutação em BRAF	Mutação em <i>KRAS</i>		
Ativação imunológica	Ativação em Wnt e MYC	Desregulação metabólica	Infiltração estromal, ativação de TGF- β , angiogênese
Piora na sobrevida após reincidência			Piora na sobrevivência geral

Tabela adaptada (GUINNEY *et al.* 2015).

1.3. Tratamento

A intervenção cirúrgica é o principal pilar de tratamento em pacientes acometidos por CCR, seguido de quimioterapia ou radioterapia, porém a eficácia dos métodos do é altamente relacionado a qualidade cirúrgica (VAN DE VELDE *et al.* 2014). Apesar do emergente avanço de triagens clínicas para diagnóstico precoce e diminuição da incidência de CCR em estágios avançados, quase um quarto dos diagnósticos acontecem justamente em estágios mais avançados e metastáticos. Uma parcela de 20 % desses casos de diagnóstico tardio são de metástases metacrônicas, as quais resultam em maior dificuldade de sucesso na cirurgia e como consequência o aumento de óbitos relacionados ao tumor (VAN DER STOK *et al.* 2017; SANCHEZ-GUNDIN *et al.* 2018). Nos estágios iniciais, a quimioterapia é aplicada como adjuvante no processo operatório, utilizando o 5-fluoracil (5-FU) ou capecitabina, que apresentam maior eficácia no pré-operatório, reduzindo a reincidência localizada do tumor (VAN GIJN *et al.* 2011). Em pacientes metastáticos avaliados em triagens clínicas, houve uma melhora significativa da sobrevida de pacientes nas últimas décadas, atingindo uma média global de 30 meses. A melhoria dos resultados é atribuída ao uso dos quimioterápicos oxaliplatina e irinotecano, além da abordagem de alvos terapêuticos que exploram propriedades específicas do micro ambiente tumoral, além de outras abordagens

multidisciplinares (KUIPERS *et al.* 2015). A investigação dos mecanismos que regulam e controlam o crescimento tumoral originários de células troncos é uma estratégia promissora para novos agentes que se destinam a afetar um alvo molecular específico ou a aplicação como tratamento preventivo (DE SOUSA E MELO *et al.* 2017; SHIMOKAWA *et al.* 2017). Os principais agentes aprovados no FDA e que são utilizados na terapia de CCR de pacientes com câncer metastático estão listados na Tabela 2 e classificados de acordo seu mecanismo de ação.

Tabela 3 Resumo dos principais agentes utilizados no combate ao Câncer Colo Retal metastático.

Classe de agentes	Agentes aprovados		
<i>Quimioterápicos Citotóxicos</i>	5-Fluorouracil	Inibição da enzima timidilato sintetase (TS), essencial para a replicação do DNA. Uso individual e adjuvante.	(VODENKOVA <i>et al.</i> 2020)
	Capecitabina	Agente neoadjuvante, enzimaticamente convertido a 5-FU.	(WALKO & LINDLEY 2005)
	Irinotecano <i>Camptosar®</i>	Inibidor de TOP1. É utilizado em combinação com 5-FU e oxaliplatina.	(FUJITA <i>et al.</i> 2015)
	Oxaliplatina	Forma <i>cross-links</i> no DNA, prevenindo MMS e inibindo a DNA sintetase. Utilizado em combinação com 5-FU e leucovorin.	(COMELLA <i>et al.</i> 2009)
	Leucovorin	Metabólito do ácido fólico. Aumenta a atividade do 5-FU por estabilização na ligação do metabólito com a enzima TS.	(DANENBERG <i>et al.</i> 2016)
<i>Inibidores de VEGF</i>	Bevacizumabe	Anticorpo monoclonal, previne a formação de vascularização no ambiente tumoral.	(ROSEN <i>et al.</i> 2017)
	Aflibercepte	Proteína recombinante que age como um <i>VEGF-trap</i> , ligando-se às isoformas VEGF-A e VEGF-B bloqueado a angiogênese.	(SYED & MCKEAGE 2015)
<i>Inibidor de EGFR</i>	Cetuximab	Anticorpo monoclonal quimérico IgG1 que se liga ao domínio extracelular de EGRF, bloqueia receptores de sinalização e modula o crescimento tumoral.	(JONKER <i>et al.</i> 2007)
	Panitumumab	Anticorpo monoclonal IgG2, reduz a angiogênese, induz apoptose e diminuí a produção de interleucina 8.	(WAINBERG & HECHT 2006; BRAZILIAN

		MEDICAL <i>et al.</i> 2018)
<i>Inibidor Multiquinase</i>	Regorafenibe	(WILHELM <i>et al.</i> 2011)
	Bloqueia múltiplas proteínas quinases ativas na oncogênese, angiogênese tumoral, bem como modulação do microambiente tumoral.	

1.4. Terapias e Estratégias Combinatórias

A primeira opção para tratamento em primeira linha de CCR metastático é a típica combinação de 5-FU, leucovorin e oxaliplatina (FOLFOX) ou irinotecano (FOLFORI). Nessa abordagem, o 5-FU pode ser substituído por capecitabina. No entanto, a capecitabina associada a irinotecano é considerada uma combinação com toxicidade elevada quando comparada a FOLFORI (KUIPERS *et al.* 2015). Ainda é possível utilizar a combinação 5-FU, leucovorin, oxaliplatina e irinotecano (FOLFOXIRI) que, em algumas situações específicas, podem apresentaram maior eficácia (VAN CUTSEM *et al.* 2014). Quando comparados os resultados da utilização do 5-FU como agente único, as terapias combinatórias mostram-se mais eficientes no controle do crescimento tumoral. No entanto, em pacientes idosos ou com alguma condição clínica específica de comorbidade, a combinação de 5-FU a inibidores de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) como bevacizumabe se apresentam como protocolos mais adequados (HURWITZ *et al.* 2005; NAGASAKA *et al.* 2016). A combinação oxaliplatina, irinotecano, folinato e 5-FU (OCLF) aparece em estudos de fase clínica II e III como alternativa de FOLFORI, e ainda apresenta a vantagem de que o FOLFOXIRI já possuir a associação com bevacizumabe (MASI *et al.* 2010).

Ao lado das terapias combinatórias existem os agentes que visam alvos moleculares específicos para o tratamento do CCR. As drogas cujos objetivos são determinados alvos moleculares estão divididas basicamente em três grandes grupos: anticorpos monoclonais inibidores de EGRF, anticorpos monoclonais inibidores de VEGF e as proteínas de fusão que atacam fatores de crescimento de pró-angiogênicos (KUIPERS *et al.* 2015). A super expressão do EGRF está

relacionada ao alto risco de progressão metastática e é esta a condição presente em 80 % dos casos de CCR. Os anticorpos monoclonais IgG1 específicos têm a capacidade de bloquear a tirosina quinase de EGRF ao exemplo do agente cetuximabe, assim como o panitumumabe; no entanto, a utilização desses agentes é condicionada a pacientes que não possuem mutação ativa em *KRAS*, que correspondem a 50 % de casos de CCR (KUIPERS *et al.* 2015). VEGF é um fator de crescimento fundamental em várias linhagens de câncer e em CCR metastático é um alvo terapêutico de agentes inibidores, sendo que a provável ação desses agentes é normalizar a vascularização desregulada do micro ambiente tumoral melhorando a oxigenação, por consequência e entrega dos quimioterápicos no tumor localizado (WILLETT *et al.* 2004). Nesse cenário, o bavacizumabe em combinação com 5-FU e irinotecano apresentou melhora significativa e aumento da sobrevida de pacientes acometidos por CCR metastáticos, observado em triagem clínica de fase III (PAPAMICHAEL *et al.* 2015). A sobrevivência de pacientes com CCR apresentou uma melhora significativa com o uso de bavacizumabe e inibidores de VEGF. Outrossim, com abordagens terapêuticas personalizadas, pode-se obter bons resultados na diminuição de efeitos adversos provenientes do processo quimioterápico (MATHONNET *et al.* 2014). O irinotecano, ou CPT-11, é um pró agente que é metabolizado e convertido na sua forma ativa, o SN-38, no qual é considerado de 100 a 1000 vezes mais tóxico que sua droga parental, atuando em um grande espectro antitumoral na clínica, *in vitro* e *in vivo* (KUNIMOTO *et al.* 1987; SALTZ *et al.* 2000; MATHIJSSSEN *et al.* 2001). Devido a sua complexidade das vias metabólicas e apresentar farmacocinética imprevisível, o CPT-11 pode atingir níveis de toxicidade inaceitáveis, os quais são observados em aproximadamente em um terço dos pacientes (DOUILLARD *et al.* 2000; SALTZ *et al.* 2000; FUCHS *et al.* 2003).

O CPT-11 é um inibidor de topoisomerase I (TOP1) que induz citotoxicidade, causando danos no DNA, sendo que seu metabólito ativo SN-38 induz quebras simples no DNA pela formação de complexos estáveis de TOP1 e DNA (HSIANG *et al.* 1985; ROTHENBERG 1997). As quebras simples geradas pelo SN-38, por sua vez, geram quebras duplas pelo colapso da forquilha de replicação, e desencadeando, como consequência, o processo apoptótico (HSIANG *et al.* 1989). A importância da detecção de danos ao DNA como biomarcadores de eficiência do irinotecano foi comprovada em um estudo que propôs o uso do ensaio cometa alcalino (ECA), no

qual os linfócitos de sangue periférico de pacientes acometidos por CCR foram tratados com irinotecano (WOOD *et al.* 2015). Os níveis elevados de dano no DNA induzidos pelo irinotecano e danos residuais, quantificados pelo ECA, são relacionados com o aumento de morte celular *in vitro* e melhores respostas ao tratamento *in vivo* (WOOD *et al.* 2015).

1.5. Topoisomerase I e agentes inibidores de TOP1

O DNA compactado requer modificações topológicas da dupla hélice durante a transcrição, replicação e reparação (POMMIER 2006). As topoisomerases (TOP) de DNA são enzimas vitais para a replicação e transcrição das células, resolvendo problemas de topologia que resultam na separação das fitas de DNA nesses processos (WATSON & CRICK 1953; WANG 2002). As TOP tem a habilidade de separar (ou relaxar) a fita dupla sem alterar sua composição química, formando complexos cliváveis de topoisomerase (ccTOP) essenciais para a mudança de topologia do DNA. No entanto, esse processo representa potencial ameaça à integridade genômica (BJORNSTI & KAUFMANN 2019). Por exemplo, se ocorrer a estabilização dos complexos cliváveis antes da maquinaria de reparação ou durante a segregação cromossômica, na qual a dupla hélice encontra-se separada pela TOP, podem ocorrer efeitos severos na instabilidade genômica (BJORNSTI & KAUFMANN 2019). De fato, as TOP são utilizadas como modelo para identificação de um amplo espectro de agentes antitumorais e antibióticos, que atuam estabilizando os ccTOP ou por inibição catalítica, os quais induzem dano no DNA (POMMIER 2013; CUYA *et al.* 2017). Os agentes antibacterianos e antitumorais, em muitos casos, têm como alvos seletivos as TOP bacterianas e eucarióticas respectivamente. Assim sendo, resultados de estudos apontam alta eficácia e relevância na terapia anticâncer, distúrbios imunológicos e doenças neurológicas (NITISS 2009; POMMIER *et al.* 2010). Os principais agentes antitumorais aprovados pelo FDA na terapia anticâncer que possuem as enzimas TOP como alvo terapêutico estão listados na Tabela 4 (BJORNSTI & KAUFMANN 2019).

Tabela 4 - Agentes inibidores de TOP1 aprovados para o tratamento do câncer.

Droga	Alvo	Status	Uso Clínico (Câncer)	Referência
<i>Irinotecano</i>	TOP1	Aprovado (FDA)	CCR, pancreático e pulmão.	(DE MAN <i>et al.</i> 2018)
<i>Topotecano</i>	TOP1	Aprovado (FDA)	Ovário, cervical e câncer de pulmão de pequenas células.	(RIEMSMA <i>et al.</i> 2010)
<i>MM398</i>	TOP1	Aprovado (FDA)	Câncer pancreático em combinação com 5-FU e leucovorin.	(CHIBAUDEL <i>et al.</i> 2016; WANG-GILLAM <i>et al.</i> 2016)
<i>Etoposídeo</i>	TOP2	Aprovado (FDA)	Leucemia aguda, linfoma, câncer testicular e de pulmão.	(NITISS 2009)
<i>Doxorrubicina</i>	TOP2	Aprovado (FDA)	Câncer de mama, bexiga, leucemia, linfoma e neuroblastoma.	(TEWEY <i>et al.</i> 1984; NITISS 2009)
<i>Daunorrubicina</i>	TOP2	Aprovado (FDA)	Leucemia aguda.	(TEWEY <i>et al.</i> 1984; NITISS 2009)
<i>Mitoxantrona</i>	TOP2	Aprovado (FDA)	Leucemia aguda.	(CRESPI <i>et al.</i> 1986; NITISS 2009)

São reconhecidos seis tipos de enzimas TOP humanas: TOP1, TOP1mt, TOP2 α , TOP2 β , TOP3 α e TOP3 β , e todas possuem suas funções especializadas e funções compartilhadas (POMMIER *et al.* 2016). A TOP1 cliva a fita simples para permitir o relaxamento (WANG 1971), sendo que a enzima TOP1 (isoforma A) requer uma região de fita simples para se ligar no DNA, permitindo o relaxamento das tensões de torção antes do religamento (BROWN & COZZARELLI 1981; KIRKEGAARD & WANG 1985; DIGATE & MARIANS 1988); já a topoisomerase II (TOP2) faz clivagem do DNA de fita dupla, realizando a modificação da topologia do DNA (GELLERT *et al.* 1976). O modo de ação da TOP1 envolve um processo intermediário que consiste no relaxamento da fita realizando quebras transitórias a ligação fosfodiéster em uma única fita de DNA (PADGET *et al.* 2000), sendo que a clivagem do DNA é obtida pela formação de um intermediário covalente TOP1 – DNA chamado de complexos cliváveis (AUSTIN & FISHER 1990; STIVERS *et al.* 1997).

Elevados níveis de TOP1 são detectados em tumores humanos, sugerindo um aumento de transcrição ou estabilização de mRNA, embora a amplificação genômica observada em CCR é descrita e correlacionada com o aumento de expressão de RNA / proteína (HUSAIN *et al.* 1994; YU *et al.* 2008). Os agentes irinotecano e topotecano, variantes de CPT (alcaloide derivado de *Camptotheca acuminata*), têm como alvo molecular a TOP1, enquanto drogas como etoposídeo e antraciclinas, têm como alvo TOP2 (GILBERT *et al.* 2012). Drogas como topotecano e irinotecano interagem com TOP1 induzindo a estabilização de complexos cliváveis, mecanismo chamado de efeito *poison* (POMMIER *et al.* 2010; POMMIER 2013).

1.6. Irinotecano

O irinotecano é um análogo semissintético de CPT, também referido como CPT-11 (*c-ethyl-10[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin*), o qual é ativado por hidrólise, convertendo-se para seu metabólito ativo SN-38 (*7-ethyl-10-hydroxycamptothecin*), que possui ação na TOP1. O SN-38 age bloqueando a síntese de DNA com a formação de quebras duplas, induzindo parada no ciclo celular na fase S/G2 e levando à morte celular (HSIANG *et al.* 1989). O composto CPT-11 é considerado um pró-fármaco de SN-38, convertido por hidrólise através de carboxilesterases (CES1 e CES2), o qual possui ação 100 a 1.000 vezes mais citotóxico que a molécula na sua forma nativa, sendo que a exposição a esse agente levar a resultados altamente variáveis (RIVORY & ROBERT 1995). O agente irinotecano é considerado uma chave importante no tratamento de CCR metastático e aplicado em combinação com 5-FU e oxaliplatina, ou drogas com alvo molecular como os bevacizumabe, cetuximabe e panitumimabe, registrando uma sobrevida dos pacientes superior a 30 meses (FUJITA *et al.* 2015).

Desde sua introdução na clínica, o irinotecano é utilizado para tratamento de tumores sólidos incluindo CCR, pancreático e pulmão (DE MAN *et al.* 2018). O irinotecano (predominantemente na forma de SN-38) se liga ao complexo TOP1 – DNA, formando ccTOP, estabilizando e impedindo a religação do DNA durante o processo de replicação em fase S (HSIANG *et al.* 1985; AVEMANN *et al.* 1988). Como consequência da estabilização dos ccTOP, quebras simples são formadas e convertidas em quebras duplas no DNA pela colisão da forquilha de replicação,

podendo levar a parada no ciclo celular em fase G2, caso não reparadas, levando à morte celular programada (MORRIS & GELLER 1996) (Figura 5).

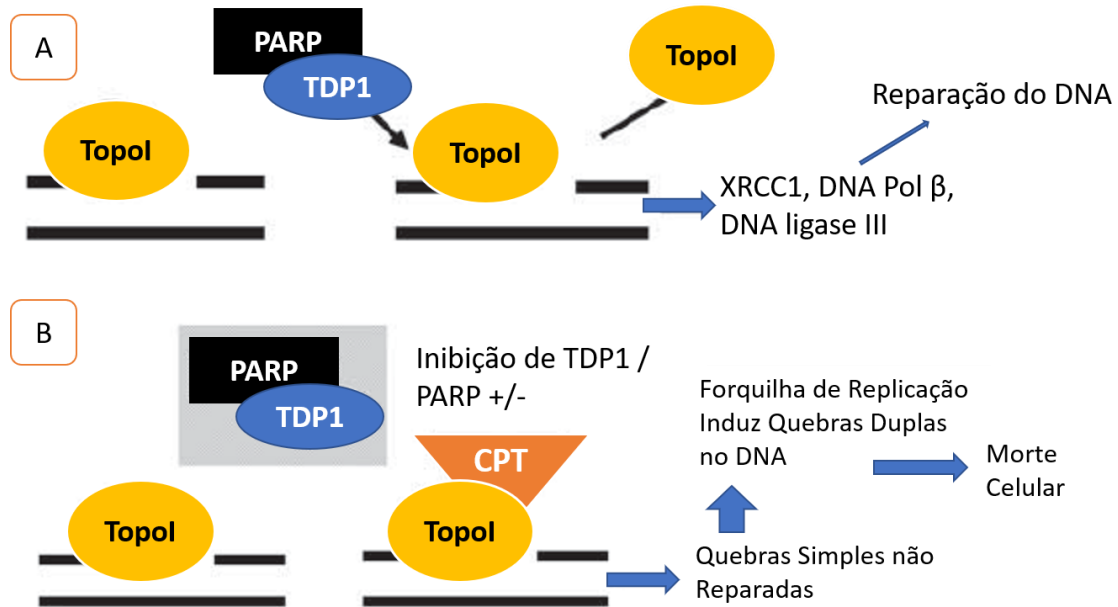


Figura 5 – Esquema do mecanismo de ação da CPT. (A) Complexos cliváveis de TOP1 são removidos por um mecanismo dependente de PARP e TDPI, com a reparação no DNA através XRCCI e DNA polimerase / ligase; (B) Camptotecina (Irinotecano via SN-38) estabiliza os complexos cliváveis, nos quais as quebras simples no DNA convergem para quebras duplas na colisão da forquilha de replicação, evento que leva à morte celular. Adaptado de Gilbert *et al* (2012).

O irinotecano é um composto hidrofílico e com de grande volume de distribuição no organismo estimado em 400 L/m² em sua condição estável (XIE *et al.* 2002). Diversos modelos populacionais que estudaram a metabolização do irinotecano assumem uma alta variabilidade na sua farmacocinética (XIE *et al.* 2002), e após ser convertido para metabólito, é estimada uma meia vida muito curta de 8 minutos de SN-38 no plasma, sendo possível identificar sua excreção na urina e fezes (KLEIN *et al.* 2002). Diversos fatores são descritos como responsáveis pela liberação do fármaco no organismo como dose, tempo de administração, atividade enzimática e contagem de hematócritos. No entanto, a massa corpórea não foi considerada um indicativo nas alterações farmacocinética, indicando que uma dose fixa como conduta de protocolo é o mais adequado (KLEIN *et al.* 2002; DE JONG *et*

al. 2004; SPARREBOOM *et al.* 2007). O SN-38 passa pelo processo de glucorinidação no fígado pela uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase (UGT), UGT1A1, para formar o metabólito inativo SN-38G, também participando nesse processo a enzima hepática UGT1A9 e a enzima extra-hepática UGT1A7 (GAGNE *et al.* 2002). Em uma segunda rota metabólica, a desativação do irinotecano é sua oxidação pelo citocromo P450 3A, pertencente a super família das enzimas P450, resultando em metabólitos nativos APC (7-ethyl-10[4-N-(5-aminopentanoicacid)-1-piperidino]carbonyloxycamptotheci) e NPC (7-thyl-10[4amino-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin) (MICHAEL *et al.* 2004; WALLACE *et al.* 2010; PAULIK *et al.* 2012).

A utilização do irinotecano é limitada devido a sua toxicidade e possui sua dose limitada devido a efeitos adversos principalmente diarreia, neutropenia e astenia (DE MAN *et al.* 2018). O irinotecano causa reação aguda pela injúria da mucosa intestinal, efeito que é amplificado pela combinação do agente com fluoropirimidinas, como o 5-FU (IKUNO *et al.* 1995). Essa lesão tóxica é produzida em partes pela exposição cumulativa do seu metabólito ativo, o SN-38, e se caracteriza pela perda do epitélio intestinal, parada no ciclo mitótico e aumento de células apoptóticas (IKUNO *et al.* 1995). Esses eventos levam a perda da capacidade de absorção do cólon do intestino, desenvolvendo, por sua vez, a diarreia induzida por quimioterapia (DIQ). A DIQ na sua forma aguda ocorre dentro de 1 a 24 h após a administração e é considerado um processo mediado em sinergia com a acetilcolina devido à sua similaridade com o irinotecano (ABIGERGES *et al.* 1995). Dentre os pacientes em monoterapia com irinotecano, 16 a 31 % experienciaram diarreia severa, e outra parcela similar apresentaram neutropenia e astenia em grau elevado (CUNNINGHAM *et al.* 1998).

Outra implicação importante da utilização do irinotecano é em paciente portadores da síndrome de Gilbert, os quais são relacionados a altos índices de toxicidade, em especial os que possuem mutação na glucuronosiltransferase UGT1A1 (TAKANO & SUGIYAMA 2017). As enzimas uridina difosfato glucuronosiltransferase (UGT) são consideradas chave em processo de glucuronidação e pertencem a superfamília de enzimas que metabolizam uma ampla gama de moléculas lipofílicas como a bilirrubinas, esteroides, toxinas e drogas que incluem o SN-38 (GUILLEMETTE 2003). Dentre as 117 enzimas da

superfamília UGT divididas em 4 subfamílias, a UGT1A é um membro localizada no cromossomo 2q37, possuindo múltiplos *exons* de codificação alternativos que incluem UGT1A1 (VAN ES *et al.* 1993; MACKENZIE *et al.* 2005; GIRARD *et al.* 2007). A conversão do SN-38 para sua forma não tóxica, o SN-38G, o qual pode ser excretado do corpo, é realizada pela UGT, e os pacientes que possuem alelos homozigotos para UGT1A1 *28/*28 são mais suscetíveis a desenvolvimento de neutropenia (DEAN 2012). A rota metabólica do irinotecano como pró-fármaco e seu processo de conversão para seu metabólito ativo (SN-38) e inativação (SN-38G) é uma reação com a intermediação de UGT1A1 (Fig. 6).

