



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO E ANTIMUTAGÊNICO DO
DITELURETO DE DIFENILA EM FIBROBLASTOS DE PULMÃO DE HAMSTER
CHINÊS V79

Dissertação de Mestrado

Cristiano Trindade

Porto Alegre

2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO E ANTIMUTAGÊNICO DO
DITELURETO DE DIFENILA EM FIBROBLASTOS DE PULMÃO DE HAMSTER
CHINÊS V79

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular
da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciências

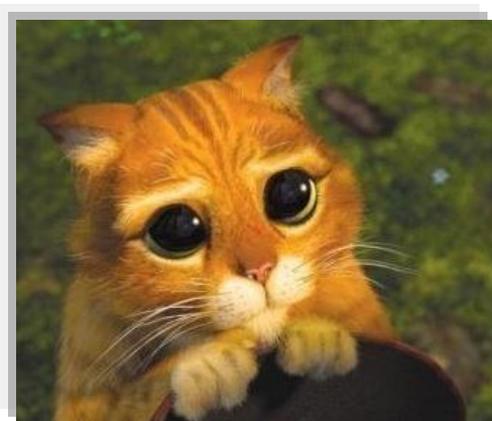
CRISTIANO TRINDADE

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques
Prof^a. Dr^a. Jenifer Saffi

Porto Alegre, 2012

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi subsidiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) - PRONEX/FAPERGS/CNPq (nº 10/0044-3) e pelo – Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Royal, Unidade GENOTOX-ROYAL, Centro de Biotecnologia/Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A redação da dissertação fundamentou-se nas recomendações do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, desta Universidade.

***"Para que levar a vida tão a sério
se ela é uma incansável batalha
da qual jamais sairemos vivos"
Bob Marley***



*Dedico esse trabalho as pessoas que
todo dia me dão apoio e força
para alcançar meus sonhos,
Meus pais **Paulo e Sandra**
E a minha irmã **Natália**.
Pelo amor e apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

No final desta etapa, são muitos os amigos e colegas a quem gostaria de agradecer o auxílio, estímulo e companheirismo. Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente, para realização e concretização deste trabalho.

Ao mestre e professor João Antonio Pêgas Henriques, pela oportunidade ÚNICA de aprendizado e total confiança depositada em mim durante esses 2-3 anos e pela amizade. Dispensa comentários como pesquisador, é um imortal, mas é sem dúvida nenhuma uma grande pessoa, e sempre disposto a ajudar e dar condições para que possamos alcançar os objetivos do projeto e de vida. Agradeço pela compreensão e acima de tudo pela preocupação. Sem dúvida nenhuma é uma honra poder trabalhar com uma pessoa desse nível.

A prof^a Jenifer Saffi por todo apoio, confiança, ensinamentos e colaboração ao longo desses dois anos.

A “Temenucha”, ops, digo Prof^a Temenouga Nikolova Guecheva, minha ‘co-co-orientadora’, por todo apoio e confiança depositada. Sem palavras por tudo que você é e fez por mim, meus sinceros agradecimentos.

Ao ‘Batuta’, ou melhor, Prof. Renato Moreira Rosa por ter-me ‘jogado’ no laboratório de Reparo de DNA – 210 e acreditado em mim, obrigado pela confiança, amizade e sem dúvida nenhuma pela parceria para “tomar uma gelada na CB”.

Após eu ter sido ‘jogado’ no lab-210, tenho que agradecer ao grande amigo “Mestre Fruta” (Iuri Marques de Oliveira) por ter me ajudado a engatinhar no mundo da ciência. Grande pessoa, a qual sem dúvida foi muito importante para o andamento desse projeto. Agradeço pela amizade, confiança, conversas e besteiras faladas e feitas ao longo desses anos. ‘TU VE’.

Com certeza tenho que agradecer ao meu ‘Cavalo’, meu bolsista de iniciação científica (André Luis Mendes Juchem), pessoa da qual pego junto no projeto e não arrio as perna...hehehe. Cara, valeu ai por toda sua ajuda, disponibilidade e amizade.

A mais nova bolsita Nathália Rammé Medeiros de Albuquerque, por toda ajuda e disponibilidade nessa reta final de trabalho.

Ao meu grande amigo “Craudio Surfistinha” (Cláudio), valeu ai pela amizade, festas e conversas, o que falar de você ‘a sensação é zero/nula’... Hahaha, baita amigo.

A todos colegas e amigos do laboratório 210, a dentista Tati (senhorita MN) muito obrigado por sua amizade e por tudo num geral, (as ‘muchachas colombianas’ – ‘Bic’ (Victória) por todas conversas e guerrinhas de pissetas no lab, ‘Grétin – conga la conga’ (Grethel) hahaha e a média chica Lyda – muchas gracias “*chiquitas*” por tudo, a Tianáá’ (Diana) por sua amizade, conversas e parcerias para tomar uma “cervejinha”, a Michelli (Bricho), Larissa, Fernanda, Lauren, Patrícia, Juliane e a Ana Arigony por sua simpatia e todas conversas astro não sei o que..heheh e cafés passado no lab com certeza.

A todos amigos que já saíram do ‘ninho’, Renata, Fabrício, Dinara e também aos colegas do laboratório da UFCSPA, ao ‘secretário’ – Roberto, a Jaque, Angelo, Bruna I e Bruna C e todos os outros que por algum motivo não foram mencionados, até porque são tantos.

A todo departamento de biofísica, em especial para Jussara, Iranez, Rosane, Dona Helena, Dona Zelma e aos prof Eduardo, Kátia, Ana Lígia e Angélica.

Aos funcionários e professores do PPGBCM, em especial à Silvia e ao Luciano.

A toda família GENOTOX-ROYAL, pela oportunidade, apoio, confiança e amizade, muitíssimo obrigado a todas vocês! (Miriam, Izabel, Miriana, Jaque, Márcia, Rose, Tamiris, Luíza, Paula, Flávia e Adriana).

A toda minha família, que sempre me deu apoio e força para seguir, em especial em memória de meu vô Elói Lautert, resumiria sua pessoa em uma palavra – guerreiro.

Finalmente, as pessoas mais importantes de minha vida: meus pais PAULO CÉSAR TRINDADE e SANDRA INÊS TRINDADE, e minha irmã Natália, pessoas as quais levarei sempre comigo em meu coração e como exemplo de vida, pelo carinho, amor, amizade, compreensão e força para concluir mais uma etapa. Obrigado por tudo, palavras não são o suficiente para descrever todo amor que sinto por vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Telúrio	14
1.2 Efeitos biológicos dos compostos organotelurados	15
1.3 Propriedades farmacológicas dos compostos organotelurados	16
1.4 O ditelureto de difenila	19
1.5 Doxorubicina	22
1.6 Estresse oxidativo.....	23
1.6.1 Danos oxidativos no DNA.....	26
1.6.2 Danos oxidativos em lipídeos.....	27
1.7 Principais defesas antioxidantes.....	28
2. Objetivos.....	31
2.1 - Objetivo geral	31
2.2 - Objetivos específicos	31
3. Capítulo I - Antigenotoxic and antimutagenic effects of diphenyl diteluride against several known mutagens in Chinese Hamster V79 cells.....	32
4. Discussão.....	63
5. Conclusões.....	69
5.1 - Conclusão geral	69
5.2 - Conclusões específicas	69

6. Perspectivas.....	70
7. Referências bibliográficas	71
8. Anexos.....	80
9. <i>Curriculun vitae</i>	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CAT	catalase
DTDF	ditelureto de difenila
Endo III	endonuclease III
ERO	espécies reativas de oxigênio
DI	índice de danos
DOX	doxorubicina
Fpg	formamidopirimidina DNA-glicosilase
GPx	glutathiona peroxidase
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
MMS	metil metano sulfonato
MN	micronúcleo
NDI	índice de divisão celular
ODS	contagem de danos oxidativos
OT	organotelurado
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
SOD	superóxido dismutase
Te	telúrio
δ-ALA-D	enzima δ-aminolevulinato-desidratase

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: <i>Tellus</i> (Deusa da Terra)	14
Figura 2: Mecanismo catalítico proposto para a atividade neutralizadora de peroxinitrito dos compostos organotelurados.....	18
Figura 3: Estrutura química do ditelureto de difenila.....	19
Figura 4: Fontes geradoras de ERO.....	25
Figura5: Fontes endógenas e exógenas de ERO e defesas antioxidantes.....	26
Figura 6: Principais modificações das bases do DNA provocadas por lesões oxidativas....	27
Figura 7: Reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pela SOD.....	29
Figura 8: Reação de dismutação do H_2O_2 pela CAT.....	30
Figura 9: Reação da CAT como peroxidase	30

RESUMO

O presente estudo avaliou as propriedades antígenotóxicas e antimutagênicas do Ditelureto de Difenila (DTDF) contra diversos mutágenos em fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (V79). O DTDF não foi citotóxico e genotóxico em concentrações entre 0,01 – 0,5 µmol. O pré-tratamento com esse composto organotelurado nas concentrações não citotóxicas (0,01, 0,05 e 0,1 µmol) aumentou a viabilidade celular após a exposição ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂), tert butil hidroperóxido (*t*-BOOH), metil metano sulfonato (MMS) ou radiação UV C. Além disso, o pré-tratamento com o DTDF diminuiu os danos no DNA e a indução de bases oxidadas por todos os agentes genotóxicos estudados, como pode ser verificado pelo ensaio cometa alcalino e ensaio cometa modificado, respectivamente. O pré-tratamento também reduziu a frequência de micronucleus, revelando um efeito protetor do DTDF contra os dois agentes mutagênicos testados, MMS ou UV C. Os nossos resultados demonstraram que as células tratadas com o DTDF nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1 µmol não aumentaram os níveis de TBARS e produção de ROS. Entretanto, observou-se um aumento da intensidade dos foci de ROS e na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) após o tratamento com o DTDF, sugerindo um efeito pró-oxidante desse composto. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram claramente que o DTDF em baixas concentrações apresenta propriedades antígenotóxicas e antimutagênicas. O efeito protetor observado pode ser atribuído a indução de uma resposta adaptativa em células V79 pelo pré-tratamento com o DTDF.

ABSTRACT

The present study evaluated antigenotoxic and antimutagenic properties of Diphenyl ditelluride (DPDT) against several known mutagens in Chinese hamster lung fibroblast (V79). DPDT was not cytotoxic and genotoxic at concentrations ranging from 0.01 to 0.5 μmol . The pre-treatment for 2h with this organotellurium compound at non-cytotoxic dose range (0.01, 0.05 and 0.1 μmol) increased cell survival after challenge with hydrogen peroxide (H_2O_2), t-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH), methyl-methanesulphonate (MMS), or UV C radiation. In addition, the pre-treatment with DPDT decreased the DNA damage and oxidized bases induction by the studied genotoxic agents, as verified in the comet assay and modified comet assay, respectively. The pre-treatment also reduced micronucleus frequency, revealing the protector effect of DPDT against MMS or UV C induced mutagenesis. Our results demonstrated that DPDT-treated cells at concentrations of 0.01, 0.05 and 0.1 μmol did not change TBARS levels and ROS generation. However, the observed increased intensity of ROS foci and increased superoxide dismutase activity (SOD) following DPDT treatment suggest pro-oxidative effect of this compound. Our results clearly demonstrate that DPDT at low concentrations presents antigenotoxic and antimutagenic properties. The probable mechanism of the protection effect could be induction of adaptive response in V79 cells by the DPDT pre-treatment.

1. Introdução

1.1 Telúrio



Figura 1: *Tellus* (Deusa da Terra)

O elemento telúrio é um semi-metal pertencente ao grupo 16 da tabela periódica, família dos calcogênios, assim como o oxigênio, enxôfre, polônio e o selênio. Pouco abundante na natureza, foi descoberto como telureto de ouro (calaverita) na Romênia em 1782 pelo químico austríaco Franz Joseph Müller Von Reichstein (Nogueira *et al.*, 2004). Posteriormente, em 1798, foi isolado pelo químico alemão Martin Heinrich Klaproth, quem lhe deu o nome, em homenagem à deusa da Terra (*Tellus* = terra) (Figura 1) (revisado por Chasteen *et al.* 2009). Na natureza, pode apresentar-se em diferentes estados de oxidação: Te^{+6} (telurato), Te^{+4} (telurito), Te^0 (telúrio elementar) e Te^{-2} (telureto) (Scansetti 1992), isto faz com que este elemento participe de uma grande variedade de composições e estruturas. É encontrado em muitos minérios, estando em maior frequência na forma de teluretos de ouro, bismuto, chumbo e prata (Zeni *et al.* 2003).

O primeiro composto orgânico de telúrio foi sintetizado por Friedrich Wöhler em 1840 a partir do telureto de sódio (Na_2Te) e $(\text{Et}_2\text{SO}_4)_2\text{Ba}$ em meio aquoso. Desde sua descoberta até metade do século XX, a química dos compostos organotelurados desenvolveu-se rapidamente. Nos dias atuais, esses compostos constituem novos interesses farmacológicos. Várias destas substâncias, com diferentes características e estruturas químicas, vêm sendo estudadas quanto às suas propriedades farmacológicas e toxicológicas (Nogueira *et al.* 2004; Rezanka & Sigler 2008).

Os compostos de telúrio são importantes na produção industrial de vidro e aço, bem como um aditivo anti-detonante na gasolina (Fairhill, 1969). Além disso, são utilizadas na produção de explosivos, na vulcanização da borracha, em lubrificantes sólidos, soluções oxidantes para polir metais e na indústria petroquímica (Fairhill, 1969; Taylor 1996). Recentemente, esse semi-metal vem sendo muito empregado na manufatura de semicondutores particulados, sistemas de energia fotovoltaica e outros componentes eletrônicos, como microchips e discos de DVD regraváveis (Green *et al.* 2007; Zhang &

Swihart, 2007; Wang *et al.* 2008). Possui também uma grande aplicação na indústria farmacêutica, sendo importante na síntese de fármacos (Friedman *et al.* 2009; Schiar *et al.* 2009).

O telúrio metálico está presente na composição de organismos vegetais, particularmente em membros da Família *Alliaceae*, em que o representante mais popular é o alho (Larner, 1995). Alguns estudos já demonstraram que pequenas quantidades de telúrio foram identificadas nos fluidos corporais, tais como sangue e urina (Siddik & Newman 1988; Newman *et al.* 1989). Estudos demonstraram também que esse elemento está presente na forma de telurocisteína e telurometionina em muitas proteínas de bactérias (Boles *et al.* 1995; Ogra *et al.* 2008), leveduras (Yu *et al.* 1993) e outros fungos (Ramadan *et al.* 1989). Contudo até o presente momento, proteínas contendo telúrio não foram identificadas em células animais. Por essa razão o telúrio não apresenta função fisiológica descrita até o momento, em mamíferos (Taylor 1996; Rezanka & Sigler 2008).

1.2 Efeitos biológicos dos compostos organotelurados

Existem poucos estudos sobre os efeitos biológicos de compostos organotelurados. Embora compostos organotelurados fossem considerados inicialmente menos tóxicos que derivados de selênio (Engman 1985), estudos recentes indicam o contrário (Nogueira *et al.* 2004; Chasteen *et al.* 2009). O estudo sistemático dos efeitos biológicos de diferentes classes de compostos organotelurados ainda está aberto para este ramo de investigação (Cunha *et al.* 2009). O telúrio pode ser prontamente absorvido pelo organismo, através da dieta, principalmente na forma de compostos orgânicos. Na forma de telureto de hidrogênio (H_2Te) pode estar ligado a proteínas e apresentar uma taxa de eliminação muito lenta (Cunha *et al.* 2009). Entretanto, a exposição e a absorção de telúrio inorgânico na forma de teluritos e teluratos também ocorrem (Taylor 1996; Ogra *et al.* 2008; Chasteen *et al.* 2009).

A toxicologia de compostos organotelurados tem sido estudada principalmente por métodos empíricos, baseados na toxicidade observada em animais, ou a avaliação em tecidos, ou ainda pela inibição do crescimento celular (Sailer *et al.* 2004; Cunha *et al.* 2005; Schiar *et al.* 2009). Embora as transformações bioquímicas, os mecanismos de ação e o significado biológico da exposição a estas substâncias sejam pouco conhecidos e caracterizados, há uma crescente preocupação em relação aos potenciais efeitos adversos

que este elemento pode causar (Meotti *et al.* 2003; Rezanka & Sigler 2008). Desta forma, o aumento no uso industrial do telúrio, tanto das suas formas orgânicas quanto inorgânicas, pode causar riscos ocupacionais e ambientais para a saúde humana (Meotti *et al.* 2003; Borges *et al.* 2007).

1.3 Propriedades farmacológicas dos compostos organotelurados

A história da busca de efeitos farmacodinâmicos em moléculas orgânicas contendo telúrio é relativamente recente, quando comparada com a farmacologia e toxicologia dos compostos organoselenados. É importante lembrar que a inspiração para os testes biológicos de compostos organotelurados baseia-se nos efeitos farmacodinâmicos de moléculas contendo selênio e da semelhança química existente entre esses dois elementos (Nogueira *et al.* 2004; Chasteen *et al.* 2009).

A primeira atividade farmacológica de um composto orgânico de telúrio foi descrita em 1824 por Gmelin. Entretanto, em 1987 Sredni *e col* demonstraram a primeira potente atividade imunomoduladora do composto organotelurado codificado como AS-101 (telurato de tricloro amônio-dioxoetileno-O,O') em camundongos, mediando efeitos antitumorais. Além desses efeitos, o AS-101 é capaz de estimular células linfóides a produzir citocinas como IL-1, IL-2, IL-10, TNF- α (Kozenitzky *et al.* 1992), podendo também restaurar a atividade de linfócitos T helper (Kalechman *et al.* 2004; Sredni-Kenigsbuch *et al.* 2008). Halperin-Sheinfeld e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento com o AS-101 ajuda a prevenir a diabetes tipo 2 em ratos, além disso, é o composto organotelurado mais estudado e possivelmente o único que foi utilizado em estudos clínicos de fase I e II em pacientes com câncer (para revisão ver Sredni 2012). Além dessas propriedades, compostos organotelurados apresentam ação bactericida, fungicida e inseticida (Kormutakova *et al.* 2000; Toptchieva *et al.* 2003; Castro *et al.* 2009).

A propriedade quimioprotetora dos compostos orgânicos de telúrio, proveniente de seus efeitos citotóxicos, começou a ser explorada por diversos grupos de pesquisa. Apesar da habilidade dos compostos de induzirem apoptose e alterações de outras naturezas a fim de causarem morte celular, um novo alvo para a pesquisa anticâncer vem sendo muito estudado, a enzima tiorredoxina redutase (TRXr). Esta enzima, responsável por fornecer equivalentes redutores (tiorredoxina - TRX-SH) às redutases de ribonucleotídeos, tem sua

expressão gênica aumentada nas células tumorais, auxiliando no crescimento celular (Oka *et al.* 2012). Engman e colaboradores (2000) sintetizaram diversos compostos análogos do ditelureto de difenila e observaram que alguns apresentaram boa resposta como inibidores da TRXr e inibidores do crescimento de células tumorais, provavelmente pela oxidação da enzima Catepsina B, levando a inativação da enzima e assim diminuindo o efeito metastático do tumor (Cunha *et al.* 2005). Compostos orgânicos de telúrio na forma de sais solúveis em água também foram avaliados, e mostraram-se os melhores inibidores da TRXr já testados. Apesar da hidrofiliabilidade dos compostos ter restringido a captação celular, foram bastante eficientes contra culturas de câncer de cólon (Engman *et al.* 2000).

O átomo de telúrio presente em compostos orgânicos é facilmente oxidado, o que torna estas substâncias aptas a agirem como antioxidantes e protegerem proteínas e lipídios contra o estresse oxidativo em vários sistemas (Kanski *et al.* 2001). O interesse nos estudos de estresse oxidativo e a busca de moléculas com atividade antioxidantes mais potentes que os agentes nucleofílicos clássicos também se voltou aos compostos orgânicos contendo telúrio em fins da década de 1990. Os compostos com natureza ditelureto de diarila, especialmente as moléculas contendo uma ou duas hidroxilas em orientação *para* e grupamentos metila em posições *orto* em relação ao telúrio, são eficientes em inibir a peroxidação lipídica iniciada por azocompostos em micelas de ácido linoleico em um sistema *in vitro* livre de células por meio de um mecanismo autocatalítico (Mugesh *et al.* 2001; Cunha *et al.* 2005).

Além destas importantes propriedades descritas acima, alguns compostos organotelurados são capazes de mimetizar a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) que, à custa de glutathione (GSH), neutraliza o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Devido a fundamental relevância no processo de envelhecimento e potencial uso de antioxidantes como prospectivas drogas para o uso em doenças relacionadas ao estresse oxidativo, diversos estudos tem sido realizados com compostos de selênio que mimetizam a atividade de GPx (Zheng *et al.* 2008; Sarma *et al.* 2010; de Souza Prestes *et al.* 2012). Convém salientar que a substituição de selênio por telúrio em diaril derivados melhora a atividade antioxidante (Cunha *et al.* 2005).

Em 1992 Engman e colaboradores demonstraram pela técnica de ressonância magnética nuclear, que muitos compostos derivados do ditelureto de diarila possuem atividade tiol peroxidase, produzindo dissulfetos e regenerando o diaril ditellureto.

Posteriormente, Andersson e colaboradores (1993) reportaram a atividade mimética da GPx de diaril teluretos, substituídos com moléculas doadoras de elétrons. Para tal, estes autores atribuíram que o efeito antioxidante destes compostos é devido à formação de teluróxido, resultante da oxidação do Te^{+2} à Te^{+4} , que seria novamente reduzido ao estado inicial pela GSH, em um mecanismo catalítico, neutralizando radicais livres e as espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (Andersson *et al.* 1993; Engman *et al.* 1994).

Os efeitos antioxidantes dos diteluretos de diarila também foram estudados em sistemas celulares *in vitro* em níveis crescentes de complexidade. Neste contexto, Wieslander e colaboradores (1998) mostraram que em presença de glutathiona, o telureto de bis(4-hidroxifenila), telureto de bis(4-amonifenila) e o telureto de bis(2-carboxifenila) reduziram em mais de 50% o efeito citotóxico do hidroperóxido de *tert*-butila em células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (células V79), quando foram utilizadas concentrações inferiores a 2 μmol .

Briviba e colaboradores (1998) reportaram a capacidade de compostos organotelurados em neutralizar o ONOO^- e propuseram um mecanismo catalítico para a neutralização de ONOO^- (**Figura 2**). Além disso, utilizando eritrócitos como modelo de estudo *in vitro* de danos oxidativos por espécies reativas de nitrogênio, mais especificamente o peroxinitrito (ONOO^-). Tiano e colaboradores (2000) demonstraram a capacidade de diferentes compostos derivados do diaril tellureto em neutralizar o ONOO^- e inibir a sua capacidade de nitosilar proteínas, também pela formação de teluróxido.

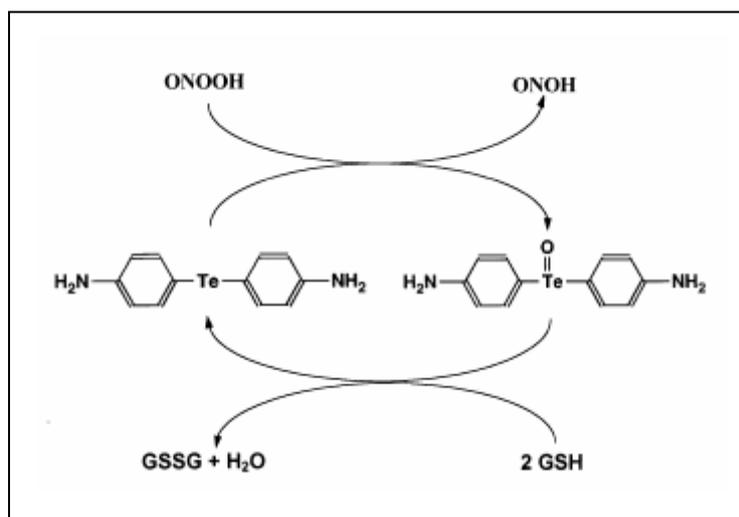


Figura 2: Mecanismo catalítico proposto para a atividade neutralizadora de peroxinitrito dos compostos organotelurados (adaptado de Briviba *et al.* 1998).

Recentemente, Ávila e colaboradores (2011) reportaram que o composto telureto vinílico apresenta efeitos hepatoprotetores em camundongos após a administração de acetaminofeno, reduzindo o estresse oxidativo por varredura de espécies reativas. Além disso, o telureto vinílico apresentou ação neuroprotetora contra ação neurotóxica Mn-induzida em ratos (Avila *et al.* 2010). Mais recentemente, Ávila e colaboradores (2012) mostraram que compostos organotelurados podem causar a translocação do fator de crescimento DAF-16 do citosol para o núcleo, reduzindo o estresse oxidativo induzido por Mn em *Caenorhabditis elegans*. Estes resultados sugerem que compostos organotelurados podem modular a via da DAF-16, induzindo a produção de enzimas antioxidantes que dependem desta via, como superóxido dismutase e glutatona peroxidase.

A atividade antioxidante dos compostos organotelurados é muito interessante, especialmente porque quando comparados com análogos contendo selênio, seus efeitos são mais pronunciados em faixas de concentrações muito menores, o que os torna excelentes candidatos a estudos farmacológicos e toxicológicos. Além disso, cada vez mais se comprova a forte relação entre a formação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e diversas doenças, tornando-se importante a pesquisa de novos e potentes agentes antioxidantes (Cunha *et al.* 2005; Chasteen *et al.* 2009).

1.4 O ditelureto de difenila

O ditelureto de difenila (DTDF) é um composto orgânico de telúrio, sólido, de peso molecular 409,41 g/mol e altamente hidrofóbico (Figura 3). É um importante intermediário em reações de síntese orgânica, em especial de drogas contendo telúrio (Muniz Alvarez *et al.* 2005). Esse composto tem sido estudado devido às suas propriedades toxicológicas e interessantes atividades farmacológicas, com fins ao desenvolvimento de novos fármacos organotelurados.

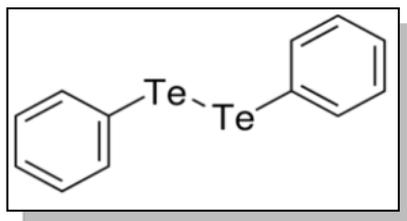


Figura 3: Estrutura química do ditelureto de difenila.

Em 1998, Barbosa e colaboradores observaram que o DTDF era capaz de inibir a atividade da enzima sulfidrílica δ -ALA-D *in vitro* em homogenado de fígado de ratos com IC_{50} de aproximadamente $10\mu\text{mol}$, que possui em seu sítio ativo dois resíduos cisteinil, os quais podem ser facilmente oxidados *in vitro* e *in vivo* (Barbosa *et al.* 1998; Maciel *et al.* 2000; Meotti *et al.* 2003; Nogueira *et al.* 2004). Esta inibição impede a continuação da cascata de síntese de grupamentos heme, importantes na síntese de hemoglobina, citocromos e catalase. Leva também ao acúmulo do substrato da δ -ALA-D, o ácido aminolevulínico, o qual promove uma condição pró-oxidante (Emanuelli *et al.* 2001; Goncalves *et al.* 2009). Embora tenha sido observada a inibição desta enzima *in vitro* em homogenado, o mesmo não ocorreu em folhas de abóbora, devido às diferenças entre a isoforma animal que possui dois resíduos cisteinil, e a vegetal, que possui apenas um. Maciel e colaboradores (2000) demonstraram a inibição da δ -ALA-D em fígado, cérebro e rim em camundongos após administração aguda de ditelureto de difenila na dose de $500\mu\text{mol/Kg}$, bem como inibição da enzima hepática e cerebral após exposição sub crônica (14 dias) nas doses de 10 e $25\mu\text{mol/Kg}$. Em outro estudo, foi verificada a inibição de 40% da atividade desta enzima em eritrócitos de camundongos após três dias de administração única de ditelureto de difenila na dose de $150\mu\text{mol/Kg}$ (Meotti *et al.* 2003). Nogueira e colaboradores (2003) observaram a inibição dessa enzima em eritrócitos humanos a partir da concentração de $4\mu\text{mol}$.

A capacidade do DTDF em perturbar a homeostase redox dos grupamentos tiólicos em proteínas é capaz de afetar uma série de enzimas importantes, uma vez que o mecanismo de oxidação de resíduos cisteinil é importante no controle e regulação da atividade enzimática em diversos processos celulares. O DTDF em altas concentrações inibiu a atividade da enzima Na^+K^+ ATPase, porém em concentrações menores que $4\mu\text{mol}$ aumentou a atividade da enzima Na^+K^+ ATPase em membrana plasmática proveniente de sinapses de córtex cerebral de ratos jovens, apresentando efeito dualístico (Borges *et al.* 2005). Esta enzima está presente na membrana celular e é responsável pelo transporte ativo de sódio e potássio nas células, especialmente no sistema nervoso central (Cereijido *et al.* 2012).

Em relação ao conhecimento dos efeitos do ditelureto de difenila em animais, vários efeitos neurotóxicos em roedores foram relatados. Entre eles, a acentuada vacuolização dos corpos celulares no cérebro, redução do peso cerebral, aumento dos

níveis de glutamato na fenda sináptica (Nogueira *et al.* 2001), aumento do influxo de cálcio em condições despolarizantes e hiperfosforilação de proteínas do citoesqueleto no córtex cerebral pelo aumento de atividade de cinases (Moretto *et al.* 2005; Funchal *et al.* 2006; Moretto *et al.* 2007). São relatadas ainda alterações na memória em ratos no modelo de reconhecimento de novos objetos (Stangherlin *et al.* 2005).

Existem evidências de toxicidade renal e hepática, observadas pelo aumento da atividade plasmática das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase que se tornam aumentadas quando há dano aos hepatócitos (Maciel *et al.* 2000; Meotti *et al.* 2003), como também de redução da excreção de creatinina e uréia, que conseqüentemente se tornam aumentadas no plasma (Barbosa *et al.* 1998; Maciel *et al.* 2000).

O DTDF possui potencial teratogênico em fetos de ratos, causando hidrocefalia, edemas e alterações nas medidas corporais fetais, além de efeitos tóxicos para a mãe. Além disso, provoca altas taxas de mortalidade pré e pós-natais (Stangherlin *et al.* 2005). A exposição materna ao ditelureto de difenila durante o período de amamentação altera as tendências comportamentais da sua prole, que passa a se comportar de forma desinibitória. As observações desses estudos sugerem que o ditelureto de difenila (ou algum metabólito) consegue passar para os filhotes através do leite materno (Stangherlin *et al.* 2006).

Resultados do nosso grupo mostraram que o DTDF pode induzir alteração no quadro de leitura em *Salmonella typhimurium* e em linhagem selvagem haplóide da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os mutantes de *S. cerevisiae* deficientes na reparação por excisão de bases (BER) e na reparação recombinacional (HR) mostraram elevada sensibilidade ao DTDF. O DTDF apresentou citotoxicidade a partir da concentração de 1 μ mol após 2 horas de exposição em células V79. Consistentemente, o tratamento das células por 2 horas com concentrações citotóxicas do DTDF aumentaram os níveis de peroxidação lipídica e diminuíram os níveis de GSH/GSSH em levedura e em células V79, indicando que DTDF pode levar ao aumento da peroxidação lipídica e da oxidação da glutationa intracelular, caracterizando um estado de estresse oxidativo. Além disso, o DTDF induziu danos oxidativos ao DNA, determinados pelo ensaio cometa modificado empregando as endonucleases formamidopirimidina DNA-glicosilase (Fpg) e endonuclease III (endoIII) com e sem ativação metabólica. Nas concentrações mais elevadas, o DTDF induziu a formação de quebras simples e duplas de DNA em células

V79, como evidenciado pelo ensaio cometa, nas versões alcalina e neutra, na presença e ausência de ativação metabólica. O tratamento com o DTDF também induziu aumento na frequência de micronúcleos em células V79, demonstrando potencial mutagênico dessa molécula em altas concentrações. Entretanto, quando realizado o pré-tratamento com N-acetilcisteína, que restaura o GSH ao nível normal, houve redução dos efeitos oxidativos, genotóxicos e mutagênicos do DTDF em levedura e em células V79 (Degrandi *et al.* 2010).

Apesar dos efeitos tóxicos, o DTDF reduziu o nível de peroxidação lipídica em cérebro, rim e fígado de ratos, induzida por vários oxidantes (Rossato *et al.* 2002; Hassan *et al.* 2009). Além disso, o DTDF conferiu proteção contra neurotoxicidade e estresse oxidativo induzido por 4-aminopiridina em camundongos adultos (Brito *et al.* 2009). Além disso, o DTDF reduziu a peroxidação lipídica induzida por cloreto férrico em pulmão de camundongos (Pinton *et al.* 2011).