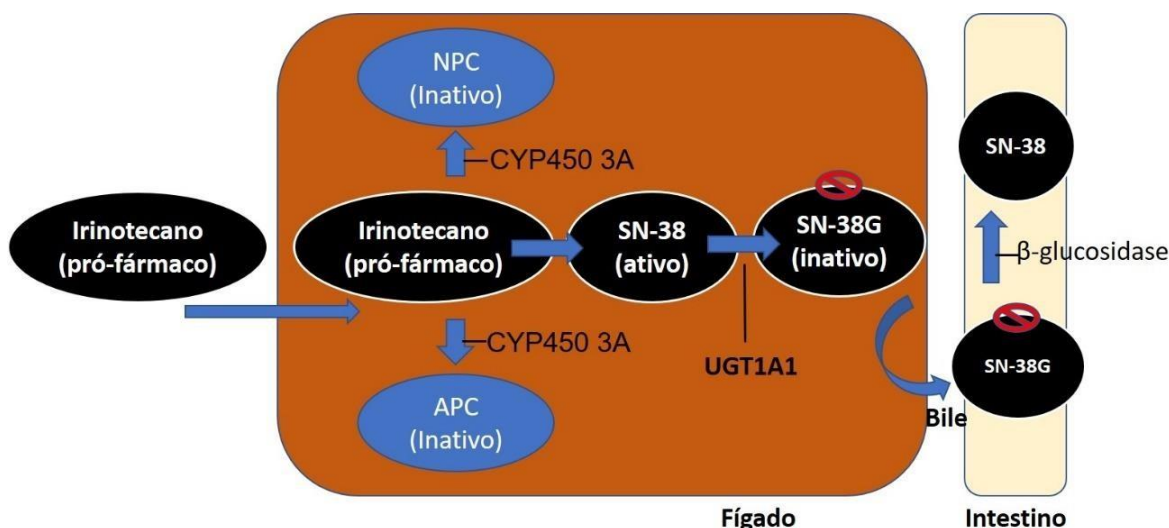


Figura 6. Rota metabólica de transporte do irinotecano. O pró-fármaco irinotecano é transportado pelas células hepáticas por fusão. Parte do irinotecano é degradado para metabólitos inativos pelo citocromo P450. A forma ativa do pro-fármaco, o SN-38 é mediado por UGT1A1 e após, é transportado para o intestino. Já no intestino, o SN-38G pode ser convertido novamente para sua forma ativa pela β-glucosidase. Adaptado de TAKANO&SUGIYAMA (2017).

A expressão de TOP1 em CCR é significativamente aumentada, corroborando que os níveis de TOP1 podem prever as respostas terapêuticas e a eficácia utilizando o agente irinotecano (BOONSONG *et al.* 2002; HORISBERGER *et al.* 2009). Nesse cenário, a necessidade de replicação do DNA neste mecanismo de citotoxicidade confere um grau de especificidade pelo tumor, sendo que tal citotoxicidade é dependente do ciclo celular, também podendo ocorrer por mecanismo de apoptose desencadeada pela inibição da atividade de TOP1 durante

a transcrição do DNA (MORRIS & GELLER 1996). Como ilustrado na Figura 5, para que ocorra a reparação no DNA induzido pelo irinotecano, é necessário a remoção do complexo TOP1 - DNA estabilizados e a resolução da quebra do DNA associada. As proteínas de reparação, por sua vez, estão envolvidas nesse processo e possuem o potencial de serem exploradas quanto à avaliação de eficácia de tratamento ou como alvos moleculares (GILBERT *et al.* 2012). Para os tipos moleculares de CCR que são causados por alteração em genes de MMR, linhagens que possuem deficiência no sistema de reparação MMR, demonstram maior sensibilidade quando expostos a irinotecano *in vitro*, sensibilidade que é revertida quando se utiliza linhagens do tipo selvagem (JACOB *et al.* 2001). O status das proteínas MMR se mostra determinante para a resposta ao dano no DNA quando há stress celular causado por DSB. Tal hipótese corrobora que a modulação de TOP1 por inibidores do tipo *poison* se tornem mais efetivas (GILBERT *et al.* 2012; FUJIMORI *et al.* 2019)

A compreensão de como as proteínas estão envolvidas na reparação de ccTOP1 são muitas vezes resultantes de estratégia experimentais que visam inibir tais proteínas e, com isso, potencializando o efeito citotóxico causado pelas quebras no DNA (GILBERT *et al.* 2012). Estas proteínas, vias moleculares e genes, constituem alvos moleculares para intervenções terapêuticas que objetivam aumentar a eficácia do irinotecano (MAKONDI *et al.* 2017). Experimentos realizados em linhagens celulares U251 (glioblastoma) e HT-29 (CCR) demonstram o efeito potencializado de CPT-11 quando utilizados em combinação com inibidores de PARP, elevando os níveis de dano no DNA e levando à parada no ciclo celular em G2/M (MIKNYOCZKI *et al.* 2003). A utilização do olaparib (AstraZeneca, Londres – RU), um inibidor de PARP, em pacientes com CCR já é registrada em estudos clínicos de fase I, nos quais a combinação com CPT-11 se mostrou mais eficiente, sendo necessário a redução da dose de ambos os agentes (CHEN *et al.* 2016).

1.7. Novos Inibidores de TOP1 e compostos *non-camptothecin*

Novos inibidores de TOP1 são investigados atualmente, em um cenário onde topotecano e irinotecano são os principais agentes aprovados pelo FDA contra CCR, derivados de CPT e não derivados de CPT (*non-camptothecin*) (MARZI *et al.* 2018). O CPT-11 é amplamente prescrito para CCR e topotecano para câncer

de ovário, cervical e câncer de pulmão de pequenas células (LIVERTOX 2012). Como alternativa de inibidores TOP1, o irinotecano nanolipossomal chamado de MM398 foi aprovado pelo FDA em combinação com o 5-FU e leucovorin para terapia de câncer pancreático em linhagens resistentes à gemcitabina (CHIBAUDEL *et al.* 2016; WANG-GILLAM *et al.* 2016). Em contraste, as variantes de irinotecano *NKTR-102* e *PEGylated* não se mostraram promissoras quando testados contra câncer de ovário e mama em estudos clínicos de fase II e III (PEREZ *et al.* 2015; RUSTIN *et al.* 2017). Os resultados divergentes entre os novos compostos investigados podem refletir diversos fatores, tais como farmacocinética dos compostos, acúmulo intratumoral ou simplesmente não ser eficaz para determinados tumores (BJORNSTI & KAUFMANN 2019).

1.8. Compostos Organocalcogênicos, Selenados e Telurados

Os organocalcogênicos (OC) são compostos orgânicos que possuem em sua formulação um calcogênio como elemento principal, geralmente selênio (Se) ou telúrio (Te), e no contexto biológico são explorados quanto ao seu potencial terapêutico em doenças por apresentarem ação antioxidante e citotóxica (ORIAN & TOPPO 2014; TRINDADE *et al.* 2019). O Te ocorre em forma de compostos orgânicos e inorgânicos, assim como o Se, e algumas dessas diferentes formas foram exploradas quanto aos seus efeitos biológicos específicos (CUNHA *et al.* 2009). Inicialmente os compostos de selênio, nas formas orgânica e inorgânica, foram incorporados na pesquisa quanto às suas atividades biológicas devido ao fato do Se ser um elemento que cumpre uma função importante na saúde e nas doenças, além de compor as selenoproteínas (LOBANOV *et al.* 2009). Os compostos orgânicos de selênio, ou organoselenados (OS), ou selenetos (forma não orgânica), são explorados quanto à sua propriedade anticâncer, especialmente por induzirem espécies reativas de oxigênio (ROS) e potencial de modulação redox (ORIAN & TOPPO 2014; FERNANDES & GANDIN 2015).

O Ebselen é sem dúvidas o OS de maior destaque, o qual, inicialmente, foi amplamente explorado em estudos quanto às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidante (LASSER & WEISS 1924), e mais recentemente mostrou-se efetivo na redução de crescimento celular em câncer de mama, cólon e hepatocarcinoma (ENGMAN *et al.* 1997; YANG *et al.* 2000; ZHAO *et al.* 2006). O seleneto, uma forma

inorgânica do selênio, mostrou diminuir a viabilidade celular em células de leucemia K562 e induzir estabilização de ccTOP de TOP1 e TOP2 detectadas pelo ensaio de imunofluorescência TARDIS (*trapped in agarose DNA immunostaining*) (LOPEZ-LAZARO *et al.* 2008). Já os compostos OT, e telurados não orgânicos, são explorados pelas mesmas propriedades e efeitos biológicos dos seu análogo OS. Ainda que apareçam em menor número de publicações, esses compostos se mostram importantes agentes com potencial citotóxico em células de câncer, antioxidantes e imunomoduladores (SREDNI 2012; TRINDADE *et al.* 2015; TRINDADE *et al.* 2019). O composto sintético AS101 (*trichloro(dioxoethylene-O,O')tellurate*) é o telurado que mais avançou em pesquisas, mostrando ser um potente imunomodulador (*in vitro* e *in vivo*), sendo implementado em fase I e II de estudos clínicos (SREDNI *et al.* 1995; SREDNI *et al.* 1996).

Há mais de duas décadas, os compostos selenados e telurados são explorados como compostos anticâncer: os selenados pela associação preventiva na dieta com Se, sendo Se um micronutriente, e os telurados posteriormente inspirados nos resultados com os compostos de Se (KELLOFF *et al.* 2000; SREDNI 2012). A indução de citotoxicidade e mecanismos de ação como parada no ciclo celular, stress oxidativo, indução de danos no DNA, formações de quebras duplas no DNA e interferência nos mecanismos de reparação pela interação com as enzimas TOP são propriedades que tornam esses compostos atrativos para serem aplicados em diversas linhagens de câncer (ZHOU *et al.* 2003; CHASTEEN *et al.* 2009; SREDNI 2012; JORGE *et al.* 2015; TRINDADE *et al.* 2015; TRINDADE *et al.* 2019).

1.9. Compostos de Telúrio

A descoberta do telúrio ocorreu no ano de 1782 por Franz J. Müller na Transilvânia ao explorar minério de ouro, onde posteriormente o elemento foi isolado e descrito pelo químico alemão Martin Heinrich Klaproth (WEEKS 1935). O telúrio é um semimetal, ou metaloide, que foi nomeado com a palavra em latim que significa terra (*tellus*), pertencente ao grupo 16, grupo dos calcogênios, na tabela periódica, no qual também são incluídos o oxigênio, enxofre e selênio (WEEKS 1957; FISCHER 2001; CHASTEEN *et al.* 2009). O elemento Te na sua forma nativa encontra-se em minérios de ouro e cobre e também em membros da família *Aliaceae*, o qual o alho é representante mais popular (LARNER 1995). Alguns estudos detectaram

pequenas quantidades de Te em fluidos corporais como urina e sangue, também presente em proteínas de bactérias, leveduras e outros fungos (ENGEL & YOUNG 1978). Até o momento, não existem registros de sua descoberta em nenhuma proteína em células de metazoários, portanto ainda não é conhecida a ação fisiológica em mamíferos (TAYLOR 1996; REZANKA & SIGLER 2008). Assim como os compostos de selênio, os Te são amplamente utilizados na síntese orgânica para se obter intermediários de utilidade (PETRAGNANI 1991).

As primeiras interações biológicas com compostos de telúrio na sua forma inorgânica foi a detecção do odor no hálito de animais expostos, especificamente odores semelhantes a alho observados em cachorros e humanos expostos a telureto (TeO_3^{2-}) (GMELIN 1824). Anos mais tarde, em 1884, Reisert repetiu o experimento ingerindo ele mesmo telúrio na sua forma TeO_2 em doses de 6 μg , o que produziu hálito semelhante a alho, efeito que durou 30 h (REISERT 1884). Em termos de toxicologia, o telúrio se mostrou tóxico para humanos em suas aplicações na indústria; assim, a exposição ocupacional é um problema a ser considerado (TAYLOR 1996). Além disso, a alta toxicidade de Se e Te causam problemas ambientais ao serem descartados em solo e água devido à formação de hidróxidos e complexos de Se e Te (HARADA 2008).

Em estudos de fisiologia e toxicologia (1901) de compostos telurados, Mead & Giles identificaram pelo hálito que mamíferos foram expostos acidentalmente à poeira de TeO_2 sintetizado e, como consequência, esses animais apresentaram quadros de um longo período de depressão (MEAD & GIESM 1901). Mais tarde, em 1939 o composto dimetil telureto de fórmula $(\text{CH}_3)_2\text{Te}$ foi identificado por Bird & Challenger (BIRD & CHALLENGER 1938). Na primeira metade do século XX foi realizada a avaliação sistemática da toxicologia de telurados, quando se chegou a conclusão de que formas mais simples como TeO_3^{2-} são mais tóxicas para os organismo em comparação com a forma TeO_4^{2-} (FLEMING 1932). O telureto de amônio-prata e telureto de iodo-potássio foram avaliados com atividade antibacteriana semelhante a nitrato de prata (MUNN & HOPKINS 1925); ao mesmo tempo, descobriu-se que injeções intramusculares de glicose com Te^0 em suspensão auxiliavam no tratamento de sífilis, com o efeito adverso de hálito intenso e urina com odores de alho em pacientes submetidos a esse tratamento (FRAZER 1930). Em 1945, Frederic Challenger, em uma publicação sobre

metilações biológicas com foco em arsênio, Se e Te, entre outros, propôs um modelo para metilação do Se e Te (CHALLENGER 1945). No mesmo modelo de redução sequencial do Se, ele propôs a redução de Te, iniciando em H_2TeO_3 produzindo CH_3TeCH_3 (Figura 7).

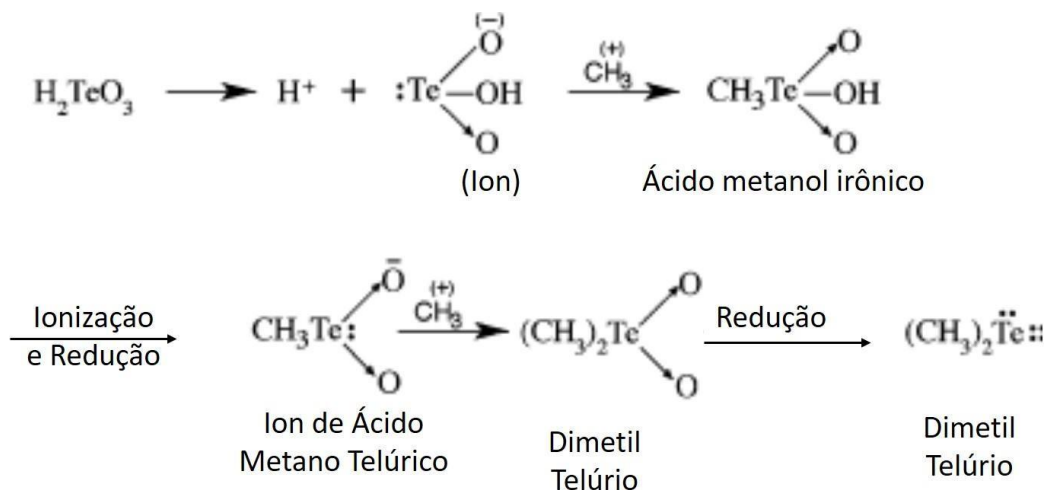


Figura 7 – Modelo de redução e metilação do telúrio proposto por Challenger (1945).

Os compostos de Se e Te são considerados “compostos de Janus” – em alusão ao deus romano das duas faces, do bem e do mal – devido ao seu comportamento contrastante e diferente ação tóxica ou protetiva dependendo da concentração utilizada: em doses não citotóxicas, essas moléculas apresentam efeitos benéficos; entretanto, em doses citotóxicas, apresentam elevada toxicidade e possivelmente atividade carcinogênica (BROZMANOVA *et al.* 2010; NOGUEIRA & ROCHA 2011). Os efeitos biológicos de maior relevância do Te no âmbito celular são (i) alteração na integridade de estruturas da membrana, (ii) mudança no metabolismo da glutathione e (iii) stress oxidativo (KIM *et al.* 2012; VALDIVIA-GONZALEZ *et al.* 2012). Uma característica em comum entre metaloides, como Te, é sua afinidade química por proteínas, tióis não proteicos e sua capacidade de gerar stress oxidativo pela reação de *Fenton* (KELL 2010; RUBINO 2015). Os telurados e selenados, TeO_3^{2-} e SeO_3^{2-} , interferem nas enzimas tioredoxina redutase e glutathione redutase e seu processo de redução é a glutathione que participa da redução de TeO_3^{2-} para Te (Te^0), acompanhado da formação de espécies reativas de oxigênio (TURNER *et al.* 2001; KESSI & HANSELMANN 2004).

A literatura mostra que muitas enzimas podem ser afetadas por compostos de Te em animais. Experimentos realizados em ratos e camundongos, após a ingestão de TeO_3^{2-} , resultaram em nervos periféricos desmielinizados devido ao efeito de inibição esqualeno-epoxidase, uma enzima vinculada ao sistema citocromo p450 (ABE *et al.* 2007). Em um outro estudo publicado anteriormente, a avaliação da ingestão de Te em ratos mostrou a diminuição dos níveis de colesterol causado pela inibição da enzima esqualeno-epoxidase, que em consequência leva desestabilização de produção de mielina (WAGNER-RECIO *et al.* 1991). Outra interferência enzimática de notável relevância é com a enzima selenada tiorredoxina redutase (TrxR), devido a interação Te – Se, a qual possui sua atividade modificada devido a interação com Te, tendo como consequência efeito citotóxico (MCNAUGHTON *et al.* 2004). Em termos de mecanismo de ação, ambos Te e Se, quimicamente muito semelhantes, compartilham efeitos como enfraquecimento de sistemas antioxidantes no âmbito celular e geração de espécies reativas de oxigênio (VAVROVA *et al.* 2021).

1.10. Telurados e Aplicações Terapêuticas

A ideia de explorar o potencial terapêutico dos composto telurados já se estende por décadas e ainda é limitada em comparação aos selenados, embora o interesse por novos compostos de Te como agente anticâncer seja emergente devido ao potencial imunomodulador (SREDNI 2012). O uso e estudo de compostos OT é constantemente emergente na comunidade científica e estes compostos foram também considerados promissores e alternativas vantajosas para várias aplicações no passado recente (PETRAGNANI & COMASSETO 1991a; PETRAGNANI & COMASSETO 1991b). Desde então, os estudos com moléculas teluradas vêm crescendo no âmbito de avaliar suas atividades biológicas, ainda que em número expressivamente inferior aos selenados, além de que os compostos de telúrio são considerados de difícil manuseio e apresentam alta fotossensibilidade (COMASSETO 2010). Nesse sentido, uma variedade de compostos selenados e telurados se mostraram promissores com ação antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora, anti-hipertensiva, imunomoduladora e inibições enzimáticas (SORIANO-GARCIA 2004; BROZMANOVA *et al.* 2010; NAZIROGLU *et al.* 2012; RAYMAN 2012; REES *et al.* 2013). Apesar do menor número de estudos em comparação aos selenados, os

compostos telurados vem sendo avaliados quanto à sua toxicologia, seja baseada na inibição de crescimento celular e toxicidade observada em animais, ou ao potencial genotóxico e mutagênico em diferentes modelos de estudo *in vitro* (SAILER *et al.* 2004; CUNHA *et al.* 2005; SCHIAR *et al.* 2009; DEGRANDI *et al.* 2010).

Na exploração do potencial antiproliferativo de selenados e telurados, em células de cisto adenocarcinoma de ovário, observou-se que compostos telurados foram capazes de reduzir o crescimento tumoral, bem como baixas doses de seleneto e telureto são capazes de aumentar a expressão de TrxR mitocondrial em linhagens que são sensíveis a cisplatina (RIGOBELLO *et al.* 2009). O ditelureto de 3,3'-diaminodifenila e o ditelureto de 4,4'-diisopropildifenila induziram a morte celular por apoptose em células de leucemia promielocítica humana (linhagem HL-60) (SAILER *et al.* 2003). Também, em HL-60, o ditelureto de 2,2'-dimetoxidifenila e ditelureto de 2,2'-diamino-3,3',5,5'-tetrametildifenila, observou-se citotoxicidade induzida por apoptose (SAILER *et al.* 2004). Na avaliação de outros diteluretos diarílicos, mostrou-se que eles são capazes de induzir apoptose através de alterações no ciclo celular de HL-60 (SAILER *et al.* 2004). Alguns compostos orgânicos contendo telúrio são eficientes inibidores seletivos da atividade cisteína protease da catepsina B, tornando-os candidatos para agentes com atividade antimetastática (SAILER *et al.* 2004; RIGOBELLO *et al.* 2009).

O telurado AS101, que se mostrou um potente imunomodulador, foi explorado quando a diversas propriedades biológicas como efeito protetivo em modelos de (i) camundongos infectados por vírus (ROSENBLATT-BIN *et al.* 1998), doença autoimune (lúpus) (KALECHMAN *et al.* 1997) e doenças no fígado (KALECHMAN *et al.* 2004). As aplicabilidades do AS101 se devem ao fato de possuir a habilidade de inibir a interleucina 10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória conhecida por inibir citocinas humanas e produzida por macrófagos, células T, células B e incluindo alguns tipos tumorais (CONTI *et al.* 2003; KALECHMAN *et al.* 2004). Em um estudo onde o AS101 foi administrado em combinação com taxol, observou-se o efeito sinérgico na redução de adenocarcinoma pulmonar em modelos murinos (KALECHMAN *et al.* 1996). Em camundongos com linfoma cutâneo de células T observou-se que o composto AS101 apresentou atividade antitumoral por induzir parada no ciclo celular nas células T em fase G2/M, indução de apoptose por ativação das caspases 3 e 9, efeitos atribuídos à alta geração de espécies

reativas provocadas por esta molécula (XU *et al.* 1996; HAYUN *et al.* 2006; NAOR *et al.* 2013).

Em ensaios clínicos de fase I, pacientes com câncer metastático avançado e resistentes a quimioterapia que receberem tratamento com AS101 mostraram aumento da produção e secreção de citosinas, levando a um aumento de células *T Helper 1* (TH1) e diminuição de células *T Helper 2* (TH2), com efeito final de toxicidade adversa mínima (SREDNI *et al.* 1996). Ao avançar para estudo de fase clínica II, os resultados da utilização do AS101 em terapia combinatória, em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas, mostrou uma significativa redução de efeitos adversos como neutropenia, alopecia e trombocitopenia (baixo nível de plaquetas), sem apresentar outros efeitos tóxicos significativos (SREDNI *et al.* 1995).

1.11. Ditelureto de Difenila

O ditelureto de difenila (DTDF), um composto OT de fórmula Ph_2Te_2 (Figura 8) e sintetizado pela primeira vez em 1894 (KRAFFT 1894; ZEISER 1895; LEDERER 1915), é um composto sólido e considerado um importante intermediário em reações de síntese orgânica (CUNHA *et al.* 2009).