1.5 Doxorrubicina

Uma grande parte dos agentes antitumorais tem como alvo a molécula de DNA, sendo que a eficácia destas drogas está diretamente correlacionada com sua capacidade de causar lesões genotóxicas (Moustachi 2000; Blasiak *et al.* 2004). As antraciclinas estão entre os agentes antitumorais mais eficazes que já foram desenvolvidos. A doxorrubicina (DOX) é um exemplo de droga que age sobre a molécula de DNA, sendo muito empregada na quimioterapia de tumores. Foi uma das primeiras antraciclinas isoladas no decorrer da década de 60, a partir de *Streptomyces peucetius* e é classicamente conhecida por sua ação inibitória sobre a topoisomerase II (topo II), o que impede que essa proteína religue as fitas de DNA, causando quebras duplas no DNA (DSB) (Minotti *et al.* 2004).

A DOX é largamente utilizada na clínica, principalmente para o tratamento de câncer de mama e outros tumores sólidos (O'Shaughnessy 2003; Minotti *et al.* 2004). Apesar da sua vasta utilização, vários aspectos de sua toxicidade permanecem mal entendidos. Embora a atividade das antraciclinas seja derivada principalmente da inibição topo II (Gerwitz 1999), outros efeitos ligados à indução de radicais livres, à sua capacidade de alquilar diretamente o DNA ou de induzir a formação de pontes entre as duas cadeias de DNA, podem também apresentar um papel importante em relação a sua atividade

antitumoral, bem como aos importantes efeitos secundários ligados a esta classe de medicamentos que limitam a sua utilização clínica (Minotti *et al.* 2004; Cutts *et al.* 2005).

Muitas evidências sugerem que a indução de quebras duplas no DNA e posterior fosforilação da proteína H2AX é essencial para o recrutamento de proteínas de sinalização/reparo para o dano no DNA. O papel do γ -H2AX no reparo de danos no DNA não é totalmente conhecido, porém acredita-se que essa proteína possa aumentar os fatores de reparo perto do local de lesão e assim facilitar os mecanismos de reparo (Fernandez-Capetillo *et al.* 2004). As lesões induzidas por agentes genotóxicos, além de recrutarem as proteínas de reparo, também servem de sinal para a parada de ciclo celular (O'Driscoll e Jago, 2006). Participam desse processo uma grande variedade de proteínas sensoras ao dano, transdutores de sinal, bem como proteínas efetoras. O exato mecanismo desse processo ainda é desconhecido (Houtgraaf *et al.* 2006).

A utilização da DOX, em concentrações clínicas, é também conhecida por induzir estresse oxidativo e aparecimento de bases oxidadas (Doroshov *et al.* 2001). Esta indução poderia constituir um mecanismo alternativo que explicaria em parte sua atividade, mas também o desenvolvimento de patologias malignas secundárias ou a sua cardiotoxicidade que limita sua utilização (Hoffman *et al.* 1995; Gewirtz 1999). A cardiotoxicidade é um dos seus efeitos colaterais mais importantes, sendo decorrente dos radicais livres liberados pela droga, uma vez que tais espécies danificadoras atuam preferencialmente sobre o miocárdio (Dickey & Rao 2012; Octavia *et al.* 2012). O uso de antioxidantes durante a quimioterapia tem demonstrado potencial de prevenção contra efeitos indesejáveis em células normais. Compostos organoselenados em baixas concentrações demonstraram potencial antimutagênico em linfócitos humanos tratados com DOX (Santos & Takahashi, 2008). O efeito observado foi atribuído à ação antioxidante e possível interferência com as vias de reparo de DNA.

1.6 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produtos normais do metabolismo celular e sua presença nas células pode ser benéfica ou não dependendo da concentração em que estão presentes. Todos os organismos vivos aeróbios utilizam o oxigênio como acceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons (Halliwell & Gutteridge, 2007). As ERO podem ser formadas também por outros mecanismos como: produzidas

pelas xantinas oxidases, NAD(P)H oxidases, citocromo P-450-oxidases, pela auto-oxidação de catecolaminas e lipoxigenases (Madamanchi *et al.* 2005; Barrera 2012).

As concentrações de ERO podem variar de acordo com o tipo celular. A sua presença em níveis medianos é importante para processos fisiológicos vitais em diferentes áreas, incluindo sinalização intracelular e regulação redox, assim como defesa contra agentes infecciosos (para revisão ver Carocho & Ferreira 2012). ERO podem atuar como segundos mensageiros independente de estresse oxidativo e na sinalização celular para a proliferação celular, como a ativação da guanilato ciclase com a formação do segundo mensageiro da guanosina monofato cíclica, e indução da divisão celular (Valko *et al.* 2007), a necrose e a apoptose (Carocho & Ferreira 2012; Halliwell 2012). Uma vez que foi observado que a produção de ERO leva à mudanças na transcrição de genes, via regulação redox e fosforilação de fatores de transcrição (Madamanchi *et al.* 2005; Gutteridge & Halliwell 2010; Prochazkova *et al.* 2011). A regulação de proteínas por oxidação e redução, como ativação e inativação de fosfatases também é fundamental na sinalização celular (Prochazkova *et al.* 2011; Halliwell 2012).

Outros mecanismos fisiológicos como resposta de fagócitos à infecção microbiana, a síntese de prostaglandinas, o metabolismo de xenobióticos, a hidroxilação de prolina e lisina e a oxidação de xantina também estão relacionados à geração endógena das ERO (Valko *et al.* 2006; Ma 2010; Halliwell 2012). Em adição, as ERO podem ser provenientes de fontes externas como dieta, radiação solar, agentes químicos e poluentes do ar que estão constantemente presentes no ambiente (Figura 4) (Gutteridge & Halliwell 2010; Ma 2010; Halliwell 2012).

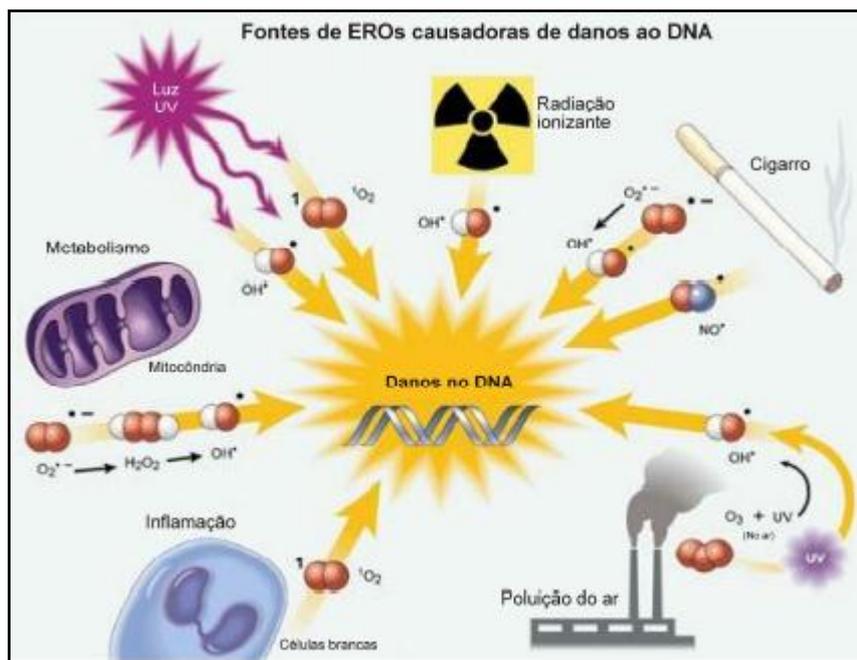


Figura 4: Fontes geradoras de ERO. (Adaptado de Ma, 2010)

Quando o acúmulo destas moléculas ultrapassa a capacidade de defesa antioxidante das células, ocorre estresse oxidativo (Ma 2010; van Loon *et al.* 2010), podendo esta condição de estresse ser resultado de: (a) um aumento excessivo na produção das ERO; (b) uma diminuição da capacidade de defesa celular antioxidante; (c) ou ainda por ambos (Halliwell 2007).

O termo ERO inclui todas as moléculas quimicamente reativas derivadas de oxigênio, que são frequentemente denominados de radicais livres por apresentarem um elétron não pareado em sua órbita mais externa, como o radical hidroxil (HO^\bullet) e o ânionsuperóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). As demais moléculas, apesar de grande reatividade com componentes celulares, não são considerados radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) (Halliwell & Gutteridge 2007).

As ERO podem ser produzidas em quantidades excessivas, gerando desequilíbrio entre os fenômenos pró-oxidativos e as defesas antioxidantes celulares, podendo comprometer a integridade celular por causar danos à membrana, perda de função de organelas, redução na eficiência metabólica, danos na cromatina e mutações, levando à morte celular (Figura 5) (Henriques *et al.* 2001; Valko *et al.* 2006).

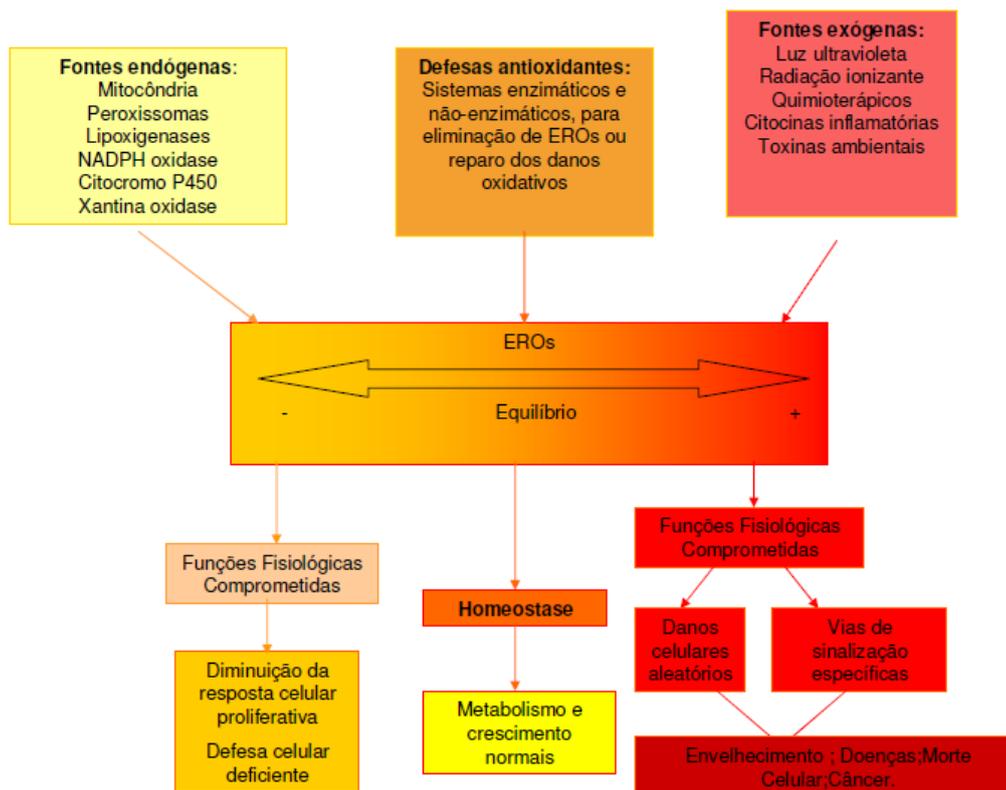


Figura 5: Fontes endógenas e exógenas de ERO e defesas antioxidantes. (Adaptado de Ma, 2010).

1.6.1 Danos oxidativos no DNA

Os agentes oxidantes são capazes ainda de provocar lesões na molécula de DNA genômico e mitocondrial. Aproximadamente 100 diferentes modificações em bases e açúcares já foram identificadas (Friedberg 2006; Svilar *et al.* 2011). No DNA, de modo geral, as ERO podem produzir uma série de lesões, danificando as bases nitrogenadas, desoxirriboses, causando quebras simples e duplas na cadeia, criando sítiosapurínicos e apirimidínicos (sítios AP), modificações nas bases e ligações cruzadas entre DNA e proteínas. Portanto, os danos oxidativos no DNA podem provocar bloqueio na replicação, mutações, anormalidades cromossômicas e conseqüentemente uma grande citotoxicidade (Friedberg, 2006; Valko *et al.* 2006; Svilar *et al.* 2011).

Uma das mais importantes modificações de bases geradas por ERO é a 7,8-diidro-8-oxo-2'-desoxiguanina (8-oxo-G) (Figura 6), devido à oxidação do átomo C8 do anel da guanina. O 8-oxo-G é o produto de dano oxidativo de base melhor caracterizado, embora não cause bloqueio na síntese de DNA, é fortemente mutagênico *in vitro* e *in vivo*, pois a

DNA polimerase α pode incorporar deoxiadenosina monofosfato (dAMP) oposto a 8-oxo-G, causando transversões do tipo G–T (Valko *et al.* 2006; van Loon *et al.* 2010).

O ataque a purinas provoca também a formação de formamidopirimidinas (Fapy) (Figura 6), produtos da abertura do anel imidazólico. Em relação às pirimidinas, o radical hidroxil reage preferencialmente com ligações duplas C5-C6, formando glicóis de timina e citosina. A base oxidada 5'hidróxi-2'-desoxicitidina causa transições do tipo C-T, e a timina glicol causa transições do tipo T-C, sendo altamente mutagênicas. As riboses são alvos menos frequentes, porém o ataque de ERO pode abstrair um dos átomos de hidrogênio da ribose, formando radicais que podem levar a quebra simples de cadeia, sítios abásicos e sítios álcali-lábeis (Valko *et al.* 2004; Svilar *et al.* 2011)

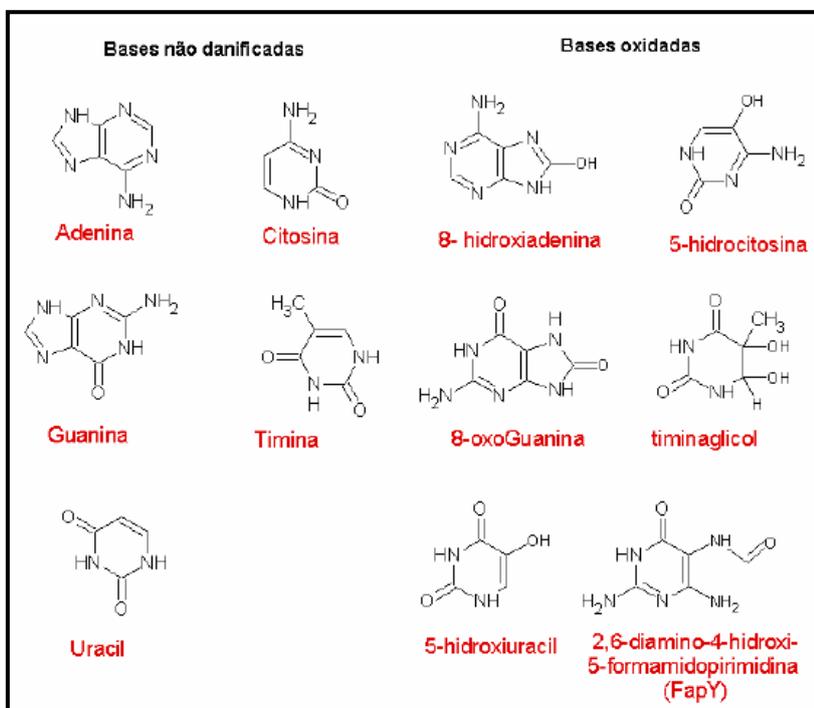


Figura 6. Principais modificações das bases do DNA provocadas por lesões oxidativas. (Adaptado de Svilar *et al.* 2011).

1.6.2 Danos oxidativos em lipídios

Os fosfolipídios apresentam uma cabeça polar e uma cauda hidrofóbica e são muito sensíveis à oxidação. Os danos induzidos por ERO são capazes de gerar reações em cadeia. Os ácidos graxos insaturados contêm um ou mais grupos metileno posicionados entre as duplas ligações *cis*. Esses grupamentos são altamente reativos em relação a agentes

oxidantes, atuando como doadores de hidrogênios para radicais centrados em carbono, os quais reagem com o oxigênio formando radicais peroxil, cujo destino pode ser a conversão a hidroperóxidos. Na presença de complexos metálicos e metaloproteínas, ocorre redução dos hidroperóxidos de ácidos graxos produzindo radicais alcoxil, iniciando uma reação em cadeia responsável pela produção de diversos epóxidos, hidroperóxidos e compostos carbonilados, denominada peroxidação lipídica (PL) (Tang *et al.* 2002; Valko *et al.* 2004).

O processo de PL se inicia quando ERO abstraem um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados (LH) das membranas ou de partículas de lipoproteínas, formando o radical lipídico (L[•]). O radical lipídico (L[•]) é reativo e pode iniciar a formação de novos radicais livres e continuar a cascata de reações, e o hidroperóxido lipídico pode sofrer degradação catalisada por metais de transição e produzir mais radicais reativos, como o radical peroxil (LOO[•]) ou radical alcoxil (LO[•]). As sucessivas gerações de hidroperóxidos e clivagem da cadeia de ácido graxo no carbono β poderiam produzir hidroperoxialdeído, e a posterior β-cisão liberaria malondialdeído (MDA) (Halliwell 2007; Voulgaridou *et al.* 2011).