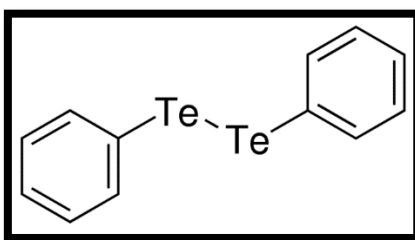


Figura 8. Estrutura química do ditelureto de difenila. Fórmula linear: $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Te}_2$. Número CAS: 32294-60-3. Fonte: (SIGMA-ALDRICH 2021).

O DTDF é um análogo ao disseleneto de difenila e por essa razão estudos levam em consideração sua atividade mimética a enzima glutathione peroxidase (GPx), além de seu potencial antioxidante (ORIAN & TOPPO 2014). O efeito mimético a GPx foi avaliado *in vitro* com diferentes tióis e, diferentemente dos compostos selenados, análogos aos telurados, essas reações são associadas a mudanças

reversíveis no estado de oxidação dos compostos organocalcogênicos (IBRAHIM *et al.* 2012). Estudos foram conduzidos devido às suas propriedades toxicológicas e mecanismos biológicos envolvidos (CUNHA *et al.* 2009; HASSAN *et al.* 2009), sendo que, em concentrações mais elevadas, o DTDF apresenta efeitos de citotoxicidade e a capacidade de oxidar grupamentos tiólicos, afetando uma série de proteínas fundamentais δ -ALA-D e $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (BORGES *et al.* 2005; SOUZA *et al.* 2010).

No que diz respeito a genotoxicidade da molécula, o DTDF apresentou efeito genotóxico e clastogênico em diversos modelos biológicos. Em *Salmonella typhimurium*, a exposição ao DTDF induziu deslocamento de quadro de leitura; em *Saccharomyces cerevisiae*, linhagens deficientes na reparação por excisão de bases (BER) e na reparação por recombinação homologa (HR) mostraram elevada sensibilidade na exposição ao DTDF além da diminuição dos níveis de glutathione (DEGRANDI *et al.* 2010). Em células de fibroblasto de hamster chinês (V79), a exposição ao DTDF apresentou elevado efeito citotóxico pelo aumento dos níveis de peroxidação lipídica e diminuição dos níveis de glutathione, um efeito pro-oxidante. Ainda em células V79, a exposição à essa molécula induziu a formação quebras no DNA detectado pelo ensaio cometa alcalino (ECA), além de produzir quebras originárias de danos oxidativos detectados pelas enzimas de restrição aplicadas ao ECA: endonuclease-III (Endo III) e formamidopirimidinea-DNA glicosilase (FPG), as quais reparam danos oxidativos em pirimidinas e purinas, respectivamente (DEGRANDI *et al.* 2010).

Em outro estudo realizado com células V79, o DTDF induziu citotoxicidade em doses acima de 1 μM avaliados pelo método de MTT, além de induzir parada no ciclo celular em fase S detectada por citometria de fluxo (JORGE *et al.* 2015). No mesmo trabalho, após expor as células V79 ao DTDF, foi confirmada a indução de apoptose nas mesmas doses, sendo detectada por análise da morfologia celular e atividade de caspases 3/7. No ensaio de relaxamento de DNA plasmidial, ao incubar DNA com DTDF na presença da enzima TOP1, foi possível detectar a inibição de TOP1 pela presença do DTDF. Além disso, no experimento realizado em leveduras deficientes para TOP1, foi possível observar significativa resistência dessa linhagem à exposição ao DTDF quando comparado com a linhagem do tipo selvagem, sugerindo que TOP1 pode estar envolvida no processo de citotoxicidade da molécula (JORGE *et al.* 2015).

Nosso grupo de pesquisa avaliou efeitos semelhantes a outros compostos telurados, e o DTDF apresentou uma faixa de concentração tóxica (acima de 1 μM) ao mesmo tempo que doses abaixo de 0,5 μM não apresentaram citotoxicidade ou indução de danos no DNA avaliados em células V79 (TRINDADE *et al.* 2015). Com isso, a exposição em doses baixas em V79 levou a efeitos protetivos contra a genotoxicidade e clastogenicidade como *t*-BOOH, H_2O_2 , MMS e luz UVC. A incubação de V79 em baixas doses de DTDF, antes da exposição aos agentes mutagênicos, mostrou ser eficaz na redução do índice de dano avaliado pelo ECA e na diminuição da frequência de micronúcleos. Ainda, utilizando o ECA modificado com as enzimas EndoIII e Fpg, o DTDF foi capaz de diminuir o índice de danos originados por stress oxidativo causado pelo mutágenos *t*-BOOH e H_2O_2 (TRINDADE *et al.* 2015). A condição de composto com potencial pró-oxidante e antioxidante expande as possibilidades da utilização desse agente, explorando seus mecanismos citotóxico e quimiopreventivos.

Outros estudos abordam as propriedades quimiopreventivas do DTDF, como a utilização desse agente em modelos murinos. A utilização do DTDF em 1,63 μM em ratos levou à inibição de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) em 50 %, efeito induzido por e nitropussiato de sódio (ROSSATO *et al.* 2002). Em outro estudo realizado em camundongos machos, a injeção subcutânea de DPDT a 150 $\mu\text{M}/\text{kg}$ levou ao efeito protetivo contra a neurotoxicidade induzida pela 4-Aminopirimidina diminuindo os níveis de TBARS no cérebro (BRITO *et al.* 2009). Em ratos machos *Wistar* (200-250 g), o DTDF em baixas concentrações (1-4 μM) elevou a atividade da bomba de sódio potássio (Na^+ , K^+ -ATPase) avaliado em tecido cerebral (BORGES *et al.* 2005). Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que, ao realizar a pré-exposição com DTDF, em uma faixa de concentração de 0,01 a 0,1 μM , em células V79, XPD e MCR5 induziram efeito protetivo contra doxorubicina (DOX), diminuindo o índice de dano no DNA avaliado pelo ECA e reduzindo os níveis de espécies reativas de oxigênio, ambos induzindo por DOX (TRINDADE *et al.* 2019).

Em um estudo de toxicidade hepática, os valores de DL₅₀ foram de $\mu\text{M}/\text{kg}$ em ratos e $150 \mu\text{M}/\text{kg}$ em camundongos (*Swiss*) (MEOTTI *et al.* 2003). Em análises de sangue os três compostos utilizados no estudo, disseleneto de difenila, ebselen e DTDF inibiram a atividade de δ -ALA-D e o DTDF apresentou evidências de toxicidade renal e hepática.

Estudos de teratogênese foram realizados em ratos *Wistar* (170-250 g) e sua prole, nos quais o DTDF foi aplicado em injeção subcutânea a uma dose de $0,12 \text{ mg}/\text{kg}$ e a pureza do DTDF (sintetizado em laboratório) foi declarada em 99,9 % (STANGHERLIN *et al.* 2005). Os efeitos teratogênicos foram diversos, incluindo morte da prole e diminuição do peso corporal e de órgãos como cérebro e rins. Em outro estudo, as ratas foram expostas ao DTDF no período de amamentação da prole a $0,03 \text{ mg}/\text{kg}$ em um período de 14 dias. Não se observou alteração ou indução de toxicidade materna nesse período. No entanto, a observação de um período de 30 dias demonstrou mudanças no comportamento da prole relacionado a neurotoxicidade do DTDF (STANGHERLIN *et al.* 2006). A avaliação de stress oxidativo no cérebro da prole dos ratos mostrou que o DTDF induz o aumento de níveis de peroxidação lipídica, inibiu atividade de δ -ALA-D, catalase e SOD do hipocampo e campo estriado do cérebro dos ratos (STANGHERLIN *et al.* 2009).

A toxicidade do DTDF foi investigada em diversos tecidos e órgãos em modelos *in vivo* como ratos e camundongos (TRINDADE *et al.* 2019). Anteriormente, e até os estudos presentes, o composto DTDF utilizado em muitos dos estudos nos modelos *in vivo* ou *in vitro* são sintetizados em laboratório de pesquisa, com métodos descritos por diversos autores (PAUMIER & BALDWIN 1986; ENGMAN & HALLBERG 1989; PETRAGNANI 2007). Os diversos dados que indicam letalidade aguda à exposição de um novo composto são um indicador simples e generalizado, um requisito vital para composição de dossiês e datasheet (MORRIS-SCHAFFER & MCCOY 2020).

Anteriormente, outros estudos já realizaram a exposição de células de CCR em linhagens HT-29 e Caco-2, nos quais foi possível observar um decréscimo da viabilidade celular em ambas as linhagens em uma faixa de concentração significativamente mais alta comparado aos demais estudos, de $62,5$ a $1000 \mu\text{M}$. No mesmo estudo, foi detectada a indução de apoptose através do aumento da

atividade de caspases 3/7 e 9 após exposição do DTDF (500-1000 μ M) em células HT-29, além de diminuir os índices de GSH/GSSH (VIJ & HARDEJ 2012).

Os efeitos do DTDF apresentados em publicações anteriores sugerem uma gama de possibilidades da atuação desse composto em células de câncer. Nesse sentido, a determinação de doses citotóxicas e a compreensão dos mecanismos de ação desse composto na ação antiproliferativa é fundamental. No capítulo I do presente trabalho, apresentamos uma revisão científica com novos dados de citotoxicidade e efeitos no ciclo celular ao expor células ao DTDF; o capítulo 2 é um artigo de dados que elucida os principais mecanismos de ação do DTDF na citotoxicidade e genotoxicidade induzidas por esse composto.



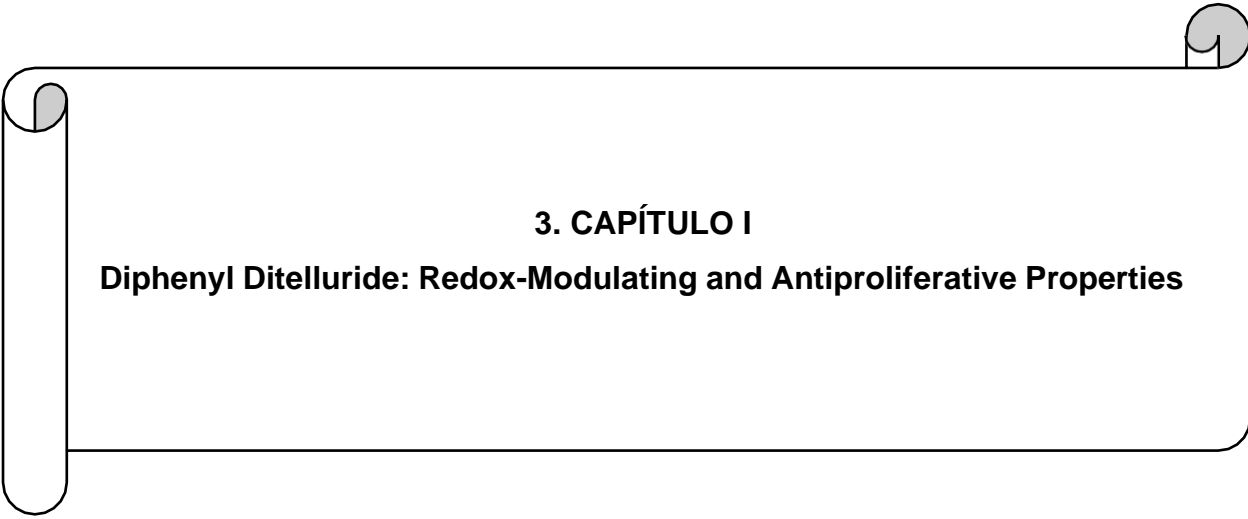
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral dessa tese foi avaliar os mecanismos de ação induzidos em células de câncer colorretal e fibroblasto humano quando expostas ao agente organotelurado ditelureto de difenila.

2.2. Objetivos Específicos





- Avaliar a viabilidade celular e sobrevivência celular em células HCT116 e MRC5 expostas ao DTDF.
- Investigar a ocorrência de danos no DNA induzidos pelo DTDF em células HCT116 e MRC5.
- Avaliar a sinalização de quebras duplas de DNA em células HCT116 e HeLa expostas ao DTDF, verificando a incidência desse efeito em fase S do ciclo celular.
- Determinar a ocorrência da inibição da enzima topoisomerase I em células HCT116 e HCT116 expostas ao DTDF.
- Verificar indução do acúmulo de espécies reativas de oxigênio em células HCT116 e MRC5 tratadas com DTDF.
- Investigar a alteração no perfil do ciclo celular em células HCT116 e MRC5 expostas ao DTDF.
- Avaliar a indução de apoptose (e participação de caspases) em células HCT116 e HeLa tratadas com DTDF.
- Adicionalmente, avaliar a sobrevivência e alteração no ciclo celular em células de glioma (U251, C6 e U87) expostas ao DTDF.
- Investigar a ação protetiva do DTDF em células V79, MRC5 e XPD em combinação com o quimioterápico DOX.



3. CAPÍTULO I
Diphenyl Ditelluride: Redox-Modulating and Antiproliferative Properties

Review Article

Diphenyl Ditelluride: Redox-Modulating and Antiproliferative Properties

Cristiano Trindade ¹, André Luiz Mendes Juchem,² Temenouga N. Guecheva,³ Iuri M. de Oliveira,² Priscila dos Santos Silveira,² José Eduardo Vargas ⁴, Renato Puga ⁵, Claudia Ó. Pessoa,⁶ and João A. P. Henriques ^{2,7}

¹Facultad de Ciencias Básicas y Biomédicas, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia

²Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre, Brazil

⁴Instituto de Ciências Biológicas (ICB)-Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil

⁵Clinical Research Center, Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo, Brazil

⁶Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

⁷Laboratório de Cultura de Células, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, Brazil

Correspondence should be addressed to João A. P. Henriques; pegas@cbiot.ufrgs.br

Received 18 November 2018; Revised 9 March 2019; Accepted 11 July 2019; Published 24 October 2019

Academic Editor: Aldrin V. Gomes

Copyright © 2019 Cristiano Trindade et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Tellurium is a rare element that has been regarded as a toxic, nonessential element, and its biological role is not clearly established. In addition, the biological effects of elemental tellurium and some of its organic and inorganic derivatives have been studied, leading to a set of interesting and promising applications. Diphenyl ditelluride (DPDT), an organic tellurium derivate, showed antioxidant, antigenotoxic, antimutagenic, and anticancer properties. The antioxidant and prooxidant properties of DPDT are complex and depend on experimental conditions, which may explain the contradictory reports of these properties. In addition, DPDT may exert its effects through different pathways, including distinct ones to those responsible for chemotherapy resistance phenotypes: transcription factors, membrane receptors, adhesion, structural molecules, cell cycle regulatory components, and apoptosis pathways. This review aims to present recent advances in our understanding of the biological effects, therapeutic potential, and safety of DPDT treatment. Moreover, original results demonstrating the cytotoxic effects of DPDT in different mammalian cell lines and systems biology analysis are included, and emerging approaches for possible future applications are inferred.

1. Introduction

Tellurium (Te) is a stable and solid element that pertains to chalcogens (group 16 in the periodic table), which is the same group that includes sulfur, selenium, and polonium. Te is classified as a metalloid because of its features between metals and nonmetals [1, 2]. It was discovered by Franz Joseph Müller von Reichenstein in 1782, 35 years before the lighter, closely related metalloid, selenium, was discovered [1]. In contrast to selenium, sulfur, and oxygen, Te does not have physiological functions in mammalian cell biology [3];

however, some publications have reported that Te is present in body fluids [1]. Whereas Te-containing proteins were not identified in human cells, Te in telluromethionine and tellurocysteine was found in proteins in yeast, fungi, and bacteria [4]. In a comprehensive review of the biological activities of Te compounds, it was pointed out that Te could be facing the same discrimination as selenium once did and that the natural biological functions of Te may be revealed in the future [5].

The industrial applications of inorganic Te compounds include production of nanoparticulate semiconductors and

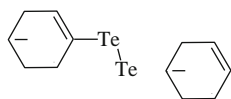


Figure 1: Chemical structure of diphenyl ditelluride.

metal-oxidizing solutions [6, 7]. Furthermore, the use of organotellurium compounds in insecticides, magnetic disks, catalysts, and stabilizers is tending to increase [6, 8]. Te was also utilized in the composition of thermoelectric materials and quantum dots for diagnostics and treatment [9].

The risk of human environmental exposure to Te is unpredictable due to its elevated usage [10]. The use of Te

in the manufacturing of electronic devices and nanomaterials demands safety risk assessment to deal with the electronic material constituents. Moreover, these materials usually can be numerous toxic elements, explaining why research on the environmental and occupational toxicity of these materials has been widely conducted [11-14]. The biological functions of elemental Te have been a matter of interest although few studies examining the toxicity of its ionic forms have been conducted [15, 16]. In the environment, Te can be (bio)methylated and, therefore, activated to a variety of intermediates from soil or aquatic bodies to the air [11, 17].

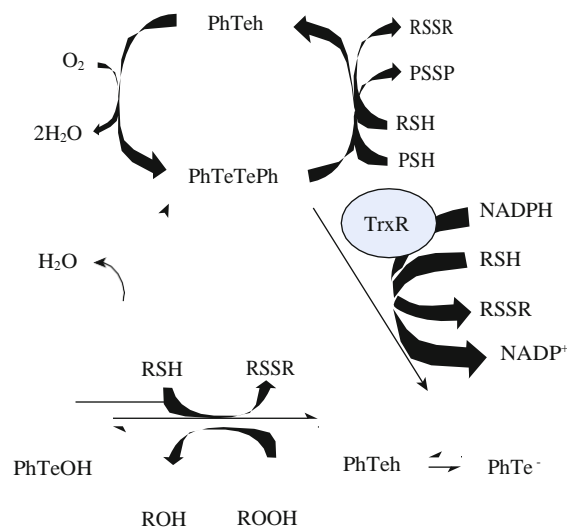
Although there was limited use of synthetic organotellurium (OT) compounds in the past, they have turned a promising alternative for various applications, as evidenced by the increase in reports on OT compounds in the literature [18, 19]. Synthetic OT compounds have boomed in the last years, and their antioxidant, anti-inflammatory, anti-proliferative, and immunomodulatory activities have been reported [18-20].

In the present review, we emphasize the biological activities of an OT compound, diphenyl ditelluride (DPDT) (Figure 1), aiming to argue and discuss its contrasting antioxidant [21], cytotoxic [22], and antiproliferative [20, 23] effects.

2. Antioxidant and Chemopreventive Effects

The antioxidant effects of certain molecules are based on their ability to retard or inhibit oxidative damage. Their antioxidant role includes blocking oxidative reactions induced by highly reactive oxidant molecules—the so-called free radicals or reactive oxygen species (ROS)—that damage other molecules. The antioxidant properties of substances such as OT compounds can protect the biomolecules and cell components against oxidative damage [24-26]. OT compounds can act as ROS scavengers thus preventing the oxidation induced by highly reactive agents, including hydrogen peroxide and peroxy radicals [19].

The oxidative stress plays an important role in the etiology of several conditions such as diabetes, autoimmune disorders, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, and cancer [27]. The mammalian models have been extensively used for the evaluation of ROS-generated cellular damage and the protective effect of antioxidants [28]. In this context, the antioxidant properties of OT compounds and their potential use for treatment of oxidative stress-related



SCHEME 1: The proposed mechanism of the thiol peroxidation and thiol oxidation cycle of diorganotellurides. In the prooxidant pathway, the formation of the tellurothiol is associated with oxidation of low-molecular-mass (RSH) or protein-thiol (PSH) groups causing depletion of glutathione (GSH) through conjugation, oxidation, or export and/or protein loss of function. In the antioxidant pathway, organotellurium compounds decompose peroxides either as a substrate for mammalian thioredoxinreductase (TrxR) or as glutathione peroxidase-like activity via the formation of the tellurothiol/tellurate (PhTeH/PhTe⁻) (the scheme is reproduced from Puntel et al. (2012), under the Creative Commons Attribution License/public domain).

conditions have been of interest to several research groups [19, 29, 30]. The efficacy of the organochalcogens in attenuating the oxidative stress in both *in vitro* studies and rodent models could be attributed to their ROS scavenging and glutathione peroxidase mimetic properties [25, 31, 32].

Puntel et al. (2012) intended that Te compounds have to be metabolized to tellurothiol/tellurate intermediates by different types of thiols, producing disulfides and regenerating the initial diorganotelluride as shown in Scheme 1, and proposed the mechanism of the thiol-peroxidase activity or thioredoxin-thiol-peroxidase-like activity of organotellurium compounds.

In vitro studies comparing the antioxidant properties of organochalcogenide compounds have demonstrated that their protective effects against lipid peroxidation reactions are mediated by free radical-scavenging activities (Table 1) [24, 26, 33]. In fact, 1.63 μM DPDT inhibited lipid peroxidation in rat brain homogenates with higher efficacy than selenides and with similar efficacy to ebselen [34]. Also, DPDT provided protection against neurotoxicity and oxidative stress induction by 4-aminopyridine in mice [35]. The Na⁺/K⁺-ATPase activity in the rat brain significantly increased after treatment with low doses of DPDT, suggesting an antioxidant activity [36]. Further reports on the antioxidant activity of DPDT are summarized in Table 1.

The above results show that pretreatment with nontoxic concentrations of DPDT increased the survival of V79 cells exposed to methyl methanesulfonate, hydrogen peroxide, *t*-butyl hydroperoxide, and ultraviolet C radiation [21]. Furthermore, the pretreatment with the DPDT

TABLE 1: The chemopreventive effects of diphenyl ditelluride.

Model	DPDT (μM)	Effects	Inducing agent	Reference
Rat brain	1.63	Inhibition of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation by 50%	Quinolinic acid (QA) and sodium nitroprusside (SNP)	[24]
Rat brain	150 ($\mu\text{mol/kg}$)	Neuroprotective activity	4-Aminopyridine	[35]
Rat brain	1-4	Increased Na^+/K^+ -ATPase	—	[36]
V79 cell line	0.01-0.1	Reduced cytotoxicity; reduced DNA damage, micronucleus, and ROS formation	Hydrogen peroxide (H_2O_2), <i>t</i> -butyl hydroperoxide (<i>t</i> -BOOH), methyl methanesulfonate (MMS), and UVC	[21]
V79, MRC5, and XPD cell lines	0.01-0.1	Reduced DNA damage and ROS formation	Doxorubicin (DOX)	Figures 2-4

reduced oxidative DNA damage (oxidized pyrimidines and oxidized purines) detected by formamidopyrimidine DNA-glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III). Therefore, the protective effect of low-concentration DPDT preexposure can be explained by its antioxidant capacity in V79 cells (Table 1) [21].

Some chemotherapeutic regimens have proposed the utilization of antioxidants to limit cytotoxicity and genotoxicity of free radical-inducing antitumor agents in normal tissues. The anthracycline doxorubicin (DOX) is a chemotherapeutic agent applied in the treatment of breast cancer and hematologic malignancies [37]. However, its use is limited due to induced cardiotoxicity via generation of ROS [37]. In view of the antioxidant effect of DPDT, we assessed the impact of low DPDT concentrations on DOX-induced cytotoxicity and genotoxicity in different cell lines (V79, MRC5, and XPD). For this purpose, the cell lines MRC5 and V79 were treated with DOX in the presence or absence of DPDT pretreatment and cell viability was evaluated using MTT assay. The pretreatment with 10 and 50 nM DPDT in V79, MRC5, and XPD cell lines increased the cell survival after 0.6 $\mu\text{g/mL}$ DOX treatment (Figure 2).

The genotoxic effects induced by DOX were assessed by alkaline comet assay and enzyme-modified alkaline comet assay, which includes incubation with the enzymes Fpg and Endo III. DOX (0.6 $\mu\text{g/mL}$) induced increase in the Fpg- and Endo III-sensitive sites (Figure 3), and after 3 h of DOX treatment, elevated intracellular ROS levels were detected via flow cytometry using dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Figure 4). The effects of preexposure to low DPDT concentrations (10, 50, and 100 nM) on DOX-induced cytotoxicity and genotoxicity were evaluated, and all DPDT concentrations tested decreased DOX-induced genotoxicity (Figure 3) and ROS formation (Figure 4) in mammalian cells. These results demonstrate that low DPDT concentrations have a chemoprotective effect on DOX-induced DNA damage and do not affect its cytotoxicity in mammalian cells. This finding suggests possible utility of DPDT to prevent DOX-induced toxicity in normal tissues.

Compounds modulating cellular antioxidant defenses may influence the effectiveness of chemotherapy. Recently, some mechanisms related to DPDT antioxidant properties have been proposed in order to explain the chemoprotective effects [21]. DPDT can suffer nucleophilic attack in the Te atom thus interacting with thiol group-containing proteins

and GSH [38, 39]. In agreement, DPDT was reported to inhibit the enzyme δ -aminolevulinic acid dehydratase in mice [38] and to decrease the GSH/GSSG ratio in yeast (50 μM) and V79 cells (0.5 μM) [22]. In contrast, DPDT induced an adaptive response increasing the sulfhydryl group content in the mouse brain [38]. As shown in Scheme 1, DPDT can cause depletion of GSH through oxidation, increasing the ROS formation or as a possible substrate for GSH conjugation. Reinforcing this hypothesis, it was shown that an organoselenium compound (structural analog of DPDT) is detoxified by conjugation with GSH in the rat liver [40, 41]. Thus, DPDT could modulate important endogenous antioxidant systems inducing GSH synthesis (Scheme 1) [22]. In part, this mechanism could explain previous results of our group showing DPDT antimutagenic and antigentoxic effects [21], similar to that of DPDS (1.62-12.5 μM) [41] but at lower concentrations.

For those compounds that display antioxidant activity, evaluation of their antimutagenic mechanisms of action is vital. The search for synthetic antimutagens is an important trend in the area of antimutagenicity research [42, 43]. Such compounds should act removing ROS through multiple antioxidant mechanisms, including modulation of the GSH level and activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Accordingly, DPDT significantly decreased the mutagenicity induced by two mutagens, MMS and UVC, possibly by restoring the GSH content, thus revealing its antioxidant and protector effects [21]. It was found that the antimutagenic potential of a variety of compounds could be attributed to their antioxidant activity (Table 1), and based on current knowledge, antioxidant activity is a desirable property since it can provide antimutagenic effects [21, 43].

3. Diphenyl Ditelluride Mechanisms of Antiproliferative Action in Cancer and Noncancer Cells

Cell death induction mechanisms are diverse, and it is broadly recognized that the effectiveness of Te compounds as anticancer agents is dependent on their chemical form and dose as well as on their redox state and the experimental model used [23, 33, 44, 45]. There is emerging evidence that cell death induced by Te compounds is associated with ROS

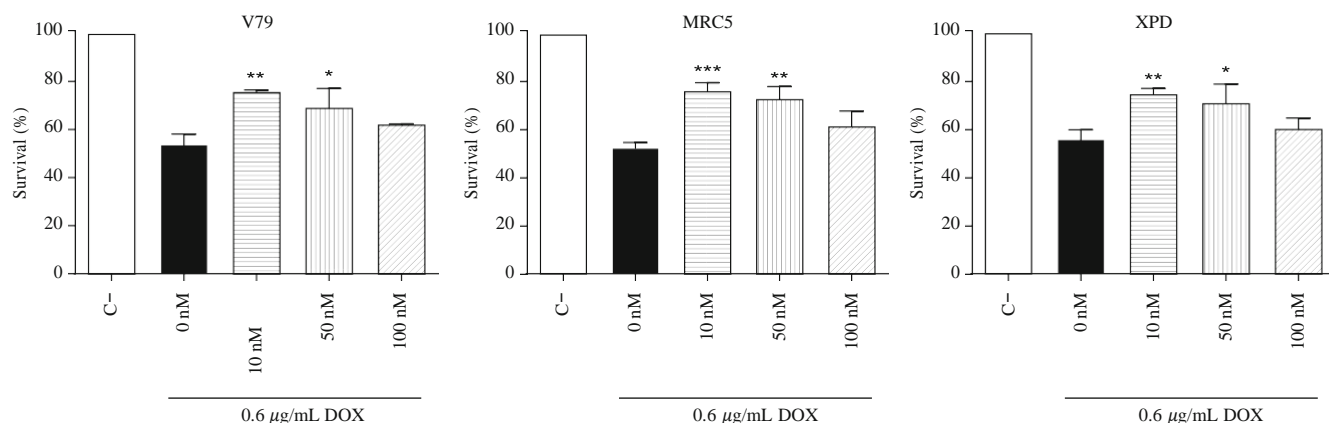


FIGURE 2: Protective effect of 2 h DPDT pretreatment in serum-free medium on doxorubicin-induced cytotoxicity in Chinese hamster fibroblasts (V79) as well as in human fibroblasts proficient (MRC5) and deficient (XPD) in NER evaluated by MTT assay 72 h after pretreatment. Data are reported as means \pm SD of three independent experiments. Significantly different at $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ compared with cells treated with doxorubicin only (one-way ANOVA followed by Tukey test).

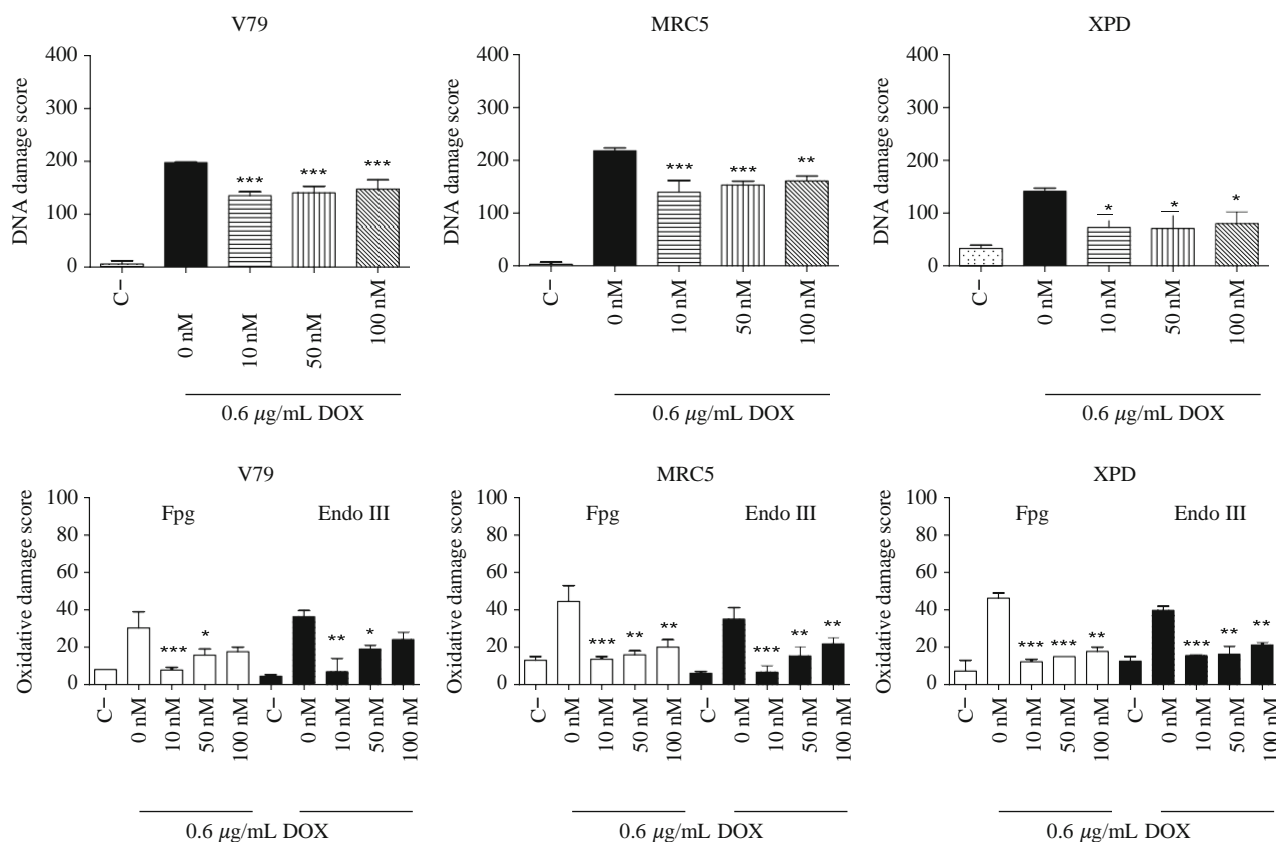


FIGURE 3: Antigenotoxic effects of 2 h DPDT pretreatment in serum-free medium on the genotoxicity of doxorubicin in Chinese hamster fibroblasts (V79) and human fibroblasts proficient (MRC5) and deficient (XPD) in NER, evaluated by comet assay and modified comet assay. Data are reported as means \pm SD of three independent experiments. Significantly different at $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$ compared with cells treated with doxorubicin only (one-way ANOVA followed by Tukey test). The damage index is an arbitrary score calculated from cells in different damage classes, which are classified by visual evaluation of the DNA migration length and the amount of DNA in the comet tail. The oxidative damage score represents the difference in the damage scores between cells incubated with the Fpg and Endo III enzymes and the cells incubated with the incubation buffer only.

formation, cell cycle arrest, induction of programmed cell death, and immunomodulatory effects [33]. Moreover, Te compounds may induce cell death by distinct pathways,

either caspase-dependent or caspase-independent, depending on the chemical form and system studied [22, 23, 44].

Some mechanisms and actions of DPDT and other Te compounds are discussed below.

3.1. Stress Response and Cellular Targets. Due to increasing applicability of oxidative agents in the treatment of cancer,

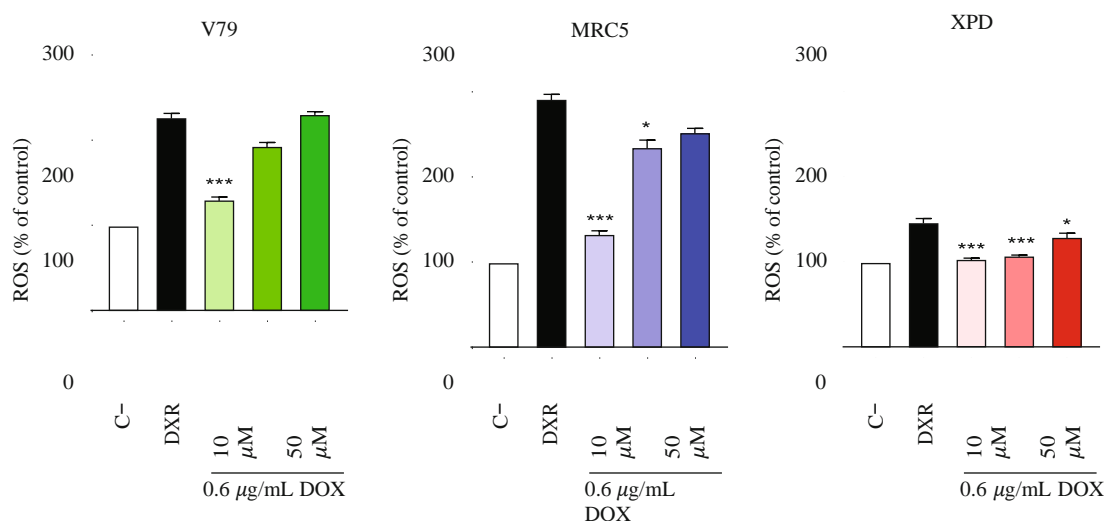


Figure 4: Effect of DPDT on DOX-induced ROS generation and ROS induction was evaluated via flow cytometry using DCFH-DA in cells pretreated with DPDT for 2 h in serum-free medium, followed by treatment with doxorubicin for 3 h. V79: Chinese hamster fibroblasts; MRC5 and XPD: human fibroblasts proficient and deficient in NER, respectively. Data are reported as means \pm SD of three independent experiments. Significantly different at $*p < 0:05$, $**p < 0:01$, and $***p < 0:001$ compared with cells treated with doxorubicin only (one-way ANOVA followed by Tukey test).

the use of antioxidant compounds for development of new anticancer agents has been a promising therapeutic strategy [44, 46]. ROS are essential for various biological processes in normal cells and can act in multiple signaling cascades in the cancer cell, regulating survival, proliferation, angiogenesis, and metastasis. Noncancer cells are characterized by a low basal level of ROS compared with cancerous cells [9, 42, 47]. In addition, the cancer cells develop an increased antioxidant capacity as a compensatory mechanism to escape the ROS-induced cell death, thus increasing their vulnerability to redox state-modulating agents [27]. The balance between oxidants and antioxidants determines the redox state of cells and tissues [9, 47]. Humans have developed highly complex antioxidant systems (enzymatic and nonenzymatic), such as GSH, thioredoxin (Trx) system, SOD, CAT, and peroxidase. These systems are dependent on either thiol antioxidants (GSH systems or the Trx system) [38].

The GSH can act as a cofactor for several detoxifying enzymes; participate in amino acid transport across the plasma membrane; scavenge hydroxyl radical and singlet oxygen directly; regulate and activate transcription factors, such as AP-1 and NF- κ B; and interact with other antioxidants regenerating (antioxidant network) their original properties, such as vitamins C and E [46]. The Trx system is a major antioxidant system integral to maintain the intracellular redox state and consists of Trx and TrxR, and the functions of this system in thiol-disulfide exchange reactions are essential to intracellular redox environment control, cellular growth, scavenging ROS, and apoptosis, thus displaying multiple roles in mammalian cells, including implications in cancer [48]. High concentration of Trx on plasma is raised in diseases associated with oxidative stress such as neurological disorders, arthritis, diabetes, and ischemia reperfusion injury and has been observed from many normal or tumoral cells [48, 49]. TrxR inhibition promotes a switch from an antioxidant to a prooxidant state and cell death induction; thus, TrxR inhibitors can be used for treatment of chemotherapy-

resistant tumors (Scheme 1) [48-50]. TrxR-targeting may

contribute to preventing resistance mechanisms, and there is evidence that the expression of TrxR correlates with apoptotic resistance in various cancer cell types [48]. In this manner, inhibition of TrxR and its related redox responses can contribute to adjuvant cancer treatment [50]. The Te compounds received special attention between other cancer cell redox modulators in relation to their promising chemotherapeutic potential [51]. Additionally, the chemotherapeutic potential of a number of effective synthetic and natural TrxR inhibitors are evaluated regarding induction of oxidative stress and apoptosis [48, 52]. Cyclodextrin-derived diorganyl tellurides were identified as novel inhibitors of TrxR with tumor growth inhibition capacities in submicromolar concentrations [52]. In addition, acute exposure of mice to 10 and 50 $\mu\text{mol/kg}$ DPDT caused TrxR inhibition (Table 2) (Scheme 2) [38].

3.2. Cytotoxic and Antiproliferative Effects. Different concentration thresholds for DPDT cytotoxicity were revealed for each biological model, *Salmonella typhimurium* (20 μM), *Saccharomyces cerevisiae* (100 μM), and V79 cells (1 μM) [22, 23] (Table 2).

In another study, a significant decrease in cell viability was observed in a human colorectal adenocarcinoma cell line (HT-29) and heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2) treated at the concentration range of 62.5-1000 μM DPDT and evaluated using MTT and luminescence assays (Table 2) [53]. The cytotoxic effects of 72 h DPDT treatment were studied also in acute promyelocytic leukemia (HL-60), human ileocecal adenocarcinoma (HCT-8), human glioblastoma (SF-295), and melanoma (MDAMB-435) cell lines. Table 3 shows that the IC_{50} of DPDT was quite low for HL-60 (IC_{50} : 0.03 $\mu\text{g/mL}$), HCT-8 (IC_{50} : 0.25 $\mu\text{g/mL}$), and SF-295 (IC_{50} : 0.28 $\mu\text{g/mL}$) cell lines. The IC_{50} in the MDAMB-435 cancer cell line (2.16 $\mu\text{g/mL}$) was higher than that in normal human peripheral blood mononuclear cells (CMSPH) (0.4 $\mu\text{g/mL}$). DPDT was toxic in HL-60 cells (IC_{50} : 0.03 $\mu\text{g/mL}$) at a concentration close

TABLE 2: Diphenyl ditelluride mechanisms of action in cancer and noncancer cells.

Model	DPDT	Results	Reference
V79 cell line	0.5–1 μ M	Reduced superoxide dismutase (SOD) activity; increased TBARS and ROS formation	[21]
V79 cell line	0.5–50 μ M	Increased TBARS; reduced GSH : GSSH ratio	[21]
Mouse brain	10–50 μ mol/kg	Reduced SOD, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase, and thioredoxin reductase (TrxR) activities	[38]
V79 cell line	1–50 μ M	Cytotoxic and genotoxic effects	[22]
Caco-2 cell line	62.5–1000 μ M	Antiproliferative effect	[53]
HL-60 cell line	1 μ M	Antiproliferative effect, apoptosis induction, and accumulation of S-phase cells	[21]
HL-60, HCT-8, SF-295, MDAMB-43, and CMSPH cell lines	0.03–2.16 μ g/mL	Antiproliferative effect	Table 3
C6, U87, and U251 cell lines	0.28–2.8 mM	Antiproliferative effect; increase of G2/M phase cells in the C6 cell line and in sub-G1 phase cells in C6, U87, and U251 cell lines	Figures 5 and 6
HT-29 and CCD-18Co cell lines	500–1000 μ M	Apoptosis induction; increase in caspases 3/7 and caspase 9 activity	[53]
V79 cell line	1–10 μ M	Increased caspase 3/7 activity, apoptosis, necrosis, and inhibition of human TopoI activity	[23]
C6 cell line (systems biology)	—	Interaction with Akt1 protein kinase	Figure 7
Astrocytes and neurons	0.1–0.5 μ M	Hyperphosphorylation of GFAP and vimentin mediated by NMDA receptors and L-VGCCs; activation of Erk and p38MAPK	[79]

to that of the known chemotherapeutic agent DOX (IC₅₀: 0.02 μ g/mL) and in an order of magnitude lower than the toxic DPDT concentration in normal CMSPH cells (0.4 μ g/mL). The cytotoxicity of DPDT is not due to unspecific damage to cell membranes since the hemolytic potential in erythrocytes was observed at a much higher concentration (244.25 μ g/mL) (Table 3).

The antiproliferative effects of DPDT in human glioblastoma U87 and U251 cell lines and in a rat glial tumor cell line (C6) was evaluated by clonogenic assay. The cells were treated for 72 h at 0.028, 0.28, and 2.8 μ g/mL DPDT for all cell lines. A DPDT concentration of 0.28 μ g/mL induced a greater reduction in cell viability, about 40–50%, for all cell lines (Figure 5). These results expand the possible utility of DPDT as an antiproliferative agent.

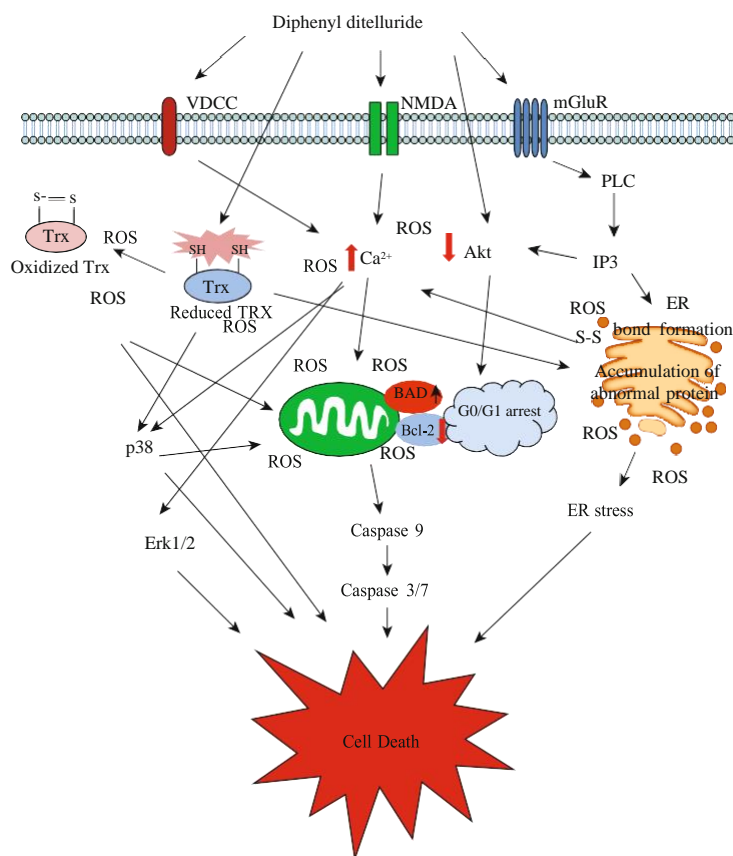
3.3. Effect on Cell Cycle and Cell Death. The administration of traditional chemotherapeutic agents inhibits the cell division inducing not only cell cycle alterations and apoptosis but other forms of nonapoptotic cell death such as necrosis, autophagy, and mitotic catastrophe. Since the most effective cancer treatment method used after surgery is chemotherapy, the search for new drugs with antiproliferative properties is currently ongoing [54, 55].

In a human promyelocytic (HL-60) cell line, the DPDT treatment showed cell cycle alteration, an accumulation of S-phase cells after exposure to 1 μ M DPDT. This was the first study showing the effects of DPDT on the cell cycle (Table 2) [20]. In another study, we showed that treatment with 5 μ M

DPDT resulted in the accumulation of S-phase V79 cells [23]. Moreover, for all exposure times, 1 μ M DPDT did not affect

the percentage of cells in any phase of the cell cycle (Table 2). We also evaluated the effects of DPDT (0.028-2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the progression of the cell cycle of different cancer cell lines (C6, U251, and U87) via flow cytometry analysis. After 24 h of treatment with DPDT (2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the sub-G1 fraction of cells increased in the C6 and U87 cell lines (Figure 6). Furthermore, after 48 h DPDT (2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) treatment, an increase in sub-G1 cells was detected in all cell lines tested. It is important to note that 72 h of DPDT (0.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$) treatment also induced cell cycle arrest in the G2/M phase in C6 cells (Figure 6).