O MDA possui a capacidade de se ligar covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, proteínas e peptídeos, causando alterações nas funções dessas moléculas. Já foi visto que o MDA tem ação mutagênica em bactérias e mamíferos (Tang *et al.* 2002) sendo frequentemente utilizado como marcador de peroxidação lipídica (Voulgaridou *et al.* 2011).

1.7 Principais defesas antioxidantes

Diante da grande diversidade de produção das ERO, os organismos celulares desenvolveram um elaborado mecanismo de defesa celular denominado sistema de defesa antioxidante. O termo antioxidante é utilizado para definir um conjunto de defesas enzimáticas ou não enzimáticas que protegem as macromoléculas ou estruturas celulares contra os efeitos potencialmente danosos que promovem a oxidação (Gutteridge & Halliwell 2010). Quando o balanço oxidativo celular é alterado há uma resposta inicial e rápida, resultado da ativação de todo um sistema de proteção pré-existente, bem como a ativação de um mecanismo de tradução de sinais que levará a ativação da resposta secundária caracterizada pela síntese *de novo* de proteínas e moléculas de proteção celular (Halliwell 2007; Gutteridge & Halliwell 2010).

As estratégias de defesa compreendem três etapas, que são: a prevenção (evitar a formação de ERO), interceptação (neutralização de ERO gerada) e reparação (de danos ocasionados por ERO). A prevenção contra a formação de ERO é representada, por exemplo, pelos sistemas de homeostase metálica na prevenção ao estresse oxidativo. A interceptação pode ser representada pelos sistemas enzimáticos como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) ou não enzimáticos como glutatona (GSH), vitaminas, compostos fenólicos. Estes sistemas têm como finalidade evitar que as ERO provoquem danos aos componentes celulares. Quando ocorre dano em nível de DNA, existem sistemas capazes de repará-lo, como, por exemplo, os sistemas de reparo de DNA (Friedberg 2007; Halliwell 2008).

A SOD foi a primeira enzima antioxidante descoberta presente tanto em eucariotos como em procariotos. A SOD é uma metalo-enzima responsável pela dismutação de $2O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e oxigênio, num processo sucessivo de oxidação e redução dos metais de transição que compõem seu centro ativo (Figura 7) (Miriayala *et al.* 2012). Há várias isoenzimas do tipo SOD, sendo classificadas de acordo com seu grupo prostético, podendo conter zinco, manganês ou ferro em seus sítios ativos e geralmente são responsáveis por compartimentos celulares distintos (Culotta *et al.* 2006; Gutteridge & Halliwell 2010; Yuzhalin & Kutikhin 2012). A CuZnSOD é homodimérica, possui Cu^{+2} e Zn^{+2} e está presente principalmente no citosol de células eucarióticas, mas também pode ser encontrada nos lisossomos, núcleo, bem como nos espaços entre as membranas mitocondriais interna e externa (Landis & Tower 2005; Halliwell 2007). A MnSOD é homotetramérica, contém um íon de Mn^{+3} em cada uma das suas subunidades e está localizada primariamente na mitocôndria.

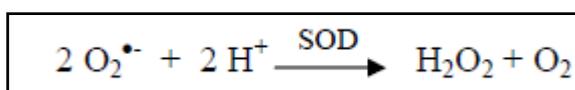


Figura 7: Reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela SOD

O peróxido de hidrogênio produzido na dismutação do superóxido pelas Sods ainda representa um perigo para os constituintes celulares. A CAT é uma hemoproteína contendo quatro grupos heme e tem especificidade para H_2O_2 . Quando o H_2O_2 se encontra em altas concentrações a CAT age principalmente catalisando a dismutação de H_2O_2 em água e oxigênio (Figura 8)(Fridovich 1998; Halliwell 2007). Como a CAT tem o H_2O_2 como único substrato, a sua atividade está intimamente relacionada com a concentração desta

espécie reativa. A ação desta enzima envolve oxidação divalente do ferro heme (IV), acompanhada pela redução divalente do H₂O₂. Elas contêm NADPH fortemente ligado, o qual pode prevenir a acumulação da forma ferro (IV) da enzima, a qual é inativa (Henriques *et al.*, 2001;(Gutteridge & Halliwell 2010). Em baixas concentrações de H₂O₂ a CAT funciona como uma peroxidase oxidando um composto doador de hidrogênio, como metanol, etanol ou ácido fórmico (Figura 9) (Halliwell 2007). Devido a sua ampla distribuição na natureza, sua alta conservação evolucionária e sua capacidade de rapidamente degradar o peróxido de hidrogênio, a catalase tem sido apontada como uma das principais moléculas que durante o processo evolucionário permitiu que os organismos pudessem sobreviver em ambientes aeróbicos (Scandalios 2002).

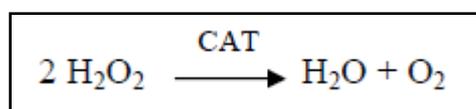


Figura 8: Reação de dismutação do H₂O₂ pela CAT.

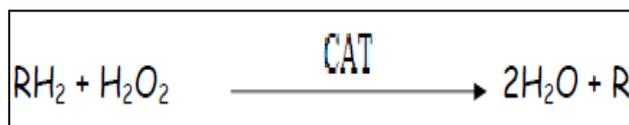


Figura 9: Reação da CAT como peroxidase.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- A proposta desse trabalho é avaliar um possível efeito antigenotóxico e antimutagênico do ditelureto de difenila contra peróxido de hidrogênio (H₂O₂), hidroperóxido de tert-butila (*t*-BOOH), metil metano sulfonato (MMS) e radiação ultravioleta C em fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (V79).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito citoprotetor do ditelureto de difenila em células V79 pelo ensaio da enzima lactato desidrogenase (LDH) e ensaio clonogênico.
- Determinar a ação antigenotóxica do ditelureto de difenila pelo ensaio cometa alcalino e avaliar bases oxidadas do DNA pelo ensaio cometa modificado, utilizando as enzimas Endo III e Fpg.
- Verificar a ação antimutagênica do ditelureto de difenila pelo ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese.
- Estabelecer o nível de peroxidação lipídica do ditelureto de difenila pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- Avaliar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) no tratamento com ditelureto de difenila por DCFH-DA.
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, com a finalidade de entender a modulação das defesas celulares pelo ditelureto de difenila.

Capítulo I

**Antigenotoxic and antimutagenic effects of diphenyl diteluride
against several known mutagens in Chinese Hamster V79 cells**

**Será submetido à revista
Mutation Research**

Antigenotoxic and antimutagenic effects of diphenyl diteluride against several known mutagens in Chinese Hamster V79 cells

Cristiano Trindade¹, André Luiz Mendes Juchem¹, Nathália Rammé Medeiros de Albuquerque¹, Iuri Marques de Oliveira¹, Renato Moreira Rosa², Temenouga Nikolova Guecheva¹, Jenifer Saffi³, João Antonio Pêgas Henriques^{1,4}

1. Department of Biophysics/Center Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul; Porto Alegre - RS, Brazil
2. Laboratory of Genetic Toxicology, Luteran University of Brazil; Canoas - RS, Brazil
3. Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre; Porto Alegre - RS, Brazil
4. Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul; Caxias do Sul - RS, Brazil.

*Corresponding author

Prof. João Antonio Pêgas Henriques

Departamento de Biofísica- Prédio 43422- Laboratório 210

Campus do Vale – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avenida Bento Gonçalves 9500, Bairro Agronomia–CEP 91501-970

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 33166069

Fax: +55 5133167003

E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

ABSTRACT

The present study evaluated antigenotoxic and antimutagenic properties of Diphenyl ditelluride (DPDT) against several known mutagens in Chinese hamster lung fibroblast (V79). DPDT was not cytotoxic and genotoxic at concentrations ranging from 0.01 to 0.5 μmol . The pre-treatment for 2h with this organotellurium compound at non-cytotoxic dose range (0.01, 0.05 and 0.1 μmol) increased cell survival after challenge with hydrogen peroxide (H_2O_2), t-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH), methyl-methanesulphonate (MMS), or UV C radiation. In addition, the pre-treatment with DPDT decrease the DNA damage and oxidized bases induction by the studied genotoxic agents, as verified in the comet assay and modified comet assay, respectively. The pre-treatment also reduced micronucleus frequency, revealing the protector effect of DPDT against MMS or UV C induced mutagenesis. Our results demonstrated that DPDT-treated cells at concentrations of 0.01, 0.05 and 0.1 μmol did not change TBARS levels and ROS generation. However, the observed increased intensity of ROS foci and increased superoxide dismutase activity (SOD) following DPDT treatment suggest pro-oxidative effect of this compound. Our results clearly demonstrate that DPDT at low concentrations presents antigenotoxic and antimutagenic properties. The probable mechanism of the protection effect could be induction of adaptive response in V79 cells by the DPDT pre-treatment.

KEYWORDS: diphenyl ditelluride, V79 cells, antigenotoxic, antimutagenic, antioxidant enzymes

1. Introduction

It has been shown in the chemical and biochemical fields that organotellurium compounds are potentially toxic and lethal depending of the dose used (Carvalho *et al.* 2009). On the other hand, these compounds have been pointed out as promising and useful alternatives for organic synthesis and pharmaceutical industry (Nogueira *et al.* 2004; Degrandi *et al.* 2010). Consequently, it is essential to advance our knowledge at a molecular level and understand pharmacological properties of organotellurium compounds, particularly in view of their toxic potential or antioxidant and antigenotoxic activities (Avila *et al.* 2012).

Organotellurium compounds can exhibit potent anti-oxidant activity mediated by their glutathione peroxidase (GPx) mimetic properties (Ren *et al.* 2001; Rossato *et al.* 2002) and/or by their ability to scavenge reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in mammalian models (Briviba *et al.* 1998). The GPx enzyme catalyzes the decomposition of potentially toxic hydrogen peroxide and lipid peroxides. This redox reaction uses the cellular thiol glutathione (GSH) as a co-substrate. Thus, in the presence of substrates the organotellurium compounds can undergo a redox cycle analogous to that of GPx (Comparsi *et al.* 2012). Moreover, organotellurium compounds revealed anti-inflammatory, immunomodulatory, anticancer, hepato- and neuroprotective properties (Engman *et al.* 2000; Avila *et al.* 2010; Sredni 2012).

The diphenyl ditelluride (DPDT) is a solid, simple and stable organotellurium compound. It is an important and versatile intermediate in organic synthesis. The DPDT in high doses is extremely toxic in rodents, causing neurotoxic effects in mice after acute or prolonged exposure and neurodegenerations in rats (Nogueira *et al.* 2001; Borges *et al.* 2005; Heimfarth *et al.* 2012). Indeed, the DPDT can inhibit δ -aminolevulinic acid

dehydratase (δ -ALA-D) (Maciel *et al.* 2000) and squalene monooxygenase (Laden & Porter 2001). In contrast to these toxic effects, DPDT increased the levels of δ -ALA-D in mice blood (Comparsi *et al.* 2012). Several reports have been indicated that δ -ALA-D is a good marker of oxidative stress (Maciel *et al.* 2000) and reinforce that the organotellurium toxicity can be related to the interaction of these compounds with thiol groups of important biomolecules (Nogueira *et al.* 2004). Furthermore, DPDT inhibited the activity of important antioxidant selenoproteins *in vitro* and *in vivo* in adult mice, such as thioredoxin reductase (TrxR) (Engman *et al.* 2003; Comparsi *et al.* 2012).

On the other hand, Rossato *et al.* (Rossato *et al.* 2002) reported an antioxidant action of DPDT by reducing the level of lipid peroxidation induced by some oxidants in rat brain. Indeed, Brito *et al.* (Brito *et al.* 2009) showed that DPDT afforded protection in adult mice against 4-aminopyridine-induced neurotoxicity and oxidative stress. Moreover, it has been reported that DPDT at low concentrations (1–4 μmol) significantly increased Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat brain, suggesting that DPDT could be an antioxidant agent (Borges *et al.* 2005).

Data from our laboratory showed cytotoxic, genotoxic and mutagenic properties of DPDT in Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells) at concentrations above 0.5 μmol , and above 5 μmol in strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae* both proficient and deficient in several DNA repair pathways (Degrandi *et al.* 2010).

Therefore, the aim of present study was to investigate antigenotoxic and antimutagenic effects of DPDT at low concentrations. The properties of DPDT were studied in a permanent lung fibroblast cell line derived from Chinese hamster (V79 cells). For this purpose, the comet assay and cytokinesis block micronucleus test were used in

order to evaluate the effect of low DPDT concentrations on the DNA damage induced in response to several known mutagens. The cytotoxicity and oxidative stress parameters are also measured in the treated cells.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

DPDT (CAS registry number 32294-60-3) was provided by Dr. Antônio Braga, Federal University of Santa Catarina, Brazil. The chemical purity of DPDT (99.9%) was determined by gas chromatography/high-performance liquid chromatography. Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, L-glutamine, and antibiotics were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA), methylmethanesulfonate (MMS), hydrogen peroxide (H₂O₂), were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Low-melting point agarose and agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Formamidopyrimidine DNA-glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III) were obtained from New England BioLabs (Beverly, MA, USA). Giemsa stain was bought from Merck (Darmstadt, Germany). 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) from Invitrogen (PoortGebouw, Netherlands) All others reagents were of analytical grade. The tissue culture flasks (bottles and dishes) were supplied by TPP (Trasadingen, Switzerland).

2.2. Cell culture and treatments

V79 cells were grown as monolayers under standard conditions in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.2mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Cells were maintained in tissue culture flasks at

37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide, and were harvested by treatment with 0.15% trypsin-0.08% EDTA in phosphate-buffered saline solution (PBS). Cells were seeded in 5ml of complete medium in a 25cm² flask and grown to 80-90% confluence prior to the treatment with the test substance. DPDT was dissolved in DMSO and added to FBS-free medium to reach the different desired concentrations. The final DMSO concentration in the medium never exceeded 0.2%, and the control group was exposed to an equivalent concentration of solvent. Cells were treated at low concentrations of DPDT for 2 h, from 0.01 to 1µmol, in DMEM culture without serum and then washed with PBS at pH 7.4, and submitted to the mutagen treatment.

For oxidative challenge, cells were exposed to 150 or 500 µmol H₂O₂ or 200 µmol *t*-BOOH for 2 h in the dark at 37 °C. For the MMS exposure, cells were incubated with 40 µmol MMS for 2 h in the dark at 37 °C. For the UVC exposure, medium was removed after incubation, and the monolayer was rinsed with PBS at pH 7.4. Each dish received PBS at pH 7.4, and cells were exposed to a dose of ultraviolet light (254 nm) at a rate of 0.3 J/m²/s at room temperature. UVC dosimetry was performed in air with Blak-Ray Ultraviolet Meter (USA) and the irradiation dose was 5 J/m². Prior to exposure, lids of the dishes were removed, and the covering solution aspirated from the dishes.

2.3. Cytotoxicity evaluation using a lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay

V79 cells (1×10^5 cells/mL) in logarithmic growth phase were seeded in 96-well plates. After treatment, the fraction of total LDH activity in the supernatant was taken as an indicator of membrane leakage or cell lysis. CytoTox assay kit (Promega, Madison, WI) was used for enzymatic assessment of LDH release, following the manufacturer's instructions. The percentage of LDH leakage was calculated as follows: % leakage = $S \div (S + C) \times 100$.

2.4. Colony-forming ability (Clonal survival)

Exponentially growing V79 cells were treated according to the experimental protocol. Thereafter, they were trypsinized, and 200 cells per 60mm dish were seeded in triplicate to determine colony-forming ability. After 5-7 days incubation, colonies were fixed with ethanol, stained with crystal violet (0.1%), counted, and their survival calculated as a percentage relative to control treatment.

2.5. Comet assay

V79 cells (3×10^5 cells/mL) in logarithmic growth phase were seeded in 6-well plates. Alkaline comet assay was performed as described (Degrandi *et al.* 2010) with minor modifications. V79 cells were pre-treated at low concentrations of DPDT, and exposed to mutagens. After treatment, cells were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and resuspended in complete medium. Then, 15 μ L of cell suspension were mixed with low-melting point agarose, and immediately spread onto a glass microscope slide pre-coated with a layer of 1.5% normal melting point agarose. Agarose was allowed to set at 4 °C for 5 min. Slides were incubated in ice-cold lysis solution at 4 °C for at least 1 h to remove cell proteins, leaving DNA as “nucleoids”. The alkaline comet assay was performed at pH 13. In the modified comet assay, slides were removed from the lysis solution, washed three times in enzyme buffer and incubated with 60 μ L of FPG (45 min 37° C) or Endo III (30 min 37° C) solutions. After lysis, slides were placed on a horizontal electrophoresis unit, covered with fresh buffer for 15 min at 4 °C to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was performed for 20 min at 25 V and 300 mA (0.90 V/cm). Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), washed in bi-distilled water, and stained using a silver nitrate. One hundred cells (100 cells from each of the two replicate slides) were selected, and analyzed for the concentration of each test substance. Cells were visually scored according to tail length into five classes: (1) class 0: undamaged, without a

tail; (2) class 1: with a tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) class 2: with a tail length 1–2x the diameter of the head; (4) class 3: with a tail longer than 2x the diameter of the head and (5) class 4: comets with no heads. A value (damage index) was assigned to each comet according to its class. Damage index ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells x 4).

2.6. Micronucleus test

The micronucleus assay in binucleated cells was performed according to Bonassi et al (Thomas & Fenech 2011), with minor modifications. V79 cells (3×10^5 cells/mL) in logarithmic growth phase were seeded in 6-well plates. V79 cells were incubated with various DPDT concentrations for 2h in FBS-free medium. Cultures were then washed twice with medium, and Cyt-B was added to a final concentration of $3\mu\text{g/mL}$. As positive controls, the classical mutagenic agents MMS and UV C were used. Cultures were harvested 21h after Cyt-B addition. Cells were separated from the bottle by trypsinization, and the cell suspension was centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min. Cells were resuspended in 75 mmol KCl, and maintained at 4°C for 3 min (mild hypotonic treatment). They were then centrifuged, and a methanol/acetic acid (3:1) solution was slowly added. This fixation step was repeated twice, and cells were finally resuspended in a small volume of methanol/acetic acid, dropped on clean slides, and stained with 3% Giemsa (pH6.8) for 5 min. Slides were mounted, and codified prior to microscopic analysis. Micronuclei were counted in 2000 binucleated cells (BNC) with well-preserved cytoplasm. The identification of micronuclei was carried out according to Fenech (2007). Nuclear division index (NDI) was also calculated employing the formula,

$$\text{NDI} = [\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})] / \text{N}$$

Where M1-M4 represents the number of cells with one to four nuclei and N is the total number of cells scored (excluding necrotic and apoptotic cells).

2.7. Determination of ROS levels by flow cytometry analysis

The levels of intracellular ROS were determined by 2', 7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA). In the presence of an oxidant, DCFH is converted into the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein. Briefly, 5×10^4 cells/mL were plated in 24-well culture plates, grown overnight and treated with DPDT for 2 h. After that, the cells were washed twice with PBS and incubated with 10 μ mol DCFH-DA in PBS at 37°C for 30 min, protected from light. After incubation, cells were washed with PBS, harvested with trypsin/EDTA and evaluated by flow cytometry. Ten thousand cells were measured for each experimental condition. Relative ROS production was expressed as the change in fluorescence of experimental groups compared with that of the appropriate controls (100%).

2.8. Measurement of lipid peroxidation

Lipid damages were monitored by the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction, which has been widely adapted as a sensitive method for lipid peroxidation evaluation. The assays were performed according to Salgo and Pryor (Salgo & Pryor 1996), with minor modifications. V79 cells (1×10^7 cells/mL) in logarithmic growth phase were seeded in 25cm² flask. After the treatments, the cells were washed with cold PBS, scraped and homogenized in ice-cold PBS. Samples containing 400 μ L of the cell lysates were combined with 600 μ L of 15% trichloroacetic acid (TCA) and 0,67% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was heated at 100°C for 20 min. After cooling to room temperature, the samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 min, the supernatant fraction was isolated and the absorbance was measured at 532 nm. Hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TMP) was used as the standard and results are expressed as MDA equivalents.

2.9. Superoxide dismutase (SOD)

SOD activity was spectrophotometrically determined in the samples by measuring the inhibition of self-catalytic adrenochrome formation rate at 480nm in a reaction medium containing 1mmol/L adrenaline (pH 2.0) and 50mmol/L glycine (pH 10.2). This reaction was performed at 30°C for 3 minutes (Bannister & Calabrese 1987). Results were expressed in units of SOD.

2.10. Catalase (CAT)

The CAT activity assay was performed according to the method described by Aebi (Aebi 1984), by determining hydrogen peroxide decomposition rate at 240nm. Results were expressed as mmol of H₂O₂ decomposed/min.

2.11. Statistical analysis

The data were obtained in three independent experiments in duplicate, and the results are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by test of Tukey at $p < 0.05$, which was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. DPDT range finder study

The viability of DPDT-treated cells was assessed by monitoring of LDH leakage, which is an indicator of plasma membrane damage. It can be seen in Figure 1A that at concentration range of 0.01-0.5 μ mol the DPDT treatment was not cytotoxic. In contrast, a concentration of 1 μ mol DPDT significantly decrease cell survival. In addition, the treatment with DPDT at non-cytotoxic concentrations was unable to induce DNA strand

breaks, as showed by the results of standard comet assay (Fig. 3A). Therefore, we decided to use 0.01–1.0 μmol concentration range in all subsequent experiments.

3.2. Cytotoxicity evaluation and clonal survival

The ability of non-toxic concentrations of DPDT to reduce the H_2O_2 toxicity was measured in the LDH leakage assay and by clonal survival. Figure 1B shows that the cytotoxicity of 150 μmol H_2O_2 treatment (26% survival), was significantly suppressed by DPDT at concentrations from 0.01 to 0.1 μmol . As can be seen in Figure 2B, the exposure at 150 μmol H_2O_2 decreased the clonal survival in 57% when compared to the negative control. However, when cells were pre-treated with DPDT prior exposure to hydrogen peroxide, the clonal survival was maintained between 70 and 84%, at doses 0.01, 0.05 and 0.1 μmol of DPDT, showing protective effect against toxicity generated by H_2O_2 .

The pre-treatment with DPDT at concentrations from 0.01 to 0.1 μmol decreased the leakage of LDH in V79 cells after 200 μmol *t*-BOOH oxidative challenge (32% survival) (Fig. 1C), indicating an increase in cell viability in a dose-dependant manner. The Figure 2C shows that the pre-treatment at doses 0.05 and 0.1 μmol of DPDT prevented the cell death and increased the clonal survival two times in comparison with this of cells exposed to 200 μmol *t*-BOOH alone.

The effect of non-toxic concentrations of DPDT against MMS cytotoxicity, as measured in the LDH leakage assay, was evaluated. Figure 1D shows that the pre-treatment with DPDT at concentrations 0.05 and 0.1 μmol decreased the cytotoxicity generated by MMS and increased cell viability in 35% at dose 0.1 μmol ($p \leq 0.001$) when compared to the positive control (Fig. 1D). As can be seen on Figure 2D, the MMS decreased the clonal survival in 59% when compared to the negative control, however, the pre-treatment with DPDT decreased the toxicity generated by 40 μmol MMS. The

observed decrease in genotoxicity was statistically significant at concentration of 0.1 μmol DPDT ($p \leq 0.05$).

As can be seen on Figure 1E, the exposure to 5 J/m^2 UV C was highly cytotoxic, as measured in LDH leakage assay (12% survival, $p \leq 0.001$) when compared to the negative control. The exposure of cells to UV C leads to a significant decrease in clonal survival (7% survival) (Fig. 2E), however, pre-treatment with DPDT at concentrations from 0.01 to 0.1 μmol decreased cytotoxicity induced by UV C (Fig. 2E).

3.3. Antigenotoxic effects

In order to verify any possible DPDT antigenotoxic effect, we tested DPDT action against oxidative agents H_2O_2 or *t*-BOOH (Figure 3B and 3C respectively). When the cells were pre-treated with DPDT at concentrations from 0.01 to 0.1 μmol prior exposure to the genotoxic agents, DNA damage and oxidative damage were significantly reduced, as verified by DI ($p \leq 0.05$) (Fig. 3B and 3C) and (ODS) ($p \leq 0.05$) (Fig. 4B and 4C).

The effect of DPDT pre-treatment on genotoxicity generated by 40 μmol MMS or 5 J/m^2 UV C show that DPDT afforded best protection at concentration 0.1 μmol ($p \leq 0.001$), reducing DI ($p \leq 0.001$) (Fig. 3D and 3E) and ODS ($p \leq 0.05$) (Fig. 4D and 4E) induced by MMS or UV C respectively.

We also performed co- and pos-treatment with DPDT against the studied mutagens, however, only slight or no protective effect at the concentration range used was observed (data not shown). Moreover, when we performed co-treatment with DPDT, at concentration 0.5 and 1.0 μmol , increased DNA damage and formation of oxidized bases was observed, suggesting synergistic action (data not shown).

3.4. Antimutagenic evaluation

As can be seen in Figure 5A, the DPDT did not induce micronuclei at dose range 0.01 to 0.1 μmol . The doses 0.5 and 1 μmol of DPDT increased the micronucleus frequency, three and four times, respectively, when compared to the negative control (Fig. 5A). Therefore, for the evaluation of the antimutagenic effects of DPDT, we decided to use only these concentrations of DPDT (0.01, 0.05 and 0.1 μmol). The Figures 5B and 5C show that MMS and UV C induced micronucleus formation and decrease cell proliferation (Fig. 6A). However, the pre-treatment with DPDT decreased micronucleus frequency in all tested doses (Fig. 5B and 5C) and increased the cell proliferation, assessed by NDI (Fig. 6A and 6B) following treatment with both tested mutagens. Thus, DPDT afforded protection against both mutagen agents (MMS and UV C), suggesting antimutagenic effects.

3.5. Evaluation ROS

ROS generation in the exposed samples was expressed as a percentage of the control group. Figure 7A shows the image of flow cytometric analysis of ROS generation. As can be seen on Figure 7B, the exposure to 400 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ increased ROS generation to 45% when compared to the negative control. After 2h incubation with DPDT, only concentrations of 0.5 and 1 μmol increased ROS generation (Fig. 7B). However, all tested DPDT concentrations increased fluorescence intensity, shifting to the right on the linear x-axis of the representative histograms (Fig. 7A and 7C).

3.6. Lipid peroxidation – TBARS

TBARS levels increased significantly in V79 cells treated with concentrations of 0.5 ($p \leq 0.001$) and 1.0 μmol DPDT ($p \leq 0.001$). The DPDT-treated cells at concentrations of 0.01, 0.05 and 0.1 μmol did not change TBARS levels (Table 1).

3.7. Enzymatic antioxidant defenses

We also investigate enzymatic antioxidant defenses by measuring SOD and CAT in presence of low DPDT concentrations. Table 1 shows that DPDT at all tested concentration increase SOD activity when compared to the control group. In contrast, CAT activity was markedly reduced at concentration ranging from 0.01 to 0.5 μmol DPDT (Table 1). These results indicate that the antioxidant defenses were altered by DPDT treatment in V79 cells.

4. Discussion

Tellurium compounds can have contrasting behavior, which depends on the concentration used. DPDT at low concentrations may have antioxidant effects (Rossato *et al.* 2002), whereas in high concentrations it can be genotoxic and mutagenic (Degrandi *et al.* 2010). In this study, we used V79 cells to investigate the antigenotoxic and antimutagenic effects of DPDT. We established that low DPDT concentrations, up to 1.0 μmol , are not cytotoxic (Fig. 1A) and genotoxic (Fig. 3A) in the studied model, as verified by LDH leakage assay and alkaline comet assay, respectively. This is the first study of this organotellurium compound showing its chemopreventive potential against several classical mutagens.

DPDT at low concentrations confers protection against H_2O_2 or *t*-BOOH oxidative agents. This organotellurium compound was able to reduce toxicity generated by both oxidative mutagens, increasing the cell viability two times when compared to the positive control. Furthermore, when we perform the pre-treatment with low DPDT concentrations, the oxidative damage generated by both oxidative mutagens was evidently reduced. Notably, the concentration 0.1 μmol of DPDT was more effective, reducing DNA damage

over 50% when compared to the positive control (Fig. 3B and 3C). Reinforcing these results, pre-treatment with DPDT at concentration from 0.01 to 0.1 μmol led to decreased oxidative damage by reducing the number of FPG- and ENDO III-sensitive sites. This effect most likely occurred by reducing the formation of oxidized bases over 50% when compared to the positive control (Fig. 4B and 4C). However, the increased DNA damage and formation of oxidized bases during the co-treatment with DPDT against H_2O_2 , *t*-BOOH and UV C, at concentration 0.5 and 1.0 μmol , suggest synergistic action (data not shown).

Relatively little is known about the effect of DPDT on the DNA damage induced by ROS in mammalian cells. The reason for the observed protection by DPDT at low doses is not obvious, but it could reside in pro-oxidant effect.

Pro-oxidant properties are defined for chemicals that induce oxidative stress, usually through the formation of reactive species or inhibiting antioxidant systems (Halliwell 2008; Carocho & Ferreira 2012). Halliwell (Halliwell 2008) postulated that pro-oxidant effect can be beneficial, since the imposition of a mild degree of oxidative stress might raise the levels of antioxidant defenses and xenobiotic-metabolizing enzymes, leading to overall cytoprotection. Procházková (Prochazkova *et al.* 2011) hypothesizes that pro-oxidants can have cell signaling properties which are essential to life, once again attributing a useful role to them. In order to investigate this hypothesis, we measured the extent of lipid peroxidation in DPDT-treated mammalian cells. The occurrence of an increase in TBARS levels above concentration of 0.1 μmol DPDT (Table 1), suggests that ROS play an important role in DPDT cytotoxicity in V79 cells. In accordance with these results, we observed that treatment with DPDT at concentrations from 0.01 to 0.1 μmol did not increased ROS generation; whereas, concentrations at 0.5 and 1.0 μmol increased ROS

generation, assayed by means of DCF-DA dye fluorescence (Fig. 7B). However, DPDT-treatment increased the fluorescence intensity of ROS foci at all concentrations used (Fig. 7A). Reinforcing these results, when we evaluated the enzymatic antioxidant defenses, DPDT-treatment at all concentrations caused an increased in SOD activity in V79 cells (Table 1). Moreover, this organotellurium compound inhibited CAT activity (Table 1). These results are in agreement with Pinton *et al.* (Pinton *et al.* 2010), who reported that dose of 0.3 $\mu\text{mol/kg}$ and 0.6 $\mu\text{mol/kg}$ DPDT, increased SOD activity in lung of rats. Moreover, Comparsi *et al.* (Comparsi *et al.* 2012) reported that DPDT decreased CAT activity in rat brain, however, did not alter such activity in rat liver. Previous studies reported that inhibition of SOD activity could be result from the enzyme inactivation by oxidant agents (Anbarasi *et al.* 2006; Pinton *et al.* 2010). The increase of SOD activity in our study could be a result of adaptive response to the pro-oxidant effect of DPDT. This organotellurium is an electrophilic compound, which can suffer thiol nucleophilic attack in the tellurium atom conferring pro-oxidant propriety (Rigobello *et al.* 2011; Comparsi *et al.* 2012).

Various studies have established that free oxygen radicals can induce activation of numerous signaling proteins, including Tyrosine Kinase Receptor, MAPKs and transcription factors (Boonstra & Post 2004). Avila *et al.* (Avila *et al.* 2012) reported that an organotellurium compound diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinyl phosphonate caused DAF-16 translocation from the cytosol to the nucleus in *C. elegans*. This finding indicates that organotellurium compounds can modulate this pathway, inducing the production of enzymatic antioxidants that are dependent upon DAF-16, such as SOD and glutathione peroxidase. So, the increased oxidative stress resistance induced by DPDT pre-treatment in our study may depends on activation of transcription factors.

The present study also evaluated the performance of DPDT against mutagenic agents. MMS has been used as an experimental model compound for several decades to elucidate the toxicity mechanisms of alkylating agents relative to mutagenesis. There are numerous reports of GSH rapid depletion by alkylating agents in mammalian cells, thereby generating oxidative stress (Liu *et al.* 2005; Rosa *et al.* 2007a). UVC-radiation can directly or indirectly damage DNA via production of free radicals and ROS, which can damage DNA molecules (Rosa *et al.* 2007b). We found in this study that pre-treatment with DPDT resulted in survival improvement and DNA damage reduction following MMS or UV C-induced oxidative stress. Furthermore, the pre-treatment with DPDT increased the cell proliferation for both mutagenic agents and reduced micronucleus frequency in 50% in relation to the mutagen treatment alone, suggesting an antimutagenic effect. The protection effects afforded by DPDT may be explained by its GPx mimetic activity (Hassan *et al.* 2009). Another possible mechanism is the protection against MMS by reducing its DNA alkylating ability. Indeed, DPDT could modulate transcription factors with chemopreventive activity, similarly to that shown for another organotellurium compound (Murakami *et al.* 2008), modulating the expression of numerous antioxidant and anti-inflammatory genes and enzymes that can decrease or inhibit the effects of carcinogens. Moreover, our results are consistent with those reported in the literature, which show that some organotellurium compounds exhibit protective potential at low concentrations (Avila *et al.* 2010; Avila *et al.* 2012).