Similarly, in another study was reported an increase in the activity of caspases 3, 7, and 9 in HT-29 cells and in human colon fibroblasts (CCD-18Co) after treatment with DPDT (500-1000 μM) (Table 2) (Scheme 2) [53]. In another study, Jorge et al. showed apoptosis and/or necrosis induction and an increase in the activity of caspases 3 and 7 at all treatment concentrations (1-10 μM) in V79 cells [23]. On the other hand, DPDT treatment induces not apoptotic cell death in rat hippocampal astrocytes [56]. These differences may be due to variations in the GSH content of the different cell types (Table 2) [22]. Taking into account the ability of Te to bind thiol group-containing proteins, a decrease in the GSH/GSSH levels may be responsible for the induction of cell death (Scheme 2) [22, 23]. In this sense, DPDT was shown to reduce the activity of mitochondrial respiratory chain complexes (complexes I and II) by interaction with thiol groups. In this manner, DPDT can be considered as a putative apoptotic cell death inductor, acting via suppression of the pentose phosphate pathway caused by NADPH and thiol oxidation [57]. These results suggest that mitochondrial



SCHEME 2: Mechanisms of diphenyl ditelluride antiproliferative action in cancer and noncancer cells. The high intracellular Ca²⁺ levels are correlated with an increase in Erk1/2 and p38MAPK phosphorylation. As a consequence, cellular redox imbalance and cell death were induced. DPDT, as a modulating agent of the cellular redox state, can interfere with the activity of different redox-active proteins (such as TRX), leading to redox imbalance and increasing their vulnerability to additional ROS-induced DNA damage and cell death. Also, DPDT can induce apoptosis and necrosis by inducing as well as caspase activation. On the other hand, DPDT can induce cell death by decreasing Akt phosphorylation and activation of p38 and Erk1/2.

TABLE 3: Cytotoxic effects of diphenyl ditelluride compared with those of doxorubicin on different cell lines.

Compound ($\mu\text{g/mL}$)	Cell line					
	HL-60	HCT-8	SF-295	MDAMB-435	CMSPH	Erythrocyte
DPDT (IC ₅₀)	0.03	0.25	0.28	2.16	0.40	>100 $\mu\text{g/mL}$ (244.25)
DOX (IC ₅₀)	0.02	0.01	0.24	0.48	0.97	ND*

*Not determined.

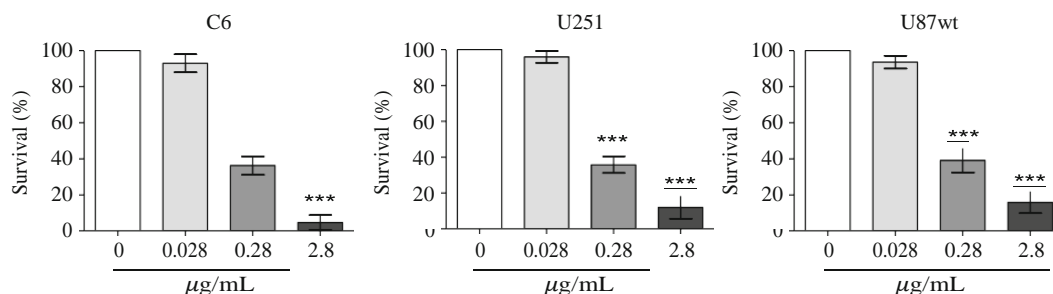


FIGURE 5: The clonogenic capacity of human glioblastoma (U87 and U251) and rat glial tumor C6 cell lines treated for 72 h with DPDT. Data are reported as means \pm SD of three independent experiments. Significantly different at * $p < 0:05$, ** $p < 0:01$, and *** $p < 0:001$ compared with untreated control cells (one-way ANOVA followed by Tukey test).

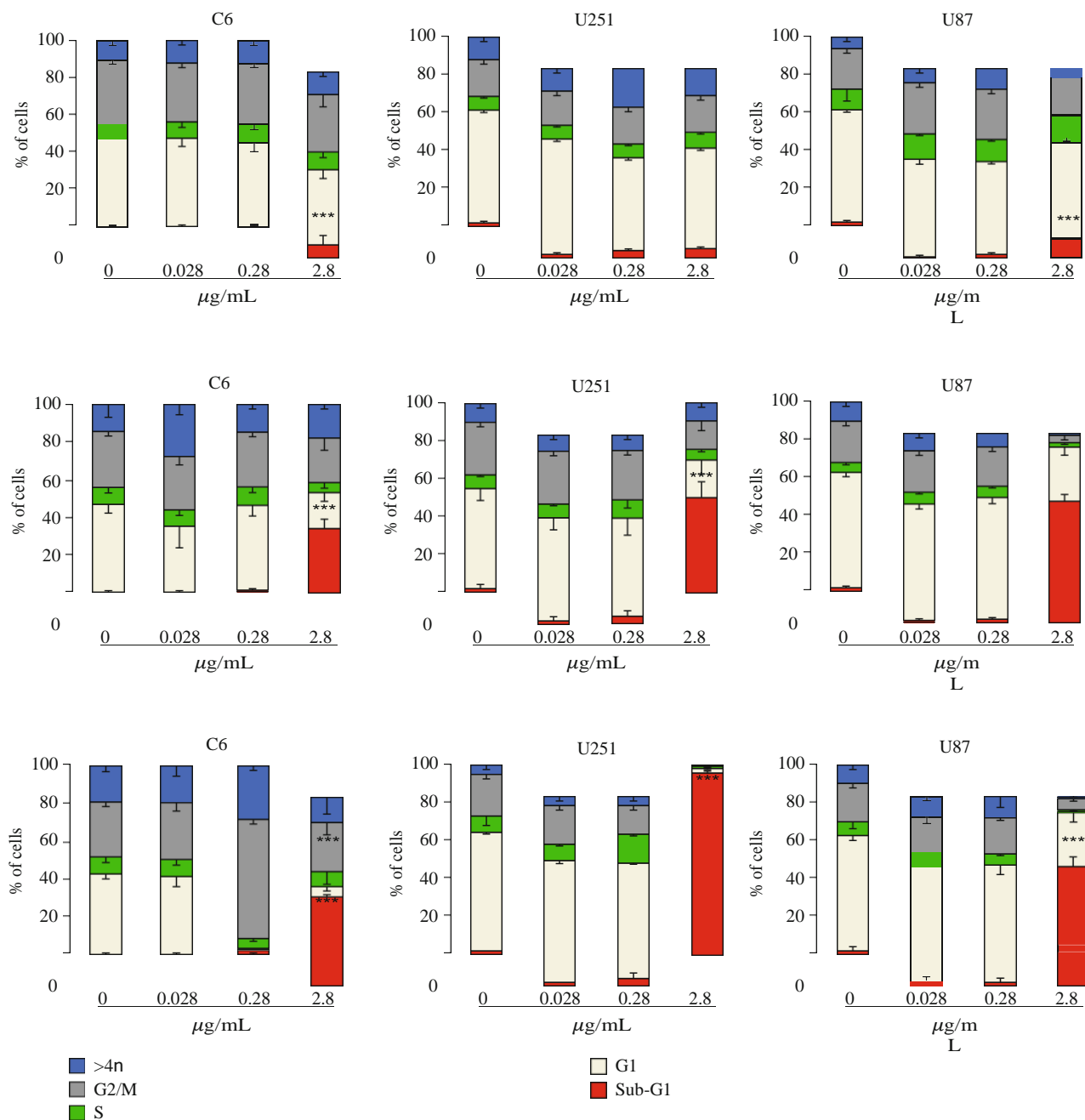


FIGURE 6: Effect of the DPDT treatment on the cell cycle distribution in U87, U251, and C6 cell lines. The cells were treated for 24, 48, and 72 h (first, second, and third lines, respectively) with DPDT at concentrations of 0.028, 0.28, and 2.8 µg/mL. The values the % of sub-G1, G1, S, and G2/M phases and >4n cells, expressed as the means of four independent experiments, each performed in triplicate. The error bars indicate the standard error of the means. Significantly different at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with untreated control cells (one-way ANOVA followed by Tukey test).

dysfunction could be an important factor in oxidative stress-related diseases (Scheme 2).

The results reported in DPDT studies lead us to infer the possible mechanisms of action of this drug and suggest its application as an antiproliferative agent in cancer therapy. As previously mentioned, results from our group demonstrated that DPDT can induce frameshift mutations in bacterial DNA and induce the formation of micronuclei in V79 cells [21, 22]. On the other hand, chemical substances with planar topologies are often capable of intercalation between the base pairs of DNA [58]. DNA-intercalating drugs can induce

frameshift mutations in *Salmonella typhimurium* and *S. cerevisiae* and can be clastogenic in V79 cells [42]. In this way, the frameshift mutation induction by DPDT in bacteria and yeast and double-strand break induction in

mammalian cells could be a result of intercalation activity as well as interaction with DNA topoisomerase enzymes (Table 2). In this sense, using *S. cerevisiae* mutants defective in topoisomerase enzymes, the results of Jorge et al. (2015) showed pronounced tolerance in the *top1Δ* strain to DPDT exposure. The same study also reported DPDT-induced inhibition of human TopoI activity *in vitro* using DNA relaxation assays [23]. These results suggest that DPDT could interact with the Top1p enzyme, inducing DNA lesions responsible for induced cell death.

Regarding the possibility of TopoI inhibition, the search for a noncamptothecin (CPT) TopoI inhibitor has been the target of several studies because of the limitation of CPT and its derivatives [59-62]. The aforementioned effects of DPDT, including cytotoxic effects and cell cycle arrest in

the S- and G2/M phases, are consistent with those of other TopoI inhibitors (Scheme 2) [63]. The organotellurate immunomodulator AS101 induces G2/M arrest in myeloma cells and downregulates Cdc25C, Plk-1 (a serine/threonine kinase), and Ilk-1 (essential for regulating the activity of Akt) in mouse 5T33 myeloma cells [64, 65]. Halpert et al. demonstrated that AS101 targets several proteins and pathways in mice, such as pAkt, Bax, and Bcl-2 [66].

The intertwining of DNA strands and helices, produced during the essential cellular processes of replication, transcription, recombination, and chromosome segregation, must be resolved in order to maintain genome stability and cell viability. DNA topoisomerases supply an important solution for resolving such topological DNA problems [67]. However, they act through the formation of a covalent enzyme-DNA reaction intermediate, which is a potentially toxic lesion itself when stabilized. Indeed, targeting topoisomerase-DNA complexes has been widely explored in the identification and development of antibacterial and anticancer agents [67, 68]. These agents are known as “poison” inhibitors to indicate a mechanism of trapping topoisomerase and consequently forming a covalent enzyme-DNA complex, rather than a classic enzymatic inhibition mechanism, which would signify the lack of DNA binding or cleavage activity by the enzyme [69]. In this manner, increased production of drug-stabilized topoisomerase-DNA adducts increases the cytotoxic activity of a “poison,” while elevated levels of the enzyme could confer resistance to standard inhibitors. Furthermore, several DNA topoisomerases targeting drugs act as interfacial inhibitors (poisons) [67, 70], which are different from competitive (orthosteric) inhibitors and noncompetitive (allosteric) inhibitors because they interact at the interface between two or more molecules. The collision of DNA replication forks with the ternary complexes produce DNA double-strand breaks and cell death induction [70]. Our understanding of cell cycle arrest and cell death induction by DPDT and other OT compounds requires further investigation, but results obtained thus far lead us to some interesting insights. DPDT behaves like a molecule that presents several targets and could be of interest for cancer therapy research.

4. Systems Biology and Signaling

As described in previous sections, DPDT promotes different cellular phenomena. However, no molecular target associated with DPDT has yet been identified. We used a systems biology approach to predict putative cell signaling pathways or specific protein targets for DPDT. To this end, we prospected networks based on C6 cell line gene expression data. Contrast analysis was applied, and differentially expressed genes before simulation of DPDT treatment were selected using the rank product method, a technique based on calculating rank products (RP) from replicate experiments. We used three sample replicates of the C6 rat glioma cell line (untreated) from the GEO database (GSE1139 accession number) under culture conditions similar to those of our experimental model. For each sample, the average of the signal between the same probes was calculated and applied

to the normalized microarray data using the limma package in the R/Bioconductor software [71, 72]. The parameters used to run the RP were the following: permutation = 1000 and p value ≤ 0.01 . After this, we obtained initial C6 protein-protein interaction (PPI) networks based on physical interactions from the GeneMANIA prediction server [72]. The network is composed of 254 nodes and 7539 interactions (Figure 7(a)). To simulate DPDT action, we used STITCH software [73] which allows construction of chemical-protein (CP) and PPI networks (please see Figure 7(b)). Based on this strategy, a network designated C6 CP-PPI was obtained. The analysis showed DPDT interaction with a molecular target, Akt serine/threonine-protein kinase, which is involved in the regulation of multiple signaling pathways involved in cell metabolism and angiogenesis (Scheme 2) [74]. It is also a member of the most frequently activated cell proliferation, drug resistance, and survival pathways in several cancer types [75-77].

In addition, to define Akt interconnectivity and relevance in the C6 CP-PPI network, we analyzed some topological parameters. Firstly, we applied CentiScaPe software to explore node degree and betweenness centralities [78]. Based on this analysis, Akt appeared as a major hub-bottleneck node when compared with the other proteins in the network (Figure 7(c)). Similarly, clustering showed that Akt is a point with high information flux (Figure 7(d)).

Our strategy is valid to explore potential targets for DPDT. However, targets for this compound appear to be different according to the exposed cell type. Heimfarth et al. showed DPDT-induced hyperphosphorylation of glial fibrillary acidic protein, vimentin, and neurofilament subunits from glial cells [79]. The authors reported that excessive Ca^{2+} influx activated protein kinase A and protein kinase C in astrocytes, causing the hyperphosphorylation of glial fibrillary acidic protein and vimentin. These disrupt the organization of actin stress fibres formed by endogenous RhoA activation and led to altered cell morphology. In neurons, the overexpression Ca^{2+} levels activated Erk and p38MAPK, beyond the protein kinase A and protein kinase C, provoking hyperphosphorylation of neurofilament subunits (Table 2), and as a consequence must have caused cellular redox imbalance, increasing ROS and inducing cell death (Scheme 2).

Systems biology strategies combined with *in vitro* and *in vivo* studies could elucidate the molecular mechanisms responsible for the multiple effects of DPDT. To this end, future investigations are necessary to establish the suitability of DPDT application for targeted cancer therapies.

Many authors have shown that DPDT treatment induces different cell death pathways in several model systems, including apoptosis and/or necrosis, but the regulating mechanisms of this agent look very complex. Based on the results discussed above, we can summarize the mechanisms of antiproliferative action in cancer and noncancer cells of DPDT action in Scheme 2.

5. Conclusion

In the past decade, several organometallic compounds have entered clinical trial owing to their unique redox-modulating

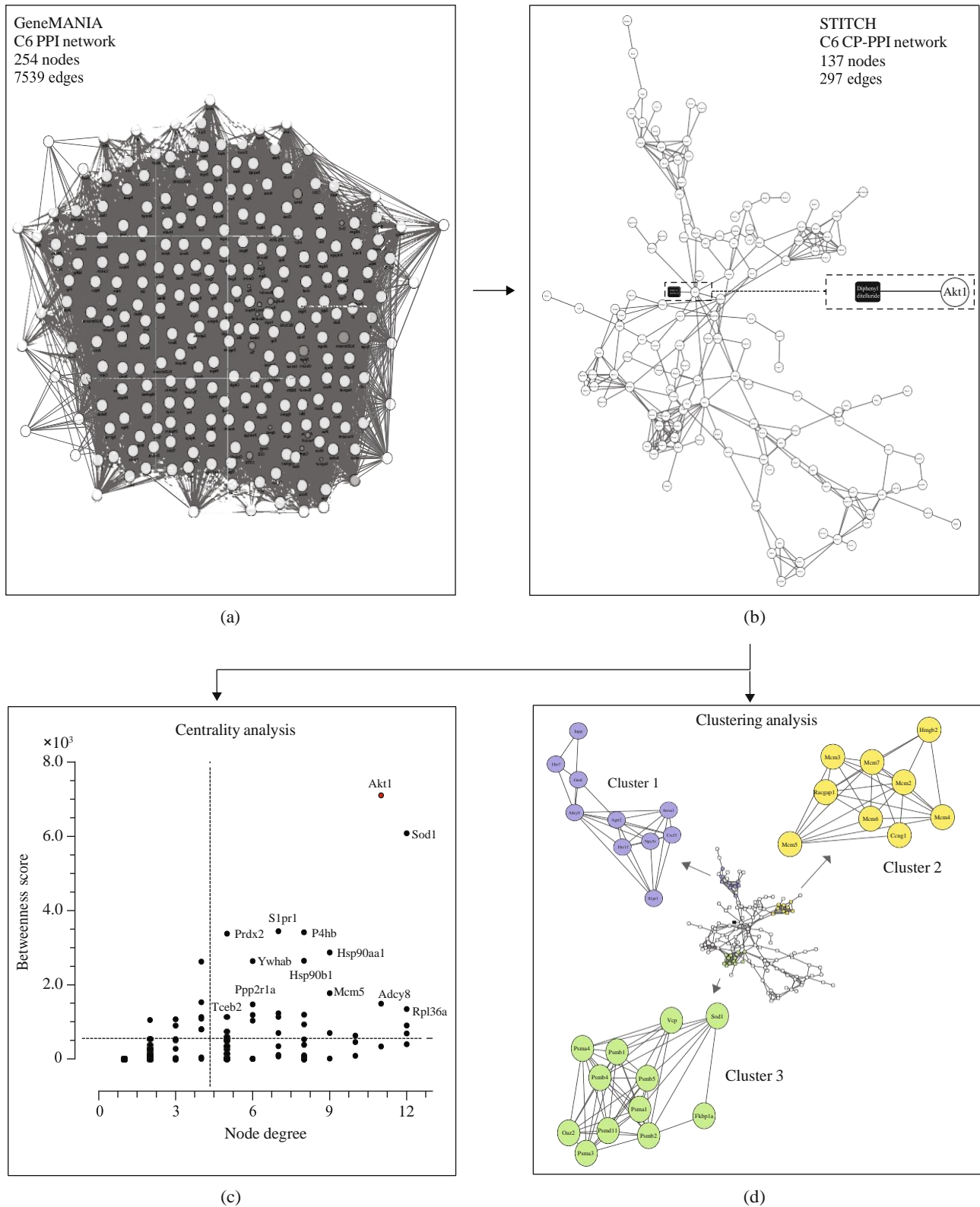


FIGURE 7: (a) C6 PPI network obtained from GeneMANIA software and cell line microarray data analysis. (b) C6 CP-PPI network showing interactions between DPDT and specific targets. (c) Network centrality analysis to define H-B nodes from the CP-PPI network. DPDT's H-B target appears in red. (d) Clustering analysis from the C6 CP-PPI network using ClusterONE [84, 85].

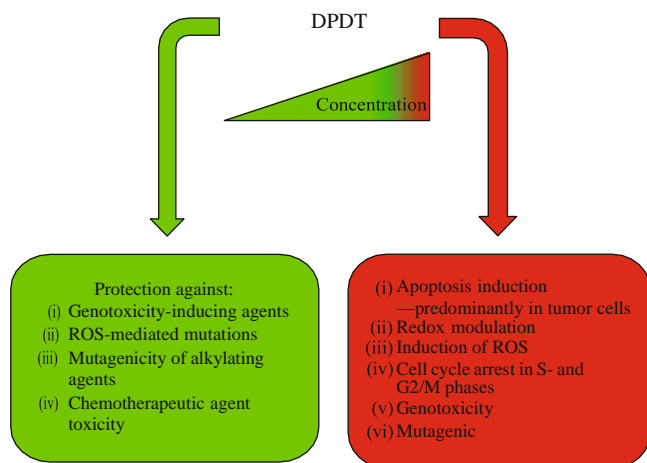


Figure 8: Biological effects of diphenyl ditelluride. Low concentrations of DPDT showed protective effects that could be attributed to its antioxidant capacity. DPDT at moderate concentrations showed selective cytotoxic effects, inducing preferential apoptosis in tumor cells. The observed cytotoxic effects can be explained by increased ROS formation and redox modulation. High concentrations of DPDT-induced toxicity and mutagenicity.

features and great potential in cancer therapy [80, 81]. The toxicology of DPDT has been evaluated by few laboratories, by either animal studies or assessment of cell growth inhibition *in vitro*. It is important to note that in HL-60 cells, the cytotoxic effect of DPDT (IC_{50} : $0.03 \mu\text{g/mL}$) was observed at a similar concentration range to that of the antitumor agent DOX (IC_{50} : $0.02 \mu\text{g/mL}$). This concentration is more than an order of magnitude lower compared to the toxic DPDT concentration in normal CMSPH cells ($0.4 \mu\text{g/mL}$). Furthermore, the hemolytic potential in erythrocytes was observed at high concentration, and the cytotoxicity of DPDT cannot be attributed to unspecific damage to cell membranes. Albeit the conventional prejudice concerning organotellurium compounds, DPDT use should be considered with caution because of its high reactivity and toxicity at relatively low concentrations. The exact nature of DPDT cytotoxic effects remains unclear, although some mechanisms have been proposed that differ depending on the system studied. New trials regarding toxicity, checkpoint activation, and mechanisms of cell death induction by DPDT should be explored in a greater number of cell lines. Moreover, its topoisomerase inhibition potential should be further investigated, keeping in mind that this compound probably presents several distinct mechanisms of action. DPDT has particular chemistry with the thiol which is related to many of the biological effects observed so far. The DPDT depletes GSH because of oxidation and/or as a possible substrate for GSH conjugation and could modulate cellular antioxidant defenses inducing GSH synthesis. The dual action of DPDT (protective and toxic) opens possibilities for distinct applications in cancer treatment (Figure 8). In neurons, the high intracellular Ca^{2+} levels activated Erk and p38MAPK, beyond the PKA and PKC, provoking hyperphosphorylation of neurofilament subunits, and as a consequence must have caused cellular redox imbalance, increasing ROS and induc-

ing cell death. ROS-generating drugs induce cancer-specific cytotoxicity by elevated endogenous ROS production in pre-clinical studies [82, 83]. Thus, low DPDT doses may be useful in the development of adjuvant therapies or rational combinations that may be predicted to have synergistic or additive effects in combination with currently used chemotherapeutics. In addition, the role of DPDT in the prevention of ROS-mediated diseases warrants additional studies to better understand and elucidate the mechanisms of its antioxidant and prooxidant activities before further developments of the uses of tellurium compounds in biology and medicine.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Authors' Contributions

Cristiano Trindade and André Luiz Mendes Juchem contributed equally to this work.

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CAPES/COFECUB no. 583/07, and MCTI/CNPq Projeto Universal 14/2014 no. 454929/2014-5 and by PRONEX/FAPERGS/CNPq no. 16/2551-0000473-0.