In summary, the data obtained in the present study showed that pre-treatment with low concentrations of DPDT protects against H₂O₂, *t*-BOOH, MMS and UVC-induced cytotoxicity, DNA damage and mutagenesis. This is the first report demonstrating that DPDT pre-treatment can stimulate an adaptive response preventing V79 cells from

subsequent genotoxic challenge. Thus, the investigation of antimutagenic potential of DPDT and its structural derivatives may help to develop novel and more efficient chemopreventive strategies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul (FAPERGS) for their financial support.

References

References

1. Carvalho CA, Gemelli T, Guerra RB, Oliboni L, Salvador M, et al. (2009) Effect of in vitro exposure of human serum to 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-en-1-one on oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 332: 127-134.
2. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104: 6255-6285.
3. Degrandi TH, de Oliveira IM, d'Almeida GS, Garcia CR, Villela IV, et al. (2010) Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 25: 257-269.
4. Avila DS, Benedetto A, Au C, Manarin F, Erikson K, et al. (2012) Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* pp. 1903-1910.

5. Ren X, Xue Y, Zhang K, Liu J, Luo G, et al. (2001) A novel dicyclodextrinyl ditelluride compound with antioxidant activity. *FEBS Lett* 507: 377-380.
6. Rossato JI, Ketzer LA, Centuriao FB, Silva SJ, Ludtke DS, et al. (2002) Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res* 27: 297-303.
7. Briviba K, Tamler R, Klotz LO, Engman L, Cotgreave IA, et al. (1998) Protection by organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. *Biochem Pharmacol* 55: 817-823.
8. Comparsi B, Meinerz DF, Franco JL, Posser T, de Souza Prestes A, et al. (2012) Diphenyl ditelluride targets brain selenoproteins in vivo: inhibition of cerebral thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in mice after acute exposure. *Mol Cell Biochem* 370: 173-182.
9. Engman L, Kandra T, Gallegos A, Williams R, Powis G (2000) Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. *Anticancer Drug Des* 15: 323-330.
10. Avila DS, Colle D, Gubert P, Palma AS, Puntel G, et al. (2010) A possible neuroprotective action of a vinylic telluride against Mn-induced neurotoxicity. *Toxicol Sci* 115: 194-201.
11. Sredni B (2012) Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. *Semin Cancer Biol* 22: 60-69.
12. Nogueira CW, Rotta LN, Perry ML, Souza DO, da Rocha JB (2001) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res* 906: 157-163.

13. Borges VC, Rocha JB, Nogueira CW (2005) Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. *Toxicology* 215: 191-197.
14. Heimfarth L, Loureiro SO, Dutra MF, Andrade C, Pettenuzzo L, et al. (2012) In vivo treatment with diphenyl ditelluride induces neurodegeneration in striatum of young rats: Implications of MAPK and Akt pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 264: 143-152.
15. Maciel EN, Bolzan RC, Braga AL, Rocha JB (2000) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* 14: 310-319.
16. Laden BP, Porter TD (2001) Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J Lipid Res* 42: 235-240.
17. Engman L, Al-Maharik N, McNaughton M, Birmingham A, Powis G (2003) Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium antioxidants. *Anticancer Drugs* 14: 153-161.
18. Brito VB, Rocha JB, Folmer V, Erthal F (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.
19. Thomas P, Fenech M (2011) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. *Methods Mol Biol* 682: 217-234.
20. Salgo MG, Pryor WA (1996) Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys* 333: 482-488.
21. Bannister JV, Calabrese L (1987) Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 32: 279-312.

22. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126.
23. Carocho M, Ferreira IC (2012) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 51C: 15-25.
24. Halliwell B (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* 476: 107-112.
25. Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82: 513-523.
26. Pinton S, da Rocha JT, Zeni G, Nogueira CW (2010) Organoselenium improves memory decline in mice: involvement of acetylcholinesterase activity. *Neurosci Lett* 472: 56-60.
27. Anbarasi K, Vani G, Balakrishna K, Devi CS (2006) Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sci* 78: 1378-1384.
28. Rigobello MP, Folda A, Citta A, Scutari G, Gandin V, et al. (2011) Interaction of selenite and tellurite with thiol-dependent redox enzymes: Kinetics and mitochondrial implications. *Free Radic Biol Med* 50: 1620-1629.
29. Boonstra J, Post JA (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337: 1-13.
30. Liu H, Colavitti R, Rovira, II, Finkel T (2005) Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 97: 967-974.
31. Rosa RM, do Nascimento Picada J, Saffi J, Henriques JA (2007) Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutat Res* 628: 87-98.

32. Rosa RM, Moura DJ, Romano ESAC, Saffi J, Pegas Henriques JA (2007) Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res* 631: 44-54.

33. Hassan W, Ibrahim M, Nogueira CW, Braga AL, Deobald AM, 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.

34. Murakami A, Ashida H, Terao J (2008) Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* 269: 315-325.

LEGENDS FOR FIGURES

Fig.1. Results are expressed as mean \pm SD, n=6. The symbol * represents $p<0.05$, and ** represents $p<0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test): DPDT pre-treated cells were compared to cells only exposed to mutagens.

Fig.2. Clonogenic survival of V79 cells pretreated with non-cytotoxic doses of DPDT for 2h in medium without FBS, and challenged with mutagen for 2 at 37°C in the dark. Results are expressed as mean \pm SD, n=5. The symbol * represents $p<0.05$, and ** represents $p<0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test): DPDT pretreated cells were compared to cells only exposed to mutagens.

Fig. 3. DPDT pre-treatments were compared to cells only exposed to mutagen. Solvent was used as a negative control. Data are expressed as means \pm SDs, n = 5. The symbols * represents $p<0.05$, and ** represents $p<0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test).

Fig. 4. DPDT pre-treatments were compared to cells only exposed to mutagen as evaluated by a modified comet assay using FPG (clear bars) and Endo III (black bars) enzymes. The oxidative damage score was calculated as the difference between the score obtained after incubation with the respective enzyme or with the enzyme buffer. Solvent was used as a negative control. Data are expressed as means \pm SDs, n = 5. The symbols * represents $p<0.05$, and ** represents $p<0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test).

Fig. 5. A Micronuclei induction in V79 cells by 2-h DPDT treatment. **B.C** DPDT pretreated cells were compared to cells only exposed to mutagens MMS (40 μ mol) or UV C 5J/m². Results are expressed as mean \pm SD, n=3. The symbol ** represents $p<0.01$, and *** represents $p<0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test).

Fig. 6. Effect of treatment with non-mutagenic doses of DPDT on the cell proliferation measured by NDI for 2h in medium without FBS, and challenged with MMS (40 μ mol) or UV C 5J/m². Results are expressed as mean \pm SD, n=3. The symbol * represents $p<0.05$, and ** represents $p<0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test): DPDT pretreated cells were compared to cells only exposed to mutagens.

Fig. 7. Flow cytometry analysis of ROS generation induced by DPDT at the indicated concentrations for 2 h in V79 cells. **A** Increased ROS production after treatment with DPDT evidenced by the cells shift to the right on the linear x-axis of the representative histograms. **B** ROS production induced by DPDT. **C** Fluorescence intensity of ROS. Solvent was used as a negative control. Data are expressed as mean \pm SD, n = 8. Significantly different in relation to the negative control or in relation to the treatment at the same DPDT concentration, *P , 0.05, **P, 0.01 and ***P , 0.001 by one-way analysis of variance with Tukey's Multiple Comparison Test.

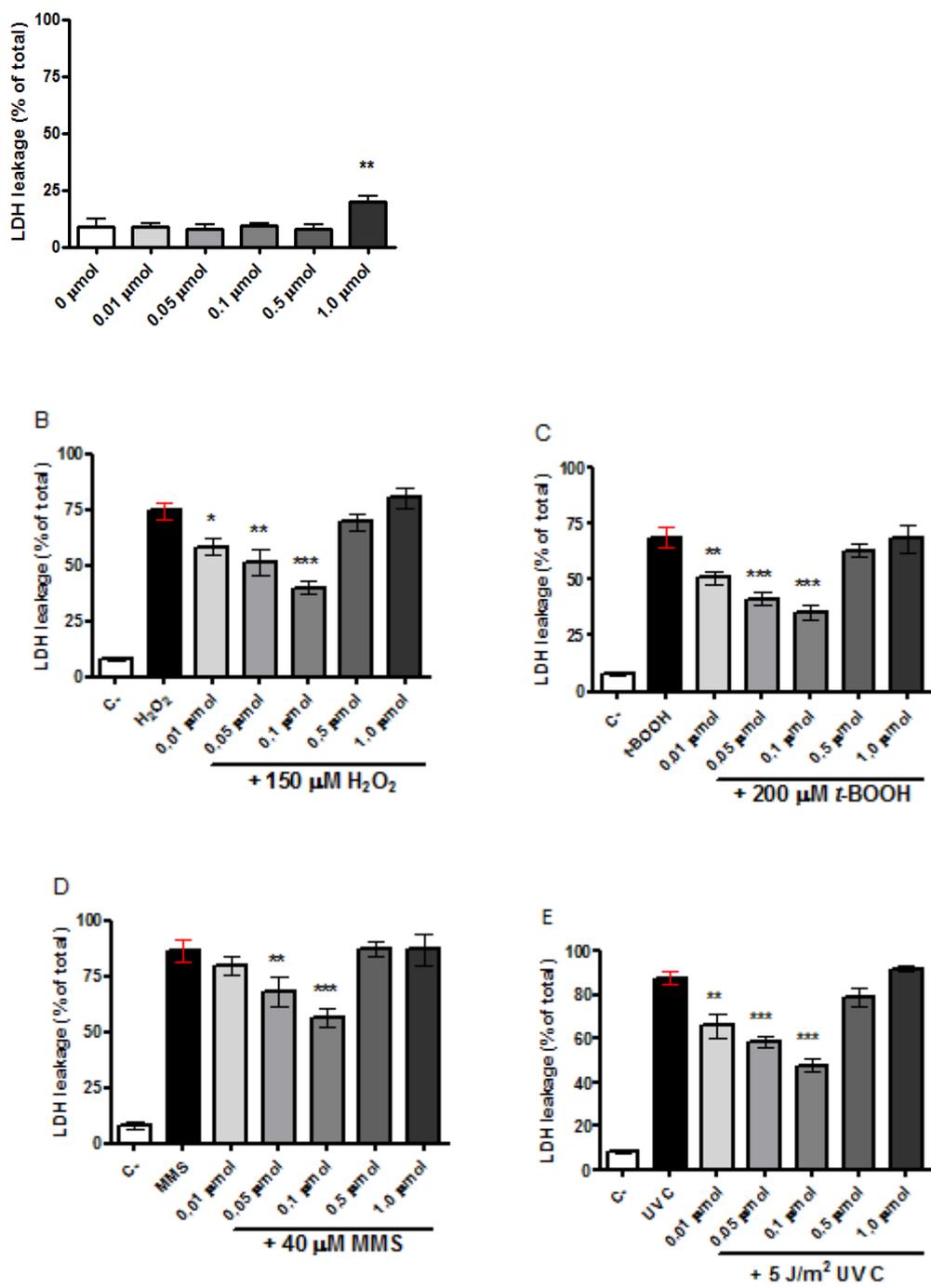


Fig. 1.

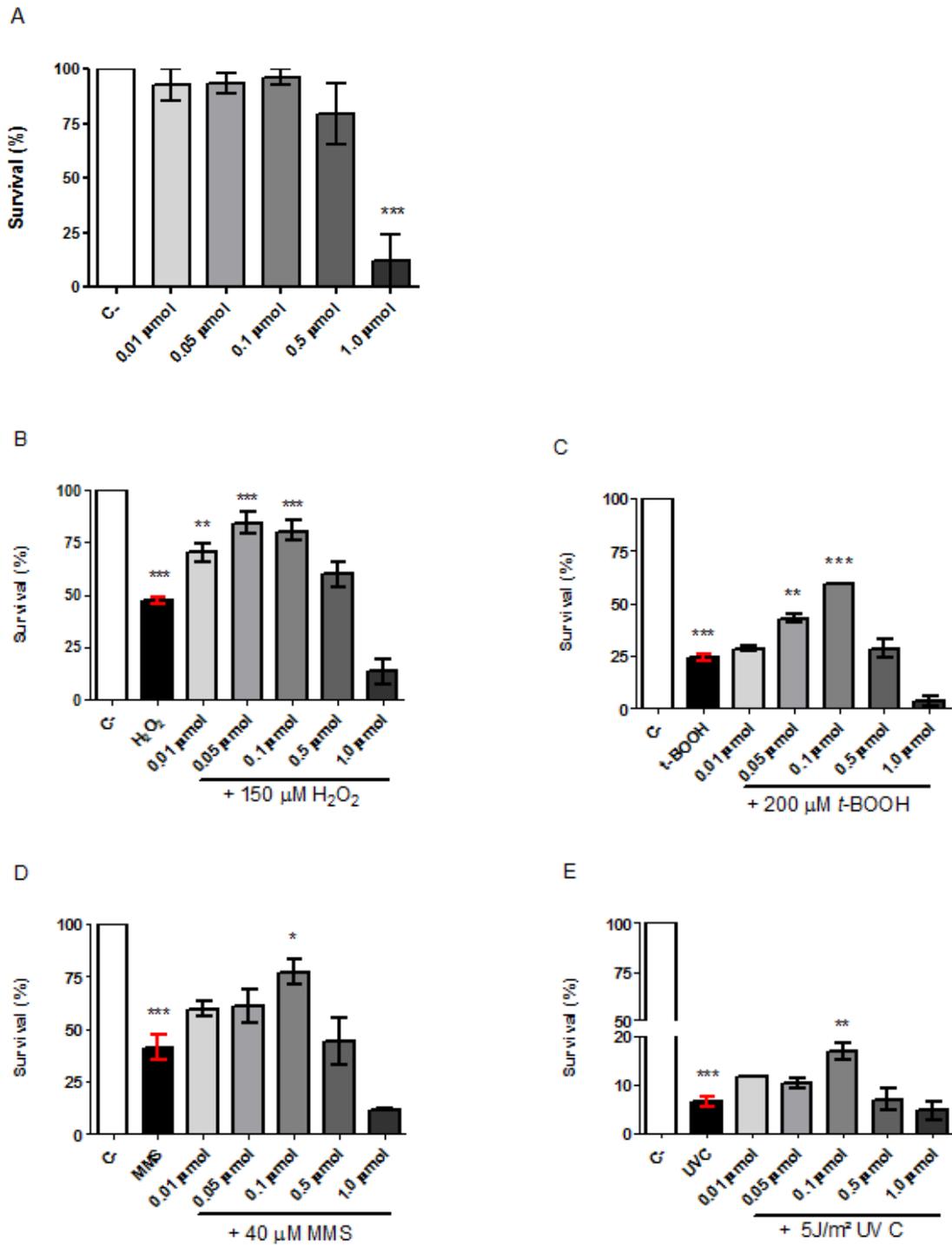


Fig. 2.

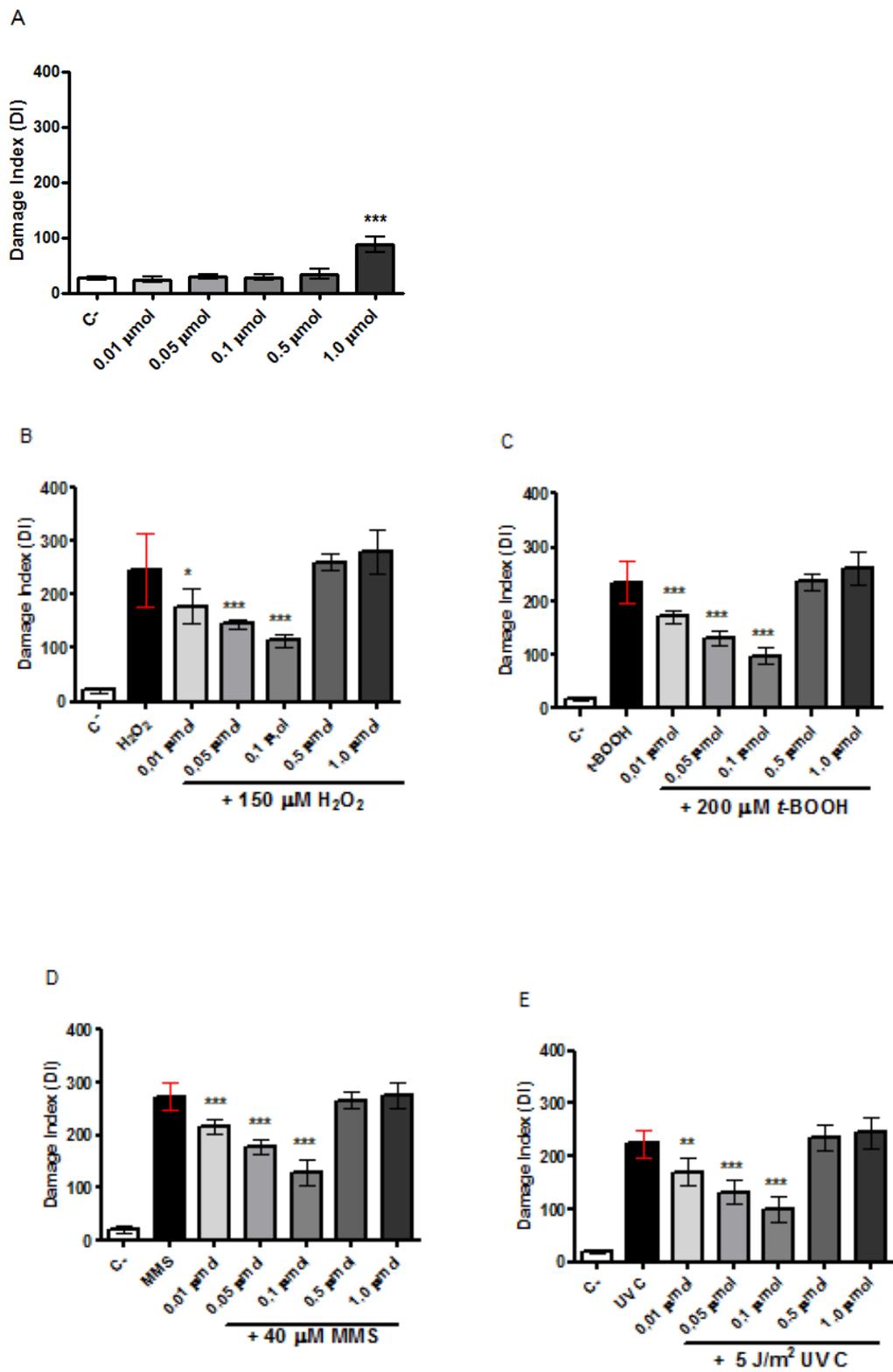
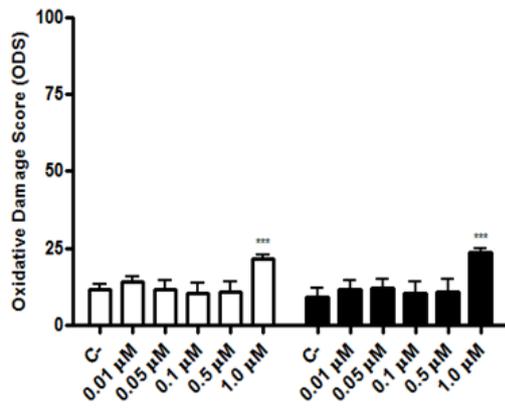
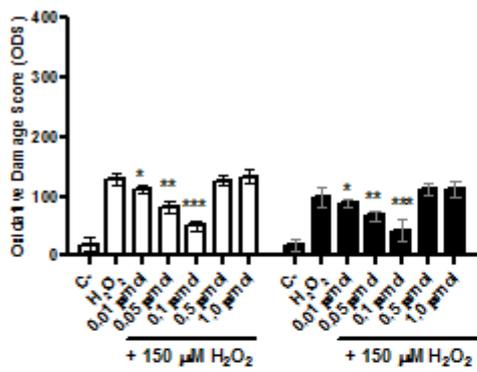


Fig. 3.

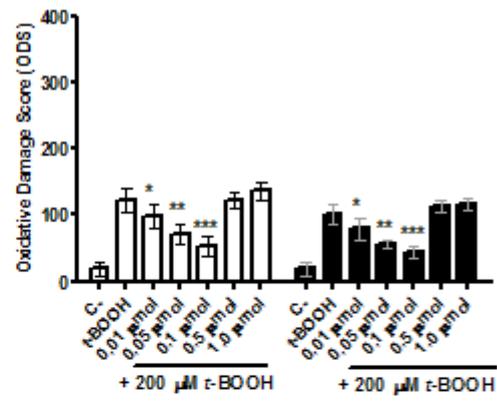
A



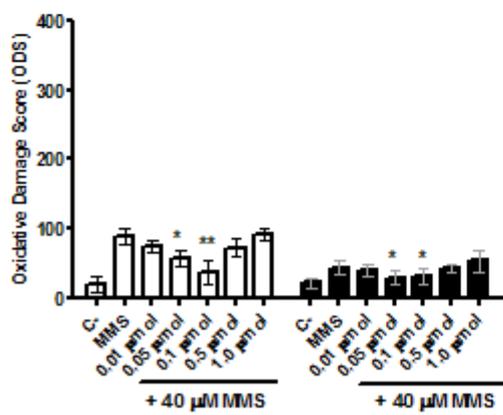
B



C



D



E

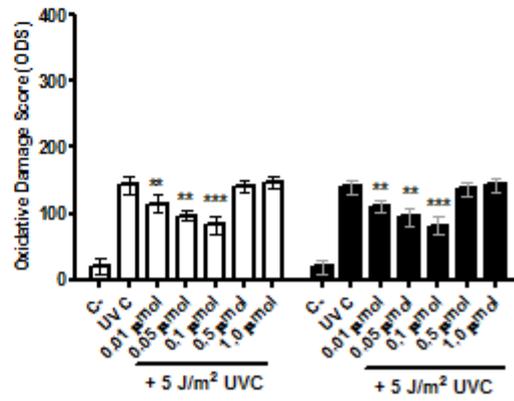
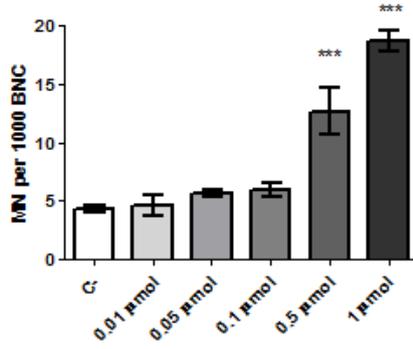
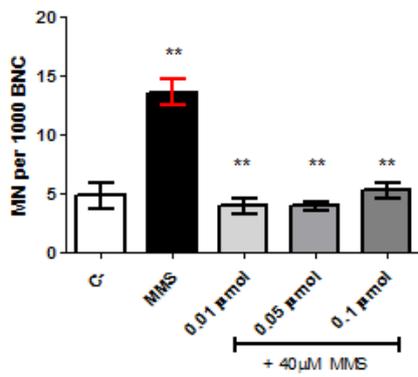


Fig. 4.

A



B



C

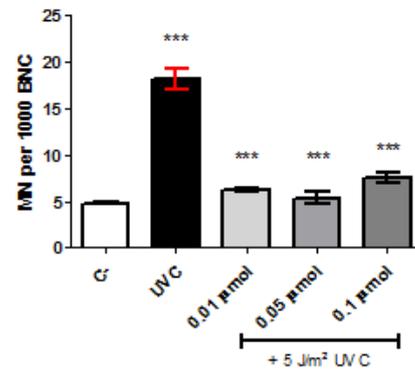
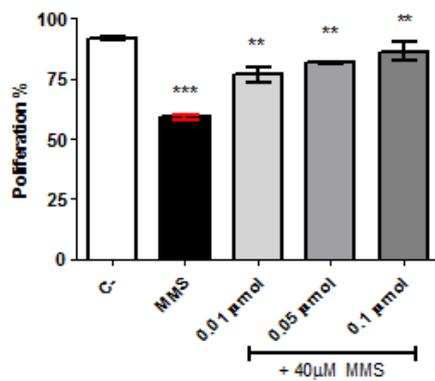


Fig. 5.

A



B

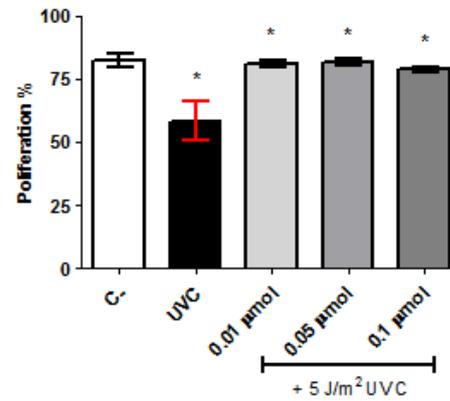


Fig. 6.

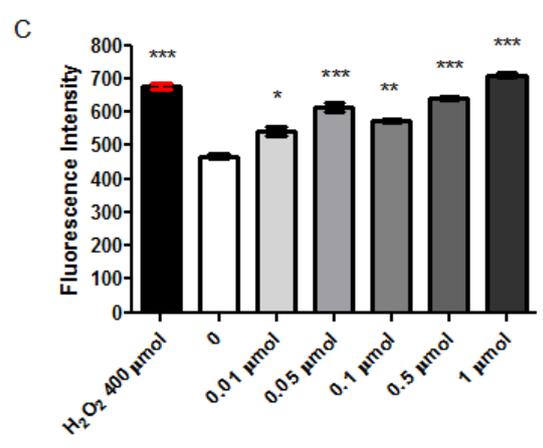
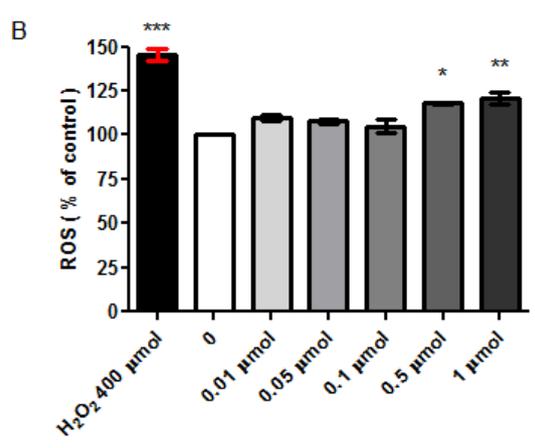
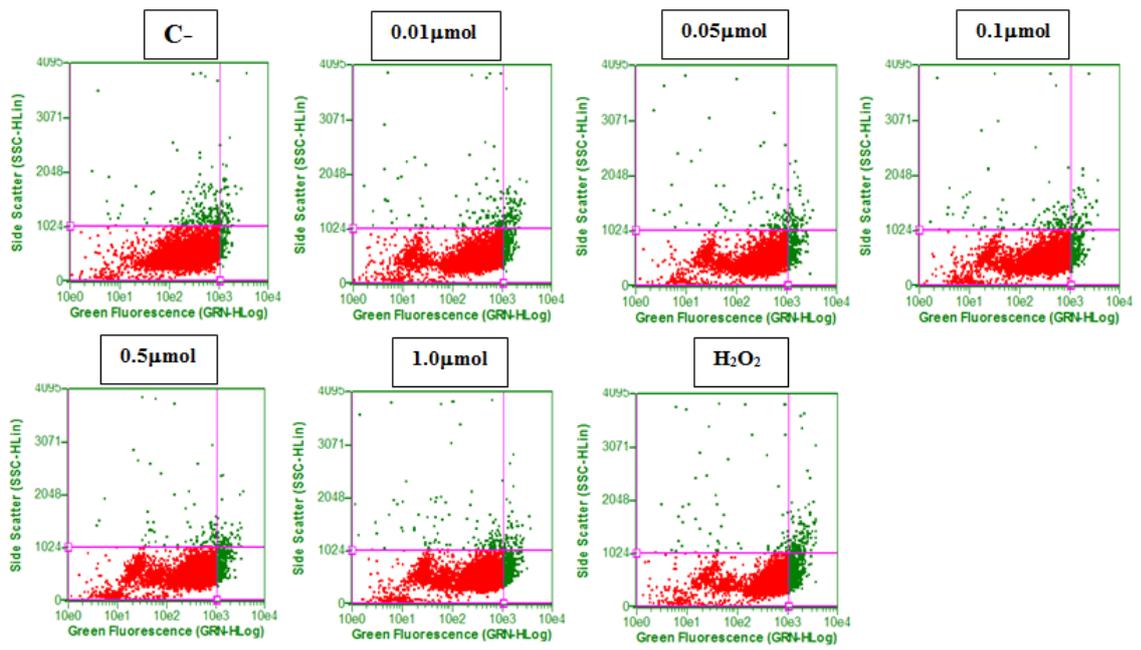


Fig. 7.

Table 1: Influence of 2h DPDT treatment at lower concentrations on enzymatic activities in V79 cells.

Concentration	SOD activity (U SOD/mg protein)	CAT activity ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein min}$)	TBARS (nmol MDA/ mg protein)
0 μmol	3 \pm 1,84	6,45 \pm 1,49	1,2 \pm 0,04
0.01 μmol	33,91 \pm 1,11****	2,09 \pm 1,14**	1,45 \pm 0,27
0.05 μmol	39 \pm 1,89****	2,56 \pm 1,22**	0,7 \pm 0,04
0.1 μmol	45 \pm 2,32****	2,56 \pm 1,8*	0,65 \pm 0,21
0.5 μmol	90,16 \pm 2,92****	2,98 \pm 0,8*	3,6 \pm 0,04****
1 μmol	111,01 \pm 11,25****	5,19 \pm 3,8	4,9 \pm 0,22****
H ₂ O ₂ - 500 μmol	-	-	6,6 \pm 1,4****

Table 1: Influence of DPDT pre-treatment at lower concentrations during 2h in medium without FBS on enzymatic activities in V79 cells. The symbol *represents $p < 0.05$, **represents $p < 0.01$ and ****represents $p < 0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test): DPDT treatments were compared to negative control.

7. DISCUSSÃO

O elemento Telúrio vem sendo estudado desde sua descoberta em 1840, principalmente para a síntese e biocatálise de produtos industriais (Rezanka & Sigler 2008). No século XX foi o grande auge desse elemento traço, em razão da descoberta de novas atividades biológicas como: imunomoduladora, antitumoral, antiviral e antioxidante (revisado por Chasteen *et al.* 2009; Sredni 2012).

Os compostos derivados de telúrio, tanto nas suas formas orgânicas quanto inorgânicas, apresentaram toxicidade em ratos, camundongos e diversas linhagens de células *in vitro* em concentrações menores que compostos organoselenados. No entanto, os compostos organotelurados apresentam maior atividade antioxidante em faixas estreitas de concentrações bem menores (na ordem de micromol/nanomol) em comparação com seus derivados de selênio. Isto mostra que compostos derivados de telúrio possuem efeitos biológicos distintos em função de sua concentração ou dose (Nogueira *et al.* 2004; Cunha *et al.* 2009). Resultados do nosso grupo mostraram que o composto DTDF em altas concentrações apresenta citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade (Degrandi *et al.*, 2010). Entretanto, outros trabalhos relataram que o DTDF pode apresentar atividade antioxidante em baixas concentrações (Rossato *et al.* 2002; Borges *et al.* 2005; Brito *et al.* 2009; Ávila *et al.* 2012).

Nesse trabalho, foram avaliados os efeitos antígeno-tóxico e antimutagênico do DTDF em células V79. Um dos primeiros desafios na busca de novos efeitos biológicos para moléculas com potencial farmacodinâmico é delinear o intervalo de dose tóxica e a distância, em termos de concentração, para a faixa com possibilidade de encontrarem-se atividades farmacológicas interessantes. Nas condições experimentais utilizadas, concentrações acima de 1.0 μmol de DTDF são citotóxicas e genotóxicas, enquanto que a zona de segurança encontra-se abaixo de 0.5 μmol .

O H_2O_2 e *t*-BOOH são dois mutágenos clássicos, capazes de produzir o radical hidroxil e, conseqüentemente, oxidar bases e causar quebras na fita de DNA (Slupphaug *et al.* 2003). Após o pré-tratamento com o DTDF, as lesões induzidas ao DNA pelos agentes oxidantes reduziram e conseqüentemente a sobrevivência da população celular aumentou mais de duas vezes nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1 μmol . Notavelmente, a

concentração de 0,1 μmol do DTDF foi mais efetiva, reduzindo em mais de 50% os danos no DNA e aumentando a viabilidade celular na mesma proporção em comparação com ambos mutágenos oxidantes. Reforçando esses resultados, o pré-tratamento com o DTDF diminui os danos oxidativos pela redução no número de purinas e pirimidinas oxidadas, determinado pelo ensaio cometa modificado. Esses resultados estão de acordo com Rossato e colaboradores (2002) e Brito e colaboradores (2009) que relataram a proteção conferida pelo DTDF em condições de estresse oxidativo contra diferentes agentes oxidantes em ratos.