References

- [1] T. G. Chasteen, D. E. Fuentes, J. C. Tantaleán, and C. C. Vásquez, "Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 33, no. 4, pp. 820-832, 2009.
- [2] Y. Ogra, "Biology and toxicology of tellurium explored by speciation analysis," *Metallomics*, vol. 9, no. 5, pp. 435-441, 2017.
- [3] A. J. Larner, "How does garlic exert its hypocholesterolaemic action? The tellurium hypothesis," *Medical Hypotheses*, vol. 44, no. 4, pp. 295-297, 1995.
- [4] G. P. Bienert, M. D. Schussler, and T. P. Jahn, "Metalloids: essential, beneficial or toxic? Major intrinsic proteins sort it out," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 33, no. 1, pp. 20-26, 2008.
- [5] N. Petraghani and H. A. Stefani, "Advances in organic tellurium chemistry," *ChemInform*, vol. 36, no. 22, 2005.
- [6] J. V. Comasseto and A. A. Dos Santos, "Organotellurides as precursors of reactive organometallics," *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, vol. 183, no. 4, pp. 939-947, 2008.
- [7] R. Hardman, "A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors," *Environmental Health Perspectives*, vol. 114, no. 2, pp. 165-172, 2006.
- [8] J. L. Princival, A. A. D. Santos, and J. V. Comasseto, "Reactive organometallics from organotellurides: application in organic synthesis," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 21, no. 11, pp. 2042-2054, 2010.
- [9] R. S. Ferrarini, A. A. Dos Santos, and J. V. Comasseto, "Tellurium in organic synthesis: a general approach to buteno-

- butanolides," *Tetrahedron*, vol. 68, no. 51, pp. 10601-10610, 2012.
- [10] M. Kominkova, V. Milosavljevic, P. Vitek et al., "Comparative study on toxicity of extracellularly biosynthesized and laboratory synthesized CdTe quantum dots," *Journal of Biotechnology*, vol. 241, pp. 193-200, 2017.
- [11] E. Dopp, L. M. Hartmann, A. M. Florea, A. W. Rettenmeier, and A. V. Hirmer, "Environmental distribution, analysis, and toxicity of organometal(loid) compounds," *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 34, no. 3, pp. 301-333, 2004.
- [12] S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley et al., "Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 27, no. 9, pp. 1825-1851, 2008.
- [13] J. Lovrić, S. J. Cho, F. M. Winnik, and D. Maysinger, "Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death," *Cell Chemistry Biology*, vol. 12, no. 11, pp. 1227-1234, 2005.
- [14] Y. Ogra, "Toxicometallics for research on the toxicology of exotic metalloids based on speciation studies," *Analytical Sciences*, vol. 25, no. 10, pp. 1189-1195, 2009.
- [15] P. Babula, V. Adam, R. Opatrilova, J. Zehnalek, L. Havel, and R. Kizek, "Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review," *Environmental Chemistry Letters*, vol. 6, no. 4, pp. 189-213, 2008.
- [16] F. Gagné, J. Auclair, P. Turcotte et al., "Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity," *Aquatic Toxicology*, vol. 86, no. 3, pp. 333-340, 2008.
- [17] A. Taylor, "Biochemistry of tellurium," *Biological Trace Element Research*, vol. 55, no. 3, pp. 231-239, 1996.
- [18] M. Friedman, I. Bayer, I. Letko et al., "Topical treatment for human papillomavirus-associated genital warts in humans with the novel tellurium immunomodulator AS101: assessment of its safety and efficacy," *The British Journal of Dermatology*, vol. 160, no. 2, pp. 403-408, 2009.
- [19] C. W. Nogueira, G. Zeni, and J. B. Rocha, "Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology," *Chemical Reviews*, vol. 104, no. 12, pp. 6255-6286, 2004.
- [20] B. L. Sailer, N. Liles, S. Dickerson, and T. G. Chasteen, "Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line," *Archives of Toxicology*, vol. 77, no. 1, pp. 30-36, 2003.
- [21] C. Trindade, A. L. M. Juchem, N. R. M. de Albuquerque et al., "Antigenotoxic and antimutagenic effects of diphenyl ditelluride against several known mutagens in Chinese hamster lung fibroblasts," *Mutagenesis*, vol. 30, no. 6, pp. 799-809, 2015.
- [22] T. H. Degrandi, I. M. de Oliveira, G. S. d'Almeida et al., "Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models," *Mutagenesis*, vol. 25, no. 3, pp. 257-269, 2010.
- [23] P. M. Jorge, I. M. de Oliveira, E. C. Filippi Chiela et al., "Diphenyl ditelluride-induced cell cycle arrest and apoptosis: a relation with topoisomerase I inhibition," *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, vol. 116, no. 3, pp. 273-280, 2015.
- [24] J. I. Rossato, L. A. Ketzer, F. B. Centurião et al., "Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain," *Neurochemical Research*, vol. 27, no. 4, pp. 297-303, 2002.
- [25] K. Briviba, R. Tamler, L. O. Klotz, L. Engman, I. A. Cotgreave, and H. Sies, "Protection by organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions," *Biochemical Pharmacology*, vol. 55, no. 6, pp. 817-823, 1998.
- [26] D. S. Avila, A. Benedetto, C. Au et al., "Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 52, no. 9, pp. 1903-1910, 2012.
- [27] M. H. Raza, S. Siraj, A. Arshad et al., "ROS-modulated therapeutic approaches in cancer treatment," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 143, no. 9, pp. 1789-1809, 2017.
- [28] D. S. Ávila, P. Gubert, A. Palma et al., "An organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats," *Brain Research Bulletin*, vol. 76, no. 1-2, pp. 114-123, 2008.
- [29] L. A. Ba, M. Döring, V. Jamier, and C. Jacob, "Tellurium: an element with great biological potency and potential," *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 8, no. 19, pp. 4203-4216, 2010.
- [30] L. Engman, N. al-Maharik, M. McNaughton, A. Birmingham, and G. Powis, "Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 11, no. 23, pp. 5091-5100, 2003.
- [31] B. K. Sarma and G. Muges, "Antioxidant activity of the anti-inflammatory compound ebselen: a reversible cyclization pathway via selenenic and seleninic acid intermediates," *Chemistry - A European Journal*, vol. 14, no. 34, pp. 10603-10614, 2008.
- [32] A. S. de Freitas, A. D. S. Prestes, C. Wagner et al., "Reduction of diphenyl diselenide and analogs by mammalian thioredoxin reductase is independent of their glutathione peroxidase-like activity: a possible novel pathway for their antioxidant activity," *Molecules*, vol. 15, no. 11, pp. 7699-7714, 2010.
- [33] B. Sredni, "Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 22, no. 1, pp. 60-69, 2012.
- [34] M. Ibrahim, W. Hassan, J. Anwar, C. W. Nogueira, and J. B. Teixeira Rocha, "Fe(II) and sodium nitroprusside induce oxidative stress: a comparative study of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride with their naphthyl analog," *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 35, no. 1, pp. 48-56, 2012.
- [35] V. B. Brito, J. B. Rocha, V. Folmer, and F. Erthal, "Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice," *Acta Biochimica Polonica*, vol. 56, no. 1, pp. 125-134, 2009.
- [36] V. C. Borges, J. B. Rocha, and C. W. Nogueira, "Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats," *Toxicology*, vol. 215, no. 3, pp. 191-197, 2005.
- [37] R. M. Damiani, D. J. Moura, C. M. Viau, R. A. Caceres, J. A. P. Henriques, and J. Saffi, "Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone," *Archives of Toxicology*, vol. 90, no. 9, pp. 2063-2076, 2016.
- [38] B. Comparsi, D. F. Meinerz, J. L. Franco et al., "Diphenyl ditelluride targets brain selenoproteins in vivo: inhibition of cerebral thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in

- mice after acute exposure," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 370, no. 1-2, pp. 173-182, 2012.
- [39] M. P. Rigobello, A. Folda, A. Citta et al., "Interaction of selenite and tellurite with thiol-dependent redox enzymes: kinetics and mitochondrial implications," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 50, no. 11, pp. 1620-1629, 2011.
- [40] M. Prigol, C. W. Nogueira, G. Zeni, M. R. Bronze, and L. Constantino, "In vitro metabolism of diphenyl diselenide in rat liver fractions. Conjugation with GSH and binding to thiol groups," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 200, no. 2-3, pp. 65-72, 2012.
- [41] R. M. Rosa, D. J. Moura, A. C. Romano e Silva, J. Saffi, and J. A. Pêgas Henriques, "Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells," *Mutation Research*, vol. 631, no. 1, pp. 44-54, 2007.
- [42] M. Gordaliza, "Natural products as leads to anticancer drugs," *Clinical & Translational Oncology*, vol. 9, no. 12, pp. 767-776, 2007.
- [43] K. Słoczyńska, B. Powroźnik, E. Pękała, and A. M. Waszkielewicz, "Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action," *Journal of Applied Genetics*, vol. 55, no. 2, pp. 273-285, 2014.
- [44] G. Halpert and B. Sredni, "The effect of the novel tellurium compound AS101 on autoimmune diseases," *Autoimmunity Reviews*, vol. 13, no. 12, pp. 1230-1235, 2014.
- [45] B. S. Sekhon, "Metalloid compounds as drugs," *Research in Pharmaceutical Sciences*, vol. 8, no. 3, pp. 145-158, 2013.
- [46] M. Goodman, R. M. Bostick, O. Kucuk, and D. P. Jones, "Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present, and future," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 51, no. 5, pp. 1068-1084, 2011.
- [47] S. Redondo-Blanco, J. Fernández, I. Gutiérrez-del-Río, C. J. Villar, and F. Lombó, "New insights toward colorectal cancer chemotherapy using natural bioactive compounds," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 8, p. 109, 2017.
- [48] J. Zhang, X. Li, X. Han, R. Liu, and J. Fang, "Targeting the thioredoxin system for cancer therapy," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 38, no. 9, pp. 794-808, 2017.
- [49] H. Zhang, D. Cao, W. Cui, M. Ji, X. Qian, and L. Zhong, "Molecular bases of thioredoxin and thioredoxin reductase-mediated prooxidant actions of (-)-epigallocatechin-3-gallate," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 49, no. 12, pp. 2010-2018, 2010.
- [50] F. Saccoccia, F. Angelucci, G. Boumis et al., "Thioredoxin reductase and its inhibitors," *Current Protein & Peptide Science*, vol. 15, no. 6, pp. 621-646, 2014.
- [51] R. L. O. R. Cunha, I. E. Gouvea, and L. Juliano, "A glimpse on biological activities of tellurium compounds," *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 81, no. 3, pp. 393-407, 2009.
- [52] S. Urig and K. Becker, "On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 16, no. 6, pp. 452-465, 2006.
- [53] P. Vij and D. Hardej, "Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non-transformed human colon cells," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 34, no. 3, pp. 768-782, 2012.
- [54] M. A. Dickson and G. K. Schwartz, "Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy," *Current Oncology*, vol. 16, no. 2, pp. 36-43, 2009.
- [55] R. Visconti, R. Della Monica, and D. Grieco, "Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword," *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 35, no. 1, p. 153, 2016.
- [56] S. Roy and D. Hardej, "Tellurium tetrachloride and diphenyl ditelluride cause cytotoxicity in rat hippocampal astrocytes," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 10, pp. 2564-2574, 2011.
- [57] R. L. Puntel, D. H. Roos, R. L. Seeger, and J. B. T. Rocha, "Mitochondrial electron transfer chain complexes inhibition by different organochalcogens," *Toxicology In Vitro*, vol. 27, no. 1, pp. 59-70, 2013.
- [58] R. D. Snyder and M. R. Arnone, "Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using the V79 in vitro micronucleus assay," *Mutation Research*, vol. 503, no. 1-2, pp. 21-35, 2002.
- [59] M. S. A. Elsayed, Y. Su, P. Wang et al., "Design and synthesis of chlorinated and fluorinated 7-azaindenoisoquinolines as potent cytotoxic anticancer agents that inhibit topoisomerase I," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 60, no. 13, pp. 5364-5376, 2017.
- [60] L. Marzi, K. Agama, J. Murai et al., "Novel fluoroindenoisoquinoline non-camptothecin topoisomerase I inhibitors," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 17, no. 8, pp. 1694-1704, 2018.
- [61] Y. Pommier, "Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond," *Nature Reviews. Cancer*, vol. 6, no. 10, pp. 789-802, 2006.
- [62] Y. Pommier and M. Cushman, "The indenoisoquinoline noncamptothecin topoisomerase I inhibitors: update and perspectives," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 8, no. 5, pp. 1008-1014, 2009.
- [63] N. Wu, X. W. Wu, K. Agama et al., "A novel DNA topoisomerase I inhibitor with different mechanism from camptothecin induces G2/M phase cell cycle arrest to K562 cells," *Biochemistry*, vol. 49, no. 47, pp. 10131-10136, 2010.
- [64] Y. Naor, M. Hayun, B. Sredni, and J. Don, "Multiple signal transduction pathways are involved in G2/M growth arrest and apoptosis induced by the immunomodulator AS101 in multiple myeloma," *Leukemia & Lymphoma*, vol. 54, no. 1, pp. 160-166, 2013.
- [65] A. A. Troussard, N. M. Mawji, C. Ong, A. Mui, R. St-Arnaud, and S. Dedhar, "Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 25, pp. 22374-22378, 2003.
- [66] G. Halpert, T. Eitan, E. Voronov et al., "Multifunctional activity of a small tellurium redox immunomodulator compound, AS101, on dextran sodium sulfate-induced murine colitis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 24, pp. 17215-17227, 2014.
- [67] Y. Pommier, Y. Sun, S. Y. N. Huang, and J. L. Nitiss, "Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 17, no. 11, pp. 703-721, 2016.
- [68] Y. C. Tse-Dinh, "Targeting bacterial topoisomerases: how to counter mechanisms of resistance," *Future Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 10, pp. 1085-1100, 2016.
- [69] Y. Pommier, "Drugging topoisomerases: lessons and challenges," *ACS Chemical Biology*, vol. 8, no. 1, pp. 82-95, 2013.
- [70] S. M. Cuya, M. A. Bjornsti, and R. van Waardenburg, "DNA topoisomerase-targeting chemotherapeutics: what's new?,"

- Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 80, no. 1, pp. 1-14, 2017.
- [71] G. Smyth, "Limma: linear models for microarray data," in *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, R. Gentleman, V. J. Carey, W. Huber, R. A. Irizarry, and S. Dudoit, Eds., pp. 397-420, Springer, New York, NY, USA, 2005.
- [72] D. Warde-Farley, S. L. Donaldson, O. Comes et al., "The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function," *Nucleic Acids Research*, vol. 38, pp. W214-W220, 2010.
- [73] M. Kuhn, C. von Mering, M. Campillos, L. J. Jensen, and P. Bork, "STITCH: interaction networks of chemicals and proteins," *Nucleic Acids Research*, vol. 36, pp. D684-D688, 2008.
- [74] X. Xie, X. M. Xu, N. Li et al., "DMH1 increases glucose metabolism through activating Akt in L6 rat skeletal muscle cells," *PLoS One*, vol. 9, no. 9, article e107776, 2014.
- [75] J. Phuchareon, F. McCormick, D. W. Eisele, and O. Tetsu, "EGFR inhibition evokes innate drug resistance in lung cancer cells by preventing Akt activity and thus inactivating Ets-1 function," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, no. 29, pp. E3855-E3863, 2015.
- [76] R. Li, J. Wei, C. Jiang et al., "Akt SUMOylation regulates cell proliferation and tumorigenesis," *Cancer Research*, vol. 73, no. 18, pp. 5742-5753, 2013.
- [77] P. P. Ruvolo, "Role of protein phosphatases in the cancer microenvironment," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1866, no. 1, pp. 144-152, 2019.
- [78] G. Scardoni, G. Tosadori, M. Faizan, F. Spoto, F. Fabbri, and C. Laudanna, "Biological network analysis with CentiS- caPe: centralities and experimental dataset integration," *F1000Research*, vol. 3, p. 139, 2014.
- [79] L. Heimfarth, F. da Silva Ferreira, P. Pierozan et al., "Astrocyte-neuron interaction in diphenyl ditelluride toxicity directed to the cytoskeleton," *Toxicology*, vol. 379, pp. 1-11, 2017.
- [80] R. M. Damiani, D. J. Moura, C. M. Viau et al., "Influence of PARP-1 inhibition in the cardiotoxicity of the topoisomerase 2 inhibitors doxorubicin and mitoxantrone," *Toxicology In Vitro*, vol. 52, pp. 203-213, 2018.
- [81] A. P. Fernandes and V. Gandin, "Selenium compounds as therapeutic agents in cancer," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1850, no. 8, pp. 1642-1660, 2015.
- [82] A. T. Dharmaraja, "Role of reactive oxygen species (ROS) in therapeutics and drug resistance in cancer and bacteria," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 60, no. 8, pp. 3221-3240, 2017.
- [83] H. R. Molavian, A. Goldman, C. J. Phipps et al., "Drug-induced reactive oxygen species (ROS) rely on cell membrane properties to exert anticancer effects," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 27439, 2016.
- [84] S. Maere, K. Heymans, and M. Kuiper, "BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks," *Bioinformatics*, vol. 21, no. 16, pp. 3448-3449, 2005.
- [85] T. Nepusz, H. Yu, and A. Paccanaro, "Detecting overlapping protein complexes in protein-protein interaction networks," *Nature Methods*, vol. 9, no. 5, pp. 471-472, 2012.

4. CAPÍTULO II

***The anticancer action of Diphenyl Ditelluride in human colon cancer
HCT116 cells: A relation with topoisomerase I inhibition and reactive
oxygen species production***

Artigo a ser submetido em periódico científico.

The anticancer action of Diphenyl Ditelluride in human colon cancer HCT116 cells: A relation with topoisomerase I inhibition and reactive oxygen species production

André Luiz Mendes Juchem¹, Juliana Bondan da Silva² Cristiano Trindade³, Miriana da Silva Machado¹, Temenouga Nikolova Guecheva¹, Jaqueline Rocha⁴, Jenifer Saffi⁴, Iuri Marques de Oliveira^{1,2}, João Antonio Pêgas Henriques^{1,5*}, Alexandre Escargueil^{6*}

¹Department of Biophysics / Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Department of Post-Graduation Program in Molecular and Cell Biology Applied to Health, Lutheran University of Brazil (ULBRA), Canoas, Brazil.

³Facultad de Ciencias Básicas y Biomédicas, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia.

⁴Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre – UFCSPA, Porto Alegre - RS, Brazil

⁵Programas de Pós Graduação em Biotecnologia e em Ciências Médicas, Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, Lajeado - RS, Brazil.

⁶Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, F- 75012, Paris, France

*Corresponding author to:

Dr. João Antonio Pêgas Henriques

E-mail: pegas.henriques@ufrgs.br

Dr. Alexandre Escargueil

E-mail: alexandre.escargueil@gmail.com



CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas, é possível observar um importante aumento nos padrões de vida em todo o mundo, que em parte se deve ao maior e melhor acesso aos cuidados de saúde, além da alta qualidade no diagnóstico e no tratamento de doenças. Essas melhorias impactam diretamente na expectativa média de vida na maioria das regiões do mundo, incluindo pacientes acometidos por câncer. No entanto, embora as taxas de mortalidade por doenças transmissíveis serem mais otimistas em razão das melhorias dos protocolos médicos e avanços nos estudos de novas moléculas, a mortalidade relacionada ao câncer aumentou em aproximadamente 40 % nos últimos 40 anos (KUIPERS *et al.* 2015). Em uma estimativa realizada para o ano de 2030, 13 milhões de pessoas podem morrer de câncer, o que representaria um adicional 60 % na incidência por mortes causadas por essa doença em suas diversas variantes (KUIPERS *et al.* 2013).

Novos tratamentos para CCR primário e metastático foram desenvolvidos nas últimas décadas: cirurgia laparoscópica para doença primária; ressecção de doença metastática, as quais afetam o fígado e os pulmões; radioterapia para câncer CCR, incluindo formas de doença metastática; e também quimioterapia neoadjuvante paliativa (HURWITZ *et al.* 2004; HEEMSKERK-GERRITSEN *et al.* 2015; PAPAMICHAEL *et al.* 2015). No entanto, os avanços nas opções terapêuticas contra o CCR ainda se mostram limitados e a procura a novos compostos que induzem estresse replicativo como estratégia persiste (TOMASINI *et al.* 2021).

No Capítulo I, os efeitos antioxidantes do DTDF foram demonstrados em células de fibroblasto de hamster chinês (V79), fibroblasto humano (MRC5) e fibroblasto deficiente para reparo de excisão de nucleotídeo (NER) (células XPD) (Capítulo 1, Fig. 2). No mesmo método de pré-tratamento por 2 h, o DTDF foi capaz de diminuir os escores de danos de DNA e danos oxidativos induzidas pela DOX nas três linhagens testadas. Compostos que modulam defesas antioxidantes no âmbito celular podem ser empregados na terapia anticâncer como adjuvantes, reduzindo os efeitos inespecíficos dos agentes antitumorais (THYAGARAJAN & SAHU 2018). Dessa maneira, a prevenção de efeitos oxidantes já foi proposta anteriormente utilizando o DPDT em doses não citotóxicas, diminuindo danos oxidativos em células V79 induzido por peróxido de hidrogênio (TRINDADE *et al.*

2015). Assim sendo, a utilização do DTDF na prevenção de efeitos adversos de agentes quimioterápicos pode ser explorada como estratégia, em especial em combinação com agentes que induzem estresse oxidativo.

No Capítulo II, o principal objetivo do presente estudo foi investigar a capacidade do DTDF de reduzir a proliferação de células de CCR e compreender os mecanismos de ação envolvidos na indução de morte celular. Para tanto, utilizamos a linhagem de CCR (HCT116), fibroblasto humano (MRC5) e câncer cervical (HeLa), demonstrando que ao expor a células ao DTDF ocorre a diminuição da viabilidade celular em doses inferiores em linhagens de câncer quando comparados a MRC5, evento que levou às quebras de DNA e alteração do ciclo celular (Capítulo II). Ao comparar o efeito nas linhagens, ficou evidenciada a maior sensibilidade da linhagem HCT116 em comparação a MRC5, onde observa-se pelo método MTT que a dose 1 μM reduziu a viabilidade da linhagem HCT116 em aproximadamente 50 % e MRC5 aproximadamente 20 % (72 h) (Capítulo I, Fig. 1). Na avaliação da capacidade clonal, a dose de 3 μM representou uma diminuição de viabilidade superior a 60 % em HCT116, enquanto em MRC5 a diminuição foi de aproximadamente 60 % (72 h de exposição). Ao avaliar os danos de DNA induzido pela exposição ao DTDF, também foi possível detectar maior sensibilidade da linhagem HCT116, onde os escores de índice de dano se mostraram significativamente inferiores em MRC5 (Capítulo II, Fig. 2). Em glioblastomas, células U251 e U87, e células da glia de ratos, células C6, o DTDF em 72 h diminuiu significativamente a viabilidade celular avaliada pelo ensaio clonogênico (Capítulo I, Fig. 5). Assim sendo, utilizando as mesmas linhagens, foi avaliada a progressão do ciclo celular, onde após 24 h de exposição a 6,8 μM de DTDF ocorreu o acúmulo na fração sub-G1 em células C6 e U87; em 48 h de exposição, todas as linhagens acumularam em sub-G1 (Capítulo I, Fig. 6). Em células C6, a dose mais alta de 6,8 μM induziu o acúmulo em G2/M, um resultado único até o momento em relação a parada no ciclo celular por exposição ao DTDF em gliomas (Capítulo I, Fig. 6).