Comparando o efeito protetor do DTDF na concentração de 0,1 μmol com o disseleneto de difenila (12,5 μmol) no mesmo modelo de estudo e sob as mesmas condições (Rosa *et al.* 2007b), foi confirmado que compostos organotelurados podem apresentar efeito protetor tão significativo quanto organoselenados. No caso do DTDF, a concentração protetora é 125 vezes menor que a do disseleneto de difenila, o que torna esse composto um bom candidato para futuros estudos com aplicação terapêutica.

Como pode ser observado no anexo 1 e 2, o co-tratamento com DTDF apresentou efeito protetor em células V79, porém não diminuiu a formação de bases oxidadas no DNA como esperado. Ainda mais, os danos de origem oxidativa aumentaram, sugerindo um efeito sinérgico. Degrandi e colaboradores (2010) relataram que o DTDF causa danos oxidativos em células V79, possivelmente por aumentar os níveis intracelular de ROS. Já Pinton e colaboradores (2011) relataram que o DTDF apresenta ação pró-oxidante em pulmão de ratos. Esses trabalhos estão em acordo com os nossos resultados, sugerindo que o DTDF tem ação pró-oxidante. No caso do co-tratamento com DPDF, as células não têm tempo suficiente para aumentar suas defesas antioxidantes, o que acontece durante o pré-tratamento, acarretando um aumento dos danos oxidativos induzidos pelos agentes genotóxicos testados. Reforçando a hipótese de ação pró-oxidante, o pós-tratamento com DTDF (anexo 3 e 4) não conferiu proteção contra nenhum dos mutágenos testados, porém, induziu um aumento no número de purinas e pirimidinas oxidadas.

O MMS é um agente alquilante eletrofílico capaz de reagir com uma série de sítios nucleofílicos na molécula de DNA. Em termos de potencial eletrostático negativo, os átomos de nitrogênio da posição 7 da guanina, o oxigênio na posição 6 da guanina e o nitrogênio em posição 3 da adenina representam os sítios preferenciais de metilação, principalmente quando localizados na fenda maior da dupla hélice (Wyatt & Pittman

2006). Estima-se que o MMS realiza uma substituição nucleofílica bimolecular e diversos mecanismos de reparação estão envolvidos na restauração da integridade da estrutura do DNA e preservação da informação genômica (Kaina 2003; Wyatt & Pittman 2006). Existem evidências mostrando a redução do conteúdo de GSH intracelular como consequência a uma tentativa de impedir a ação do MMS (Tirmenstein *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2001; Rosa *et al.* 2006). Nesse sentido, a depleção de GSH conduziria a um estado de estresse oxidativo e quebras de DNA de procedência ligada as lesões oxidativas.

Após o pré-tratamento com o DTDF, pode-se perceber a neutralização dos efeitos do MMS em células V79, em termos de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, reduzindo a frequência de MN em 50 %. Até o presente momento, não existe nenhum dado a respeito do efeito modulatório de compostos organotelurados na ação de agentes alquilantes de DNA. O composto em estudo nesse trabalho previne as lesões induzidas por MMS ao DNA, semelhante ao efeito protetor do seu análogo de selênio (disseleneto de difenila) em células V79 (Rosa *et al.* 2007b).

Os experimentos empregando radiação ultravioleta (UVC) forneceram, além do auxílio no entendimento do efeito protetor do DTDF, informação interessante do ponto de vista quimiopreventivo. De fato, a radiação nessa região espectral é responsável por inúmeros efeitos biológicos na pele e a super-exposição a esse agente físico está diretamente correlacionada ao desenvolvimento de queimaduras, hiperpigmentação, edema, hiperplasia, imunossupressão, envelhecimento precoce, fototoxicidade e principalmente câncer de pele. Esses eventos estão associados, ao menos em parte, com a ocorrência de estresse oxidativo (Krause *et al.* 2006; Psotova *et al.* 2006).

A radiação UVC pode danificar o DNA diretamente, causando grandes distorções na estrutura da hélice. As lesões mais frequentes induzidas nessa situação são os dímeros de pirimidina *cis*-ciclobutano, formados entre as ligações 5 e 6 de bases pirimídicas adjacentes, principalmente as timinas e os fotoprodutos 6-4, caracterizados por uma ligação estável entre as posições 6 e 4 de duas pirimidinas vizinhas; dímeros de purinas e monoadutos de pirimidinas (Pfeifer *et al.* 2005; Nakabeppu *et al.* 2006). Indiretamente, radicais livres e seus produtos de peroxidação são responsáveis pelo ataque oxidativo às cadeias de DNA, embora esse efeito indireto ainda seja um pouco controverso em relação à radiação UVC (Bruge *et al.* 2003; Pustisek & Situm 2011). Conforme esperado, o pré-tratamento com o DTDF conferiu um efeito quimiopreventivo, reduzindo a genotoxicidade

gerada pela radiação UVC e reduzindo a frequência de MN. Esse efeito protetor do DTDF contra MMS e radiação UV C pode ser explicado em parte pela atividade mimética de GPx (Hassan *et al.* 2009). Outro possível mecanismo de proteção contra a ação mutagênica do MMS pode ser redução da habilidade de alquilar o DNA. Ainda, O DTDF poderia modular fatores de transcrição com atividade quimiopreventiva, semelhante a que foi demonstrada pelo composto organotelurado dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato (Ávila *et al.* 2012), modulando a expressão de numerosos genes antioxidantes e anti-inflamatórios, que podem diminuir ou inibir o efeito de carcinógenos. Além disso, os nossos resultados são consistentes com aqueles relatados na literatura, mostrando que alguns compostos organotelurados tais como o diaril ditelureto, dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato e teluretos arílicos apresentam potencial protetor em baixas concentrações (Rossato *et al.*, 2002; Borges *et al.* 2005; Brito *et al.* 2009; Ávila *et al.* 2012).

Pouco se sabe sobre os efeitos do DTDF na indução de danos no DNA por ROS em células de mamíferos. A proteção observada no pré-tratamento com DTDF em baixas concentrações e o efeito sinérgico em co-tratamento com mutágenos conhecidos não é óbvia, mas provavelmente reside em um efeito pró-oxidante. Propriedades pró-oxidantes são definidas para os produtos químicos que induzem estresse oxidativo, normalmente através da formação de espécies reativas ou inibição de sistemas antioxidantes (Halliwell, 2008; Carochi *et al.* 2012). Halliwell (2008) postulou que o efeito pró-oxidante pode ser benéfico, uma vez que um nível baixo de estresse oxidativo pode elevar os níveis das defesas antioxidantes e enzimas que metabolizam xenobióticos, levando a uma citoproteção. Procházková (2011) sugeriu que pró-oxidantes podem ter propriedades de sinalização celular, que são essenciais para a vida, mais uma vez atribuindo um papel útil para eles.

Com o objetivo de aumentar o conhecimento a respeito do mecanismo do efeito protetor do DTDF, foram investigados a formação de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica em células V79. Como pode ser observado na Figura 7B (Capítulo I), o tratamento com o DTDF nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1 μmol não aumentou significativamente os níveis de ROS, porém, nas duas maiores concentrações testadas, foi detectado aumento nos níveis de ROS. Além disso, este tratamento aumentou significativamente a intensidade dos foci de ROS em todas as concentrações testadas (Figura 7C, Capítulo I). Reforçando estes resultados, quando foi determinado o grau de

peroxidação lipídica em células V79 tratadas com o DTDF, verificou-se um aumento nos níveis de TBARS em concentrações maiores que 0,1 μmol , sugerindo que ROS tem um papel importante na citotoxicidade do DTDF em células V79. Para entender melhor estes resultados, foram avaliadas as defesas antioxidantes enzimáticas. O tratamento com o DTDF em todas as concentrações aumentou a atividade da enzima SOD, porém, esse composto organotelurado inibiu a atividade de CAT em células V79 (Tabela 1, Capítulo I).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o efeito protetor do DTDF é devido a ação pró-oxidante. O aumento da atividade de SOD, acompanhado por inibição da atividade de CAT gera desequilíbrio em defesas antioxidantes da célula. Estes resultados estão de acordo com Pinton e colaboradores (2010) que demonstraram aumento da atividade de SOD em pulmão de ratos após tratamento com DTDF em doses de 0.3 $\mu\text{mol/kg}$ e 0,6 $\mu\text{mol/kg}$. Além disso, Comparsi e colaboradores (2012) relataram que o DTDF diminuiu a atividade de CAT em cérebro de ratos, no entanto, não alterou a atividade da enzima em fígado de ratos. Estudos prévios mostraram que a inibição da atividade de SOD poderia ser resultado da inativação dessa enzima por agentes oxidantes (Rigobello *et al.* 2011; Anbarasi *et al.* 2006). Por outro lado, o aumento da atividade de SOD em nosso estudo poderia ser resultado de uma resposta adaptativa ao efeito pró-oxidante do DTDF. Esse organotelurado é um composto eletrofílico, que pode sofrer ataque nucleofílico tiol no átomo de telúrio, conferindo propriedade pró-oxidante (Rigobello *et al.* 2011; Comparsi *et al.* 2012).

Vários estudos têm demonstrado que os radicais livres de oxigênio podem induzir a ativação de numerosas proteínas de sinalização, incluindo as do Receptor Tirosina Kinase, MAPKs e fatores de transcrição (Boonstra & Post 2011). Ávila e colaboradores (2012) mostraram que o composto organotelurado dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato causa a translocação de DAF-16 do citosol para o núcleo em *C. elegans*. Esse achado indica que compostos organotelurados podem modular essa via, induzindo a produção de defesas antioxidantes enzimáticas, como SOD e glutathiona peroxidase. Neste cenário, é possível que a resistência ao estresse oxidativo induzido pelo pré-tratamento com o DTDF em nossos estudos poderia depender da ativação de fatores de transcrição.

Tendo em vista o efeito antioxidante do DTDF em baixas concentrações, foi verificado o efeito protetor deste composto em relação a danos induzidos por DOX, visando uma possível aplicação clínica. O pré-tratamento com este composto

organotelurado diminui os níveis de ROS gerados pela DOX em linhagens de fibroblasto humano (MRC5) e de hamster (V79) (anexo 5). Além disso, o pré-tratamento com o DTDF reduziu a toxicidade gerada pela DOX (anexo 6), diminuindo os danos ao DNA e o número de bases oxidadas (Anexo 7 e 8). A redução da geração de ROS, após tratamento com DOX pode ser explicada por aumento nas defesas antioxidantes em uma resposta adaptativa a ação pró-oxidante do DTDF.

Em resumo, os dados obtidos no presente estudo mostraram que o pré-tratamento com baixas concentrações de DTDF protege contra citotoxicidade, danos no DNA e mutagênese induzida por H_2O_2 , *t*-BOOH, MMS e UVC. Este é o primeiro relato demonstrando que o pré-tratamento com o DTDF pode estimular uma resposta adaptativa por ação pró-oxidante, prevenindo indução de lesões após um desafio genotóxico posterior. Assim, a investigação do potencial antimutagênico do DTDF e seus derivados estruturais pode ajudar a desenvolver novas e mais eficientes estratégias quimiopreventivas.

5 CONCLUSÕES

5.1 Conclusão geral

Esse trabalho é o primeiro relato demonstrando que o pré-tratamento com o DTDF em baixas concentrações pode estimular uma resposta adaptativa em células V79, possivelmente pela sua ação pro-oxidante. A resposta adaptativa induzida pelo DPDF protege as células V79 de um desafio posterior com diversos mutágenos clássicos, aumentando sobrevivência e diminuindo os efeitos genotóxicos.

5.2 Conclusões específicas

1. O pré-tratamento com o DTDF em baixas concentrações aumenta a viabilidade celular e reduz os danos ao DNA e o número de bases oxidadas contra todos mutágenos testados nesse trabalho, evidenciando um potencial citoprotetor e antígenotóxico.
2. O pré-tratamento com DTDF nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1 μmol confere um efeito quimioprotetor contra os efeitos mutagênicos do MMS e radiação UVC.
3. O tratamento das células V79 com o DTDF em todas as concentrações aumenta a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e inibe a atividade da catalase.
4. O tratamentos das células V79 com as concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1 μmol do DTDF não aumentam a geração de ROS e a peroxidação lipídica, porém aumenta a intensidade das *foci* de ROS formadas.
5. O pré-tratamento com DTDF diminui a geração de ROS e citotoxicidade gerada pela DOX.

6 Perspectivas

Seria importante para o seguimento do trabalho, complementação dos resultados e progresso do conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares das atividades biológicas do ditelureto de difenila, com as seguintes abordagens experimentais:

1. Para correlação com o efeito pró-oxidante será necessário a determinação do conteúdo de GSH, atividade da enzima GPx.
2. Investigar o papel da ação pró-oxidante do DTDF na indução de apoptose em linhagens celulares normais e tumorais (leucemia linfocítica Jurkat-E6; leucemia promielocítica HL-60; hepatoma humano HepG2; glioma murino C6; adenocarcinoma de mama humano MCF-7; adenocarcinoma de cólon humano Caco-2 ou HT-29).
3. Avaliar o efeito protetor do DTDF contra a toxicidade gerada pela DOX e analisar o ciclo celular e morte celular por apoptose e necrose por citometria de fluxo em linhagens celulares proficientes e deficientes em NER (V79, MRC5 e XPD).
4. Avaliar o efeito protetor do DTDF contra a toxicidade gerada pela DOX pelo ensaio de micronúcleos com análise do citoma celular (pontes nucleoplásicas, brotos, apoptose, necrose, MN) em linhagens celulares proficientes e deficientes em NER (V79, MRC5 e XPD).

7 Referências

- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* **105**, 121-6.
- Anbarasi K., Vani G., Balakrishna K. & Devi C.S. (2006) Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sci* **78**, 1378-84.
- Avila D.S., Benedetto A., Au C., Manarin F., Erikson K., Soares F.A., Rocha J.B. & Aschner M. (2012) Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. In: *Free Radic Biol Med*, pp. 1903-10.
- Avila D.S., Colle D., Gubert P., Palma A.S., Puntel G., Manarin F., NoreMBERG S., Nascimento P.C., Aschner M., Rocha J.B. & Soares F.A. (2010) A possible neuroprotective action of a vinylic telluride against Mn-induced neurotoxicity. *Toxicol Sci* **115**, 194-201.
- Bannister J.V. & Calabrese L. (1987) Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* **32**, 279-312.
- Barbosa N.B., Rocha J.B., Zeni G., Emanuelli T., Beque M.C. & Braga A.L. (1998) Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **149**, 243-53.
- Barrera G. (2012) Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* **2012**, 137289.
- Boles J.O., Lebioda L., Dunlap R.B. & Odom J.D. (1995) Telluromethionine in structural biochemistry. *SAAS Bull Biochem Biotechnol* **8**, 29-34.
- Boonstra J. & Post J.A. (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* **337**, 1-13.
- Borges V.C., Rocha J.B. & Nogueira C.W. (2005) Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. *Toxicology* **215**, 191-7.
- Borges V.C., Rocha J.B., Savegnago L. & Nogueira C.W. (2007) Repeated administration of diphenyl ditelluride induces hematological disorders in rats. *Food Chem Toxicol* **45**, 1453-8.
- Brito V.B., Rocha J.B., Folmer V. & Erthal F. (2009) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice. *Acta Biochim Pol* **56**, 125-34.

- Briviba K., Tamler R., Klotz L.O., Engman L., Cotgreave I.A. & Sies H. (1998) Protection by organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. *Biochem Pharmacol* **55**, 817-23.
- Bruge F., Tiano L., Cacciamani T., Principi F. & Littarru G.P. (2003) Effect of UV-C mediated oxidative stress in leukemia cell lines and its relation to ubiquinone content. *Biofactors* **18**, 51-63.
- Carocho M. & Ferreira I.C. (2012) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* **51C**, 15-25.
- Carvalho C.A., Gemelli T., Guerra R.B., Oliboni L., Salvador M., Dani C., Araujo A.S., Mascarenhas M. & Funchal C. (2009) Effect of in vitro exposure of human serum to 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-en-1-one on oxidative stress. *Mol Cell Biochem* **332**, 127-34.
- Cerejido M., Contreras R.G., Shoshani L. & Larre I. (2012) The Na⁺-K⁺-ATPase as self-adhesion molecule and hormone receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**, C473-81.
- Chasteen T.G., Fuentes D.E., Tantalean J.C. & Vasquez C.C. (2009) Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 820-32.
- Comparsi B., Meinerz D.F., Franco J.L., Posser T., de Souza Prestes A., Stefanello S.T., Dos Santos D.B., Wagner C., Farina M., Aschner M., Dafre A.L. & Rocha J.B. (2012) Diphenyl ditelluride targets brain selenoproteins in vivo: inhibition of cerebral thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in mice after acute exposure. *Mol Cell Biochem* **370**, 173-82.
- Culotta V.C., Yang M. & O'Halloran T.V. (2006) Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 747-58.
- Cunha