A sinalização de quebras duplas de DNA nas linhagens HCT116 e HeLa expostas ao DTDF em 10 e 100 μM foi detectada principalmente em células replicativas (fase S) (Capítulo II, Fig. 2). Os acúmulos de danos no DNA detectados pelo ensaio cometa (24 h de exposição) podem representar a resposta de dano no DNA devido às quebras duplas, recrutando reparação pela sinalização de $\gamma\text{-H2AX}$

(MAH *et al.* 2010). Injúrias no genoma são constantemente causadas por agentes endógenos ou exógenos (de maneira direta ou indireta), induzindo dano no DNA e/ou perturbando a replicação do DNA (ZEMAN & CIMPRICH 2014). Assim sendo, a avaliação R² de γ -H2AX x EdU mostrou alto índice de correlação na dose 10 μ M, muito semelhante ao controle positivo, sugerindo que as quebras duplas ocorrem principalmente em fase S. No entanto, quebras duplas também foram detectadas em células que não se encontravam em estágio de replicação (Capítulo II, Fig. 2). A geração de γ -H2AX em células em replicação (fase S) é amplamente mediada pela proteína quinase *ataxia telangiectasia and Rad3 related* (ATR), ação que resulta em DSBs que são formadas por agentes e colidem com a forquilha de replicação, assim como a formação de γ -H2AX em outras fases do ciclo celular ocorrem possivelmente por uma reação à resposta celular inicial aos danos induzidos (WARD & CHEN 2001; CUADRADO *et al.* 2006; TANAKA *et al.* 2006). Em células HeLa, o DTDF também foi capaz de induzir DSBs detectado pelo aumento da intensidade de fluorescência de γ -H2AX, resultados muito semelhantes aos obtidos em HCT116, sendo coerente com a indução de quebras duplas pelo agente DTDF em células proliferativas (Capítulo II, Fig. Sup. 3).

Na realização do experimento TARDIS, mostramos que ocorre estabilização de ccTOP1 ao expor as células HCT116 e MRC5 ao DTDF, ao qual é expresso pelo aumento da sinalização de fluorescência quantificada, tipo de inibição conhecida como efeito *poison* (Capítulo II, Fig. 3). A intensidade de fluorescência induzida pela formação de ccTOP1 estáveis em células HCT116 mostrou valores elevados em relação a linhagem MRC5, intensidade próxima dos valores do controle positivo (CPT). Esse aumento significativo da sinalização de fluorescência claramente demonstra a diferença entre as linhagens e é coerente com resultados descritos na literatura, em consequência de linhagens de CCR possuírem elevada expressão de TOP1 (BOONSONG *et al.* 2002). A inibição de TOP1 induzido pelo DTDF corrobora em parte a indução de danos no DNA e formação de quebras duplas de DNA em fase S, resultando na redução da viabilidade das células de CCR.

Anteriormente, demonstramos a origem das quebras duplas de DNA, porém a presença de DSB em células não replicativas pode ser originária da indução de estresse oxidativo (Capítulo II, Fig. 3) A geração de estresse oxidativo por exposição ao DTDF ficou evidenciada em células HCT116 e MRC5, em incubações

de 3 e 24 h (Capítulo II. Fig. 4). Em dose de 1, 5 e 10 μM , a exposição de 3 h ao DTDF aumentou significativamente os níveis de EROs em comparação ao grupo controle. No entanto, na linhagem MRC5 em 24 h elevou os níveis de EROs em valores não significativos.

Os efeitos citotóxicos e genotóxico induzidos pela exposição ao DTDF levaram à parada no ciclo celular em células MRC5 e HCT116 (Capítulo 2, Fig. 5). A exposição por 24 e 48 h levou ao acúmulo em G2/M significativamente elevado em doses de 10 μM em ambas as linhagens. Em 24 h de exposição ao DTDF, a dose de 5 μM induziu acúmulo significativamente mais alto em HCT116, porém não em MRC5, mostrando uma maior sensibilidade pela linhagem de CCR. Em 48 h de exposição, também é possível observar maior sensibilidade em HCT116 no acúmulo de células em G2/M em comparação a MRC5. Diferentemente dos resultados obtidos em V79, uma linhagem não proficiente em p53, a indução de parada no ciclo celular induzido pelo DTDF aconteceu em fase S (JORGE *et al.* 2015). Dessa maneira, aqui encontramos um novo *endpoint* de ciclo celular em G2/M possivelmente envolvendo processo apoptótico. De maneira geral, as células se replicam mais lentamente em resposta ao dano no DNA e, para garantir que cada célula filha receba DNA íntegro, elas dispõem de mecanismos chamados de *checkpoints* (CICCIA & ELLEDGE 2010; ZEMAN & CIMPRICH 2014). Essas paradas são utilizadas pelas células para detectar e responder ao dano no DNA, pois elas interrompem o ciclo celular, permitindo uma faixa de tempo fundamental para ocorrer a reparação do DNA antes que aconteçam os processos cruciais de replicação de DNA e segregação cromossômica (HARTWELL & WEINERT 1989).

Nossos resultados indicam a indução de apoptose tardia em linhagens HCT116 e HeLa em exposição DPDT, efeito com elevado nível de acúmulo em apoptose nas doses de 5 e 10 μM (Capítulo 2, Fig. 6, Fig. S4, Fig. S5). Ambos os períodos de exposição de 24 e 48 h levaram a ao acúmulo de células em apoptose tardia, onde HCT116 mostrou maior sensibilidade e menor viabilidade em comparação a HeLa. Além disso, o mesmo experimento foi realizado com a incubação de QVD-OPh, *caspase-3, 1, 8 and 9 inhibitors* (QVD), um inibidor potente de caspases. Após a incubação com QVD, a indução de apoptose foi significativamente reduzida em comparação aos valores obtidos na ausência QVD, indicando que a indução de apoptose ocorre de maneira dependente de caspases.

Na presente tese, demonstrou-se que o DTDF possui potencial de ser utilizado na ação antitumoral, provocando mecanismos de ação que induzem a morte de células de CCR (HCT116), incluindo outras linhagens (MRC5 e HeLa). A citotoxicidade produzida pelo agente DTDF é fenômeno que está associado a indução de quebras no DNA, tanto SSBs quanto DSBs, os quais ocorrem principalmente em fase S do ciclo celular. Dessa maneira, a formação de quebras duplas se deve à estabilização de ccTOP1 induzidas pela exposição DTDF, adicionado à produção de estresse oxidativo. Por fim, os mecanismos de ação descritos explicam a parada no ciclo celular em G2/M e indução de apoptose depende de caspases. O DTDF possui ação complexa por não apresentar um único mecanismo, mas sim mais de um mecanismo de ação envolvido na indução de apoptose e parada de ciclo celular. Em adição, a utilização de concentrações não citotóxicas reduziu a toxicidade induzida pela DOX, bem como diminuiu a formação de danos de DNA. Devido a sua complexidade e grande potencial antitumoral, representado por mecanismos específicos, o DTDF necessita ser amplamente estudado em novas metodologias que explorem os efeitos combinatórios com outras moléculas, bem como investigar a ativação de checkpoints de ciclo celular.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, I., T. Abe, W. Lou, T. Masuoka and H. Noguchi, 2007 Site-directed mutagenesis of conserved aromatic residues in rat squalene epoxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 259-263.
- Abigerges, D., G. G. Chabot, J. P. Armand, P. Herait, A. Gouyette *et al.*, 1995 Phase I and pharmacologic studies of the camptothecin analog irinotecan administered every 3 weeks in cancer patients. *J Clin Oncol* 13: 210-221.
- Arnold, M., M. S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal *et al.*, 2017 Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66: 683-691.
- Austin, C. A., and L. M. Fisher, 1990 DNA topoisomerases: enzymes that change the shape of DNA. *Sci Prog* 74: 147-161.
- Avemann, K., R. Knippers, T. Koller and J. M. Sogo, 1988 Camptothecin, a specific inhibitor of type I DNA topoisomerase, induces DNA breakage at replication forks. *Mol Cell Biol* 8: 3026-3034.
- Bauer, V. P., and H. T. Papaconstantinou, 2008 Management of serrated adenomas and hyperplastic polyps. *Clin Colon Rectal Surg* 21: 273-279.
- Bird, M. L., and F. Challenger, 1938 The formation of organometalloidal and similar compounds by microorganisms. II. Dimethyltelluride. *J Chem*: 163-168.
- Bjornsti, M. A., and S. H. Kaufmann, 2019 Topoisomerases and cancer chemotherapy: recent advances and unanswered questions. *F1000Res* 8.
- Boonsong, A., S. Curran, J. A. McKay, J. Cassidy, G. I. Murray *et al.*, 2002 Topoisomerase I protein expression in primary colorectal cancer and lymph node metastases. *Hum Pathol* 33: 1114-1119.
- Borges, V. C., J. B. Rocha and C. W. Nogueira, 2005 Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. *Toxicology* 215: 191-197.
- Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre *et al.*, 2018 Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68: 394-424.
- Brazilian Medical, A., A. Silvinato, I. D. S. Pedreira, J. Reis, J. G. Z. Marcondes *et al.*, 2018 Metastatic colorectal cancer: treatment with panitumumab. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 64: 568-574.
- Brito, V. B., J. B. Rocha, V. Folmer and F. Erthal, 2009 Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice. *Acta Biochim Pol* 56: 125-134.
- Brown, P. O., and N. R. Cozzarelli, 1981 Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 843-847.
- Brozmanova, J., D. Manikova, V. Vlckova and M. Chovanec, 2010 Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch Toxicol* 84: 919-938.

- Cancer Genome Atlas, N., 2012 Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487: 330-337.
- Challenger, F., 1945 Biological Methylation. *Chem. Rev.* 36: 235-361.
- Chasteen, T. G., D. E. Fuentes, J. C. Tantalean and C. C. Vasquez, 2009 Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol Rev* 33: 820-832.
- Chen, E. X., D. J. Jonker, L. L. Siu, K. McKeever, D. Keller *et al.*, 2016 A Phase I study of olaparib and irinotecan in patients with colorectal cancer: Canadian Cancer Trials Group IND 187. *Invest New Drugs* 34: 450-457.
- Chibaudel, B., F. Maindrault-Goebel, J. B. Bachet, C. Louvet, A. Khalil *et al.*, 2016 PEPOL: a GERCOR randomized phase II study of nanoliposomal irinotecan PEP02 (MM-398) or irinotecan with leucovorin/5-fluorouracil as second-line therapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Med* 5: 676-683.
- Ciccia, A., and S. J. Elledge, 2010 The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40: 179-204.
- Comasseto, J. V., 2010 Selenium and tellurium chemistry: Historical background. *J. Braz. Chem.* .
- Comella, P., R. Casaretti, C. Sandomenico, A. Avallone and L. Franco, 2009 Role of oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer. *Ther Clin Risk Manag* 5: 229-238.
- Conti, P., D. Kempuraj, K. Kandere, M. Di Gioacchino, R. C. Barbacane *et al.*, 2003 IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett* 86: 123-129.
- Crespi, M. D., S. E. Ivanier, J. Genovese and A. Baldi, 1986 Mitoxantrone affects topoisomerase activities in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 136: 521-528.
- Cuadrado, M., B. Martinez-Pastor and O. Fernandez-Capetillo, 2006 "ATR activation in response to ionizing radiation: still ATM territory". *Cell Div* 1: 7.
- Cunha, R. L., I. E. Gouvea and L. Juliano, 2009 A glimpse on biological activities of tellurium compounds. *An Acad Bras Cienc* 81: 393-407.
- Cunha, R. L., M. E. Urano, J. R. Chagas, P. C. Almeida, C. Bincoletto *et al.*, 2005 Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium(IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 755-760.
- Cunningham, D., S. Pyrhonen, R. D. James, C. J. Punt, T. F. Hickish *et al.*, 1998 Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 352: 1413-1418.
- Cuya, S. M., M. A. Bjornsti and R. van Waardenburg, 2017 DNA topoisomerase-targeting chemotherapeutics: what's new? *Cancer Chemother Pharmacol* 80: 1-14.

- Danenberg, P. V., B. Gustavsson, P. Johnston, P. Lindberg, R. Moser *et al.*, 2016 Folates as adjuvants to anticancer agents: Chemical rationale and mechanism of action. *Crit Rev Oncol Hematol* 106: 118-131.
- de Jong, F. A., R. H. Mathijssen, R. Xie, J. Verweij and A. Sparreboom, 2004 Flat-fixed dosing of irinotecan: influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic variability. *Clin Cancer Res* 10: 4068-4071.
- de Man, F. M., A. K. L. Goey, R. H. N. van Schaik, R. H. J. Mathijssen and S. Bins, 2018 Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics. *Clin Pharmacokinet* 57: 1229-1254.
- de Sousa e Melo, F., A. V. Kurtova, J. M. Harnoss, N. Kljavin, J. D. Hoeck *et al.*, 2017 A distinct role for Lgr5(+) stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature* 543: 676-680.
- Dean, L., 2012 Irinotecan Therapy and UGT1A1 Genotype in *Medical Genetics Summaries*, edited by V. M. Pratt, S. A. Scott, M. Pirmohamed, B. Esquivel, M. S. Kane *et al.*, Bethesda (MD).
- Degrandi, T. H., I. M. de Oliveira, G. S. d'Almeida, C. R. Garcia, I. V. Villela *et al.*, 2010 Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 25: 257-269.
- Dekker, E., P. J. Tanis, J. L. A. Vleugels, P. M. Kasi and M. B. Wallace, 2019 Colorectal cancer. *Lancet* 394: 1467-1480.
- DiGate, R. J., and K. J. Marians, 1988 Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 263: 13366-13373.
- Douillard, J. Y., D. Cunningham, A. D. Roth, M. Navarro, R. D. James *et al.*, 2000 Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355: 1041-1047.
- Dukes, C. E., 1932 The classification of cancer of the rectum. *Pathol. Bacteriol.* 35: 323-332.
- Engel, L. W., and N. A. Young, 1978 Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Res* 38: 4327-4339.
- Engman, L., I. Cotgreave, M. Angulo, C. W. Taylor, G. D. Paine-Murrieta *et al.*, 1997 Diaryl chalcogenides as selective inhibitors of thioredoxin reductase and potential antitumor agents. *Anticancer Res* 17: 4599-4605.
- Engman, L., and A. Hallberg, 1989 Expedient synthesis of ebselen and related compounds. *J. Org. Chem.* 54: 2964-2966.
- Ewing, I., J. J. Hurley, E. Josephides and A. Millar, 2014 The molecular genetics of colorectal cancer. *Frontline Gastroenterol* 5: 26-30.
- Fearon, E. R., 1995 Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 768: 101-110.
- Fearon, E. R., and B. Vogelstein, 1990 A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
- Fernandes, A. P., and V. Gandin, 2015 Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1850: 1642-1660.

- Fischer, W., 2001 A second note on the term "chalcogen". J. Chem. Educ. 78: 1333.
- Fleming, A., 1932 On the specific antibacterial properties of penicillin and potassium tellurite. Incorporating a method of demonstrating some bacterial antagonisms. J Pathol Bacteriol 35: 831-842.
- Frazer, A. D. E., M. B., 1930 TELLURIUM IN THE TREATMENT OF SYPHILIS. Lancet 216: 133-134.
- Fuchs, C. S., M. R. Moore, G. Harker, L. Villa, D. Rinaldi *et al.*, 2003 Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 21: 807-814.
- Fujimori, H., M. Hyodo, Y. Matsuno, A. Shimizu, Y. Minakawa *et al.*, 2019 Mismatch repair dependence of replication stress-associated DSB recognition and repair. Heliyon 5: e03057.
- Fujita, K., Y. Kubota, H. Ishida and Y. Sasaki, 2015 Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. World J Gastroenterol 21: 12234-12248.
- Gabay, M., Y. Li and D. W. Felsher, 2014 MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. Cold Spring Harb Perspect Med 4.
- Gagne, J. F., V. Montminy, P. Belanger, K. Journault, G. Gaucher *et al.*, 2002 Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). Mol Pharmacol 62: 608-617.
- Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea and H. A. Nash, 1976 DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 73: 3872-3876.
- Gilbert, D. C., A. J. Chalmers and S. F. El-Khamisy, 2012 Topoisomerase I inhibition in colorectal cancer: biomarkers and therapeutic targets. Br J Cancer 106: 18-24.
- Girard, H., E. Levesque, J. Bellemare, K. Journault, B. Caillier *et al.*, 2007 Genetic diversity at the UGT1 locus is amplified by a novel 3' alternative splicing mechanism leading to nine additional UGT1A proteins that act as regulators of glucuronidation activity. Pharmacogenet Genomics 17: 1077-1089.
- Gmelin, C. G., 1824 Versuche " uber die Wirkungen des Baryts, Strontians, Chroms, Molybdaens, Wolframs, Tellurs, Titans, Osmiums, Platins, Iridiums, Rhodiums, Palladiums, Nickels, Kobalts, Urans, Ceriums, Eisens und Mangans auf den tierischen Organismus. Tübingen: 43.
- Guillemette, C., 2003 Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. Pharmacogenomics J 3: 136-158.
- Guimaraes, D. P., L. A. Mantuan, M. A. de Oliveira, R. L. Junior, A. M. D. Costa *et al.*, 2021 The Performance of Colorectal Cancer Screening in Brazil: The First Two Years of the Implementation Program in Barretos Cancer Hospital. Cancer Prev Res (Phila) 14: 241-252.

- Guinney, J., R. Dienstmann, X. Wang, A. de Reynies, A. Schlicker *et al.*, 2015 The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 21: 1350-1356.
- Harada, T. T., Y., 2008 Origin of the difference in the distribution behavior of tellurium and selenium in a soil–water system. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 72: 1281-1294.
- Hartwell, L. H., and T. A. Weinert, 1989 Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634.
- Hassan, W., M. Ibrahim, C. W. Nogueira, A. L. Braga, A. M. Deobald *et al.*, 2009 Influence of pH on the reactivity of diphenyl ditelluride with thiols and anti-oxidant potential in rat brain. *Chem Biol Interact* 180: 47-53.
- Hayun, M., Y. Naor, M. Weil, M. Albeck, A. Peled *et al.*, 2006 The immunomodulator AS101 induces growth arrest and apoptosis in multiple myeloma: association with the Akt/survivin pathway. *Biochem Pharmacol* 72: 1423-1431.
- Heemskerk-Gerritsen, B. A., M. A. Rookus, C. M. Aalfs, M. G. Ausems, J. M. Collee *et al.*, 2015 Improved overall survival after contralateral risk-reducing mastectomy in BRCA1/2 mutation carriers with a history of unilateral breast cancer: a prospective analysis. *Int J Cancer* 136: 668-677.
- Henrikson, N. B., E. M. Webber, K. A. Goddard, A. Scrol, M. Piper *et al.*, 2015 Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review. *Genet Med* 17: 702-712.
- Horisberger, K., P. Erben, B. Muessle, C. Woernle, P. Stroebel *et al.*, 2009 Topoisomerase I expression correlates to response to neoadjuvant irinotecan-based chemoradiation in rectal cancer. *Anticancer Drugs* 20: 519-524.
- Hsiang, Y. H., R. Hertzberg, S. Hecht and L. F. Liu, 1985 Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 260: 14873-14878.
- Hsiang, Y. H., M. G. Lihou and L. F. Liu, 1989 Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res* 49: 5077-5082.
- Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth *et al.*, 2004 Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2335-2342.
- Hurwitz, H. I., L. Fehrenbacher, J. D. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin *et al.*, 2005 Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23: 3502-3508.
- Husain, I., J. L. Mohler, H. F. Seigler and J. M. Besterman, 1994 Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Res* 54: 539-546.

- Ibrahim, M., W. Hassan, D. F. Meinerz, M. Dos Santos, V. K. C *et al.*, 2012 Antioxidant properties of diorganoyl diselenides and ditellurides: modulation by organic aryl or naphthyl moiety. *Mol Cell Biochem* 371: 97-104.
- Ikuno, N., H. Soda, M. Watanabe and M. Oka, 1995 Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and cecum. *J Natl Cancer Inst* 87: 1876-1883.
- Itatani, Y., K. Kawada and Y. Sakai, 2019 Transforming Growth Factor-beta Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci* 20.
- Jacob, S., M. Aguado, D. Fallik and F. Praz, 2001 The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells. *Cancer Res* 61: 6555-6562.
- Jiao, S., U. Peters, S. Berndt, H. Brenner, K. Butterbach *et al.*, 2014 Estimating the heritability of colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 23: 3898-3905.
- Jonker, D. J., C. J. O'Callaghan, C. S. Karapetis, J. R. Zalcborg, D. Tu *et al.*, 2007 Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 357: 2040-2048.
- Jorge, P. M., I. M. de Oliveira, E. C. Filippi Chiela, C. M. Viau, J. Saffi *et al.*, 2015 Diphenyl ditelluride-induced cell cycle arrest and apoptosis: a relation with topoisomerase I inhibition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 116: 273-280.
- Kalechman, Y., U. Gafer, J. P. Da, M. Albeck, D. Alarcon-Segovia *et al.*, 1997 Delay in the onset of systemic lupus erythematosus following treatment with the immunomodulator AS101: association with IL-10 inhibition and increase in TNF-alpha levels. *J Immunol* 159: 2658-2667.
- Kalechman, Y., U. Gafer, T. Weinstein, A. Chagnac, I. Freidkin *et al.*, 2004 Inhibition of interleukin-10 by the immunomodulator AS101 reduces mesangial cell proliferation in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis: association with dephosphorylation of STAT3. *J Biol Chem* 279: 24724-24732.
- Kalechman, Y., A. Shani, S. Dovrat, J. K. Whisnant, K. Mettinger *et al.*, 1996 The antitumoral effect of the immunomodulator AS101 and paclitaxel (Taxol) in a murine model of lung adenocarcinoma. *J Immunol* 156: 1101-1109.
- Kell, D. B., 2010 Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Arch Toxicol* 84: 825-889.
- Kelloff, G. J., J. A. Crowell, V. E. Steele, R. A. Lubet, W. A. Malone *et al.*, 2000 Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J Nutr* 130: 467S-471S.
- Kessi, J., and K. W. Hanselmann, 2004 Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by

- Rhodospirillum rubrum and Escherichia coli. *J Biol Chem* 279: 50662-50669.
- Kim, D. H., R. A. Kanaly and H. G. Hur, 2012 Biological accumulation of tellurium nanorod structures via reduction of tellurite by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bioresour Technol* 125: 127-131.
- Kirkegaard, K., and J. C. Wang, 1985 Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J Mol Biol* 185: 625-637.
- Klein, C. E., E. Gupta, J. M. Reid, P. J. Atherton, J. A. Sloan *et al.*, 2002 Population pharmacokinetic model for irinotecan and two of its metabolites, SN-38 and SN-38 glucuronide. *Clin Pharmacol Ther* 72: 638-647.
- Komiya, Y., and R. Habas, 2008 Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4: 68-75.
- Krafft, F. L., R. E., 1894 Ueber Diphenyltellurid und ein Verfahren zur Darstellung von Sulfidon, Seleniden und Telluriden. *EurJIC* 27: 1768-1773.
- Kuipers, E. J., W. M. Grady, D. Lieberman, T. Seufferlein, J. J. Sung *et al.*, 2015 Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers* 1: 15065.
- Kuipers, E. J., T. Rosch and M. Bretthauer, 2013 Colorectal cancer screening--optimizing current strategies and new directions. *Nat Rev Clin Oncol* 10: 130-142.
- Kunimoto, T., K. Nitta, T. Tanaka, N. Uehara, H. Baba *et al.*, 1987 Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors. *Cancer Res* 47: 5944-5947.
- Larner, A. J., 1995 How does garlic exert its hypocholesterolaemic action? The tellurium hypothesis. *Med Hypotheses* 44: 295-297.
- Lasser, R., and R. Weiss, 1924 Über selenhaltige aromatische Verbindungen (VI). *Chem. Ges.* 57: 1077-1082.
- Lederer, K., 1915 Einwirkung von Phenylmagnesiumbromid auf Telluridhalogene. *Ber. Dtsch. Chem. Ges* 27: 1768-1773.
- Leggett, B. A., B. Devereaux, K. Biden, J. Searle, J. Young *et al.*, 2001 Hyperplastic polyposis: association with colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 25: 177-184.
- Lenz, H. J., 2007 Prognostic/Predictive molecular markers in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 1: S29-32.
- LiverTox, 2012 Irinotecan in LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. LiverTox.
- Lobanov, A. V., D. L. Hatfield and V. N. Gladyshev, 2009 Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1424-1428.
- Lopez-Lazaro, M., E. Willmore, S. L. Elliott and C. A. Austin, 2008 Selenite induces topoisomerase I and II-DNA complexes in K562 leukemia cells. *Int J Cancer* 123: 2217-2221.

- Mackenzie, P. I., K. W. Bock, B. Burchell, C. Guillemette, S. Ikushiro *et al.*, 2005 Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 15: 677-685.
- Mah, L. J., A. El-Osta and T. C. Karagiannis, 2010 gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24: 679-686.
- Makondi, P. T., C. M. Chu, P. L. Wei and Y. J. Chang, 2017 Prediction of novel target genes and pathways involved in irinotecan-resistant colorectal cancer. *PLoS One* 12: e0180616.
- Marzi, L., K. Agama, J. Murai, S. Difilippantonio, A. James *et al.*, 2018 Novel Fluoroindenoisoquinoline Non-Camptothecin Topoisomerase I Inhibitors. *Mol Cancer Ther* 17: 1694-1704.
- Masi, G., F. Loupakis, L. Salvatore, L. Fornaro, C. Cremolini *et al.*, 2010 Bevacizumab with FOLFOXIRI (irinotecan, oxaliplatin, fluorouracil, and folinate) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a phase 2 trial. *Lancet Oncol* 11: 845-852.
- Mathijssen, R. H., R. J. van Alphen, J. Verweij, W. J. Loos, K. Nooter *et al.*, 2001 Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 7: 2182-2194.
- Mathonnet, M., A. Perraud, N. Christou, H. Akil, C. Melin *et al.*, 2014 Hallmarks in colorectal cancer: angiogenesis and cancer stem-like cells. *World J Gastroenterol* 20: 4189-4196.
- McNaughton, M., L. Engman, A. Birmingham, G. Powis and I. A. Cotgreave, 2004 Cyclodextrin-derived diorganyl tellurides as glutathione peroxidase mimics and inhibitors of thioredoxin reductase and cancer cell growth. *J Med Chem* 47: 233-239.
- Mead, L. D., and W. J. Giesm, 1901 PHYSIOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL EFFECTS OF TELLURIUM COMPOUNDS, WITH A SPECIAL STUDY OF THEIR INFLUENCE ON NUTRITION. *Am J Physiol* 5: 104-149.
- Medema, J. P., 2013 Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol* 15: 338-344.
- Meotti, F. C., V. C. Borges, G. Zeni, J. B. Rocha and C. W. Nogueira, 2003 Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett* 143: 9-16.
- Michael, M., M. Brittain, J. Nagai, R. Feld, D. Hedley *et al.*, 2004 Phase II study of activated charcoal to prevent irinotecan-induced diarrhea. *J Clin Oncol* 22: 4410-4417.
- Miknyoczki, S. J., S. Jones-Bolin, S. Pritchard, K. Hunter, H. Zhao *et al.*, 2003 Chemopotentiation of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2: 371-382.
- Miyoshi, Y., H. Nagase, H. Ando, A. Horii, S. Ichii *et al.*, 1992 Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1: 229-233.

- Morris-Schaffer, K., and M. J. McCoy, 2020 A Review of the LD50 and Its Current Role in Hazard Communication. *ACS Chem. Health Saf.* 28: 25-33.
- Morris, E. J., and H. M. Geller, 1996 Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *J Cell Biol* 134: 757-770.
- Munn, L. E., and B. S. Hopkins, 1925 Studies on Tellurium the Value of Some Tellurium Compounds as Disinfectants. *J Bacteriol* 10: 79-86.
- Nagasaka, T., H. Mishima, A. Sawaki, M. Shimokawa, M. Inukai *et al.*, 2016 Protocol of a randomised phase III clinical trial of sequential capecitabine or 5-fluorouracil plus bevacizumab (Cape/5-FU-Bmab) to capecitabine or 5-fluorouracil plus oxaliplatin plus bevacizumab (CapeOX/mFOLFOX6-Bmab) versus combination CapeOX/mFOLFOX6-Bmab in advanced colorectal cancer: the C-cubed (C3) study. *BMJ Open* 6: e011454.
- Nagtegaal, I. D., R. D. Odze, D. Klimstra, V. Paradis, M. Rugge *et al.*, 2020 The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology* 76: 182-188.
- Naor, Y., M. Hayun, B. Sredni and J. Don, 2013 Multiple signal transduction pathways are involved in G2/M growth arrest and apoptosis induced by the immunomodulator AS101 in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 54: 160-166.
- Nassar, D., and C. Blanpain, 2016 Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol* 11: 47-76.
- Naziroglu, M., K. Yildiz, B. Tamturk, I. Erturan and M. Flores-Arce, 2012 Selenium and psoriasis. *Biol Trace Elem Res* 150: 3-9.
- Nitiss, J. L., 2009 Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 9: 338-350.
- Nogueira, C. W., and J. B. Rocha, 2011 Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol* 85: 1313-1359.
- Orian, L., and S. Toppo, 2014 Organochalcogen peroxidase mimetics as potential drugs: a long story of a promise still unfulfilled. *Free Radic Biol Med* 66: 65-74.
- Padget, K., R. Carr, A. D. Pearson, M. J. Tilby and C. A. Austin, 2000 Camptothecin-stabilised topoisomerase I-DNA complexes in leukaemia cells visualised and quantified in situ by the TARDIS assay (trapped in agarose DNA immunostaining). *Biochem Pharmacol* 59: 629-638.
- Papamichael, D., R. A. Audisio, B. Glimelius, A. de Gramont, R. Glynne-Jones *et al.*, 2015 Treatment of colorectal cancer in older patients: International Society of Geriatric Oncology (SIOG) consensus recommendations 2013. *Ann Oncol* 26: 463-476.
- Paulik, A., J. Grim and S. Filip, 2012 Predictors of irinotecan toxicity and efficacy in treatment of metastatic colorectal cancer. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 55: 153-159.

- Paumier, C., and J. E. Baldwin, 1986 Selenium Reagents & Intermediates in Organic Synthesis. Pergamon 4.
- Perez, E. A., A. Awada, J. O'Shaughnessy, H. S. Rugo, C. Twelves *et al.*, 2015 Etirinotecan pegol (NKTR-102) versus treatment of physician's choice in women with advanced breast cancer previously treated with an anthracycline, a taxane, and capecitabine (BEACON): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 16: 1556-1568.
- Petragnani, N., and J. V. Comasseto, 1991a Tellurium reagents in organic synthesis: Recent advances, Part 1. *Synthesis* 1: 794-810.
- Petragnani, N., and J. V. Comasseto, 1991b Tellurium reagents in organic synthesis: Recent advances, Part 2. *Synthesis* 1: 897-919.
- Petragnani, N. C., J.V., 1991 Tellurium Reagents in Organic Synthesis; Recent Advances. Part 2. *Synthesis*: 897–919.
- Petragnani, N. S., H., 2007 Tellurium in Organic Synthesis 2nd Edition. Academic Press.
- Pommier, Y., 2006 Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 6: 789-802.
- Pommier, Y., 2013 Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol* 8: 82-95.
- Pommier, Y., E. Leo, H. Zhang and C. Marchand, 2010 DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol* 17: 421-433.
- Pommier, Y., Y. Sun, S. N. Huang and J. L. Nitiss, 2016 Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 703-721.
- Powell, S. M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T. M. Bryan, S. R. Hamilton *et al.*, 1992 APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359: 235-237.
- Rawla, P., T. Sunkara and A. Barsouk, 2019 Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol* 14: 89-103.
- Rayman, M. P., 2012 Selenium and human health. *Lancet* 379: 1256-1268.
- Rees, K., L. Hartley, C. Day, N. Flowers, A. Clarke *et al.*, 2013 Selenium supplementation for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 1: CD009671.
- Reisert, W., 1884 The so-called bismuth breath. *Am J Pharm* 56: 177-180.
- Rezanka, T., and K. Sigler, 2008 Biologically active compounds of semi-metals. *Phytochemistry* 69: 585-606.
- Riemsma, R., J. P. Simons, Z. Bashir, C. L. Gooch and J. Kleijnen, 2010 Systematic Review of topotecan (Hycamtin) in relapsed small cell lung cancer. *BMC Cancer* 10: 436.
- Rigobello, M. P., V. Gandin, A. Folda, A. K. Rundlof, A. P. Fernandes *et al.*, 2009 Treatment of human cancer cells with selenite or tellurite in combination

- with auranofin enhances cell death due to redox shift. *Free Radic Biol Med* 47: 710-721.
- Rivory, L. P., and J. Robert, 1995 Molecular, cellular, and clinical aspects of the pharmacology of 20(S)camptothecin and its derivatives. *Pharmacol Ther* 68: 269-296.
- Rosen, L. S., I. A. Jacobs and R. L. Burkes, 2017 Bevacizumab in Colorectal Cancer: Current Role in Treatment and the Potential of Biosimilars. *Target Oncol* 12: 599-610.
- Rosenblatt-Bin, H., Y. Kalechman, A. Vonsover, R. H. Xu, J. P. Da *et al.*, 1998 The immunomodulator AS101 restores T(H1) type of response suppressed by *Babesia rodhaini* in BALB/c mice. *Cell Immunol* 184: 12-25.
- Rossato, J. I., L. A. Ketzner, F. B. Centuriao, S. J. Silva, D. S. Ludtke *et al.*, 2002 Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res* 27: 297-303.
- Rothenberg, M. L., 1997 Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann Oncol* 8: 837-855.
- Rubino, F. M., 2015 Toxicity of Glutathione-Binding Metals: A Review of Targets and Mechanisms. *Toxics* 3: 20-62.
- Rustin, G., I. Vergote, J. P. Michal, L. R. Duska, N. Reed *et al.*, 2017 A multicenter, open-label, expanded phase 2 study to evaluate the safety and efficacy of etirinotecan pegol, a polymer conjugate of irinotecan, in women with recurrent platinum-resistant or refractory ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 147: 276-282.
- Sailer, B. L., N. Liles, S. Dickerson and T. G. Chasteen, 2003 Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Arch Toxicol* 77: 30-36.
- Sailer, B. L., N. Liles, S. Dickerson, S. Sumners and T. G. Chasteen, 2004 Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicol In Vitro* 18: 475-482.
- Saltz, L. B., J. V. Cox, C. Blanke, L. S. Rosen, L. Fehrenbacher *et al.*, 2000 Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 343: 905-914.
- Sanchez-Gundin, J., A. M. Fernandez-Carballido, L. Martinez-Valdivieso, D. Barreda-Hernandez and A. I. Torres-Suarez, 2018 New Trends in the Therapeutic Approach to Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Med Sci* 15: 659-665.
- Schiar, V. P., D. B. Dos Santos, M. W. Paixao, C. W. Nogueira, J. B. Rocha *et al.*, 2009 Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: a possible involvement of reactive oxygen species. *Chem Biol Interact* 177: 28-33.
- Schoen, R. E., A. Razzak, K. J. Yu, S. I. Berndt, K. Firl *et al.*, 2015 Incidence and mortality of colorectal cancer in individuals with a family history of colorectal cancer. *Gastroenterology* 149: 1438-1445 e1431.

- Shimokawa, M., Y. Ohta, S. Nishikori, M. Matano, A. Takano *et al.*, 2017 Visualization and targeting of LGR5(+) human colon cancer stem cells. *Nature* 545: 187-192.
- Siegel, R. L., K. D. Miller, S. A. Fedewa, D. J. Ahnen, R. G. S. Meester *et al.*, 2017 Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67: 177-193.
- Siegel, R. L., K. D. Miller, A. Goding Sauer, S. A. Fedewa, L. F. Butterly *et al.*, 2020 Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 70: 145-164.
- Sigma-Aldrich, 2021 Diphenyl ditelluride.
- Sithanandam, G., W. Kolch, F. M. Duh and U. R. Rapp, 1990 Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies. *Oncogene* 5: 1775-1780.
- Soriano-Garcia, M., 2004 Organoselenium compounds as potential therapeutic and chemopreventive agents: a review. *Curr Med Chem* 11: 1657-1669.
- Souza, A. C., E. C. Stangherlin, A. P. Ardais and C. W. Nogueira, 2010 Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride: neurotoxic effect in brain of young rats, in vitro. *Mol Cell Biochem* 340: 179-185.
- Sparreboom, A., A. C. Wolff, R. H. Mathijssen, E. Chatelut, E. K. Rowinsky *et al.*, 2007 Evaluation of alternate size descriptors for dose calculation of anticancer drugs in the obese. *J Clin Oncol* 25: 4707-4713.
- Sredni, B., 2012 Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. *Semin Cancer Biol* 22: 60-69.
- Sredni, B., M. Albeck, T. Tichler, A. Shani, J. Shapira *et al.*, 1995 Bone marrow-sparing and prevention of alopecia by AS101 in non-small-cell lung cancer patients treated with carboplatin and etoposide. *J Clin Oncol* 13: 2342-2353.
- Sredni, B., T. Tichler, A. Shani, R. Catane, B. Kaufman *et al.*, 1996 Predominance of TH1 response in tumor-bearing mice and cancer patients treated with AS101. *J Natl Cancer Inst* 88: 1276-1284.
- Stangherlin, E. C., A. P. Ardais, J. B. Rocha and C. W. Nogueira, 2009 Exposure to diphenyl ditelluride, via maternal milk, causes oxidative stress in cerebral cortex, hippocampus and striatum of young rats. *Arch Toxicol* 83: 485-491.
- Stangherlin, E. C., A. M. Favero, G. Zeni, J. B. Rocha and C. W. Nogueira, 2005 Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. *Toxicology* 207: 231-239.
- Stangherlin, E. C., A. M. Favero, G. Zeni, J. B. Rocha and C. W. Nogueira, 2006 Exposure of mothers to diphenyl ditelluride during the suckling period changes behavioral tendencies in their offspring. *Brain Res Bull* 69: 311-317.
- Stivers, J. T., T. K. Harris and A. S. Mildvan, 1997 Vaccinia DNA topoisomerase I: evidence supporting a free rotation mechanism for DNA supercoil relaxation. *Biochemistry* 36: 5212-5222.
- Sullivan, K. M., and P. S. Kozuch, 2011 Impact of KRAS Mutations on Management of Colorectal Carcinoma. *Patholog Res Int* 2011: 219309.

- Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram *et al.*, 2021 Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71: 209-249.
- Syed, Y. Y., and K. McKeage, 2015 Aflibercept: A Review in Metastatic Colorectal Cancer. *Drugs* 75: 1435-1445.
- Takano, M., and T. Sugiyama, 2017 UGT1A1 polymorphisms in cancer: impact on irinotecan treatment. *Pharmgenomics Pers Med* 10: 61-68.
- Tanaka, T., H. D. Halicka, X. Huang, F. Traganos and Z. Darzynkiewicz, 2006 Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle* 5: 1940-1945.
- Taylor, A., 1996 Biochemistry of tellurium. *Biol Trace Elem Res* 55: 231-239.
- Tewey, K. M., T. C. Rowe, L. Yang, B. D. Halligan and L. F. Liu, 1984 Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 226: 466-468.
- Thyagarajan, A., and R. P. Sahu, 2018 Potential Contributions of Antioxidants to Cancer Therapy: Immunomodulation and Radiosensitization. *Integr Cancer Ther* 17: 210-216.
- Tomasini, P. P., T. N. Guecheva, N. M. Leguisamo, S. Pericart, A. C. Brunac *et al.*, 2021 Analyzing the Opportunities to Target DNA Double-Strand Breaks Repair and Replicative Stress Responses to Improve Therapeutic Index of Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 13.
- Trindade, C., A. L. Juchem, N. R. de Albuquerque, I. M. de Oliveira, R. M. Rosa *et al.*, 2015 Antigenotoxic and antimutagenic effects of diphenyl ditelluride against several known mutagens in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutagenesis* 30: 799-809.
- Trindade, C., A. L. M. Juchem, T. N. Guecheva, I. M. de Oliveira, P. Dos Santos Silveira *et al.*, 2019 Diphenyl Ditelluride: Redox-Modulating and Antiproliferative Properties. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 2510936.
- Turner, R. J., Y. Aharonowitz, J. H. Weiner and D. E. Taylor, 2001 Glutathione is a target in tellurite toxicity and is protected by tellurite resistance determinants in *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 47: 33-40.
- Valdivia-Gonzalez, M., J. M. Perez-Donoso and C. C. Vasquez, 2012 Effect of tellurite-mediated oxidative stress on the *Escherichia coli* glycolytic pathway. *Biometals* 25: 451-458.
- Van Cutsem, E., A. Cervantes, B. Nordlinger, D. Arnold and E. G. W. Group, 2014 Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 25 Suppl 3: iii1-9.
- van de Velde, C. J., P. G. Boelens, P. J. Tanis, E. Espin, P. Mroczkowski *et al.*, 2014 Experts reviews of the multidisciplinary consensus conference colon and rectal cancer 2012: science, opinions and experiences from the experts of surgery. *Eur J Surg Oncol* 40: 454-468.

- van der Stok, E. P., M. C. W. Spaander, D. J. Grunhagen, C. Verhoef and E. J. Kuipers, 2017 Surveillance after curative treatment for colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 14: 297-315.
- van Es, H. H., A. Bout, J. Liu, L. Anderson, A. M. Duncan *et al.*, 1993 Assignment of the human UDP glucuronosyltransferase gene (UGT1A1) to chromosome region 2q37. *Cytogenet Cell Genet* 63: 114-116.
- van Gijn, W., C. A. Marijnen, I. D. Nagtegaal, E. M. Kranenbarg, H. Putter *et al.*, 2011 Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol* 12: 575-582.
- Vavrova, S., E. Struharnanska, J. Turna and S. Stuchlik, 2021 Tellurium: A Rare Element with Influence on Prokaryotic and Eukaryotic Biological Systems. *Int J Mol Sci* 22.
- Vij, P., and D. Hardej, 2012 Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non-transformed human colon cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 34: 768-782.
- Vodenkova, S., T. Buchler, K. Cervena, V. Veskrnova, P. Vodicka *et al.*, 2020 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther* 206: 107447.
- Wagner-Recio, M., A. D. Toews and P. Morell, 1991 Tellurium blocks cholesterol synthesis by inhibiting squalene metabolism: preferential vulnerability to this metabolic block leads to peripheral nervous system demyelination. *J Neurochem* 57: 1891-1901.
- Wainberg, Z., and J. R. Hecht, 2006 Panitumumab in colon cancer: a review and summary of ongoing trials. *Expert Opin Biol Ther* 6: 1229-1235.
- Walko, C. M., and C. Lindley, 2005 Capecitabine: a review. *Clin Ther* 27: 23-44.
- Wallace, B. D., H. Wang, K. T. Lane, J. E. Scott, J. Orans *et al.*, 2010 Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science* 330: 831-835.
- Wang-Gillam, A., C. P. Li, G. Bodoky, A. Dean, Y. S. Shan *et al.*, 2016 Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 387: 545-557.
- Wang, J. C., 1971 Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol* 55: 523-533.
- Wang, J. C., 2002 Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 430-440.
- Ward, I. M., and J. Chen, 2001 Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276: 47759-47762.
- Watson, J. D., and F. H. Crick, 1953 Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171: 964-967.
- Weeks, M. E., 1935 The discovery of tellurium. *J. Chem. Educ* 12: 403.

- Weeks, M. E., 1957 Discovery of the Elements. *Journal of Chemical Education* 41: 240-241.
- Wilhelm, S. M., J. Dumas, L. Adnane, M. Lynch, C. A. Carter *et al.*, 2011 Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer* 129: 245-255.
- Willett, C. G., Y. Boucher, E. di Tomaso, D. G. Duda, L. L. Munn *et al.*, 2004 Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 10: 145-147.
- Wood, J. P., A. J. Smith, K. J. Bowman, A. L. Thomas and G. D. Jones, 2015 Comet assay measures of DNA damage as biomarkers of irinotecan response in colorectal cancer in vitro and in vivo. *Cancer Med* 4: 1309-1321.
- Xie, R., R. H. Mathijssen, A. Sparreboom, J. Verweij and M. O. Karlsson, 2002 Clinical pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites: a population analysis. *J Clin Oncol* 20: 3293-3301.
- Xu, R., Y. Kalechman, M. Albeck, H. Kung and B. Sredni, 1996 Inhibition of B16 melanoma metastasis by the immunomodulator AS101. *Int J Oncol* 9: 319-325.
- Yang, C. F., H. M. Shen and C. N. Ong, 2000 Ebselen induces apoptosis in HepG(2) cells through rapid depletion of intracellular thiols. *Arch Biochem Biophys* 374: 142-152.
- Yu, J., R. Miller, W. Zhang, M. Sharma, V. Holtschlag *et al.*, 2008 Copy-number analysis of topoisomerase and thymidylate synthase genes in frozen and FFPE DNAs of colorectal cancers. *Pharmacogenomics* 9: 1459-1466.
- Zeiser, F., 1895 Ueber einige schwefel-, selen- und tellurhaltige Ditolylderbindungen. *EurJIC* 28: 1670-1675.
- Zeman, M. K., and K. A. Cimprich, 2014 Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 16: 2-9.
- Zhao, H., H. G. Lu, Y. B. Shi, L. M. Zhao, C. Bai *et al.*, 2006 Role of enteral nutrition supplemented with ebselen and EHEC in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction in rats. *Inflamm Res* 55: 423-429.
- Zhou, N., H. Xiao, T. K. Li, E. K. A. Nur and L. F. Liu, 2003 DNA damage-mediated apoptosis induced by selenium compounds. *J Biol Chem* 278: 29532-29537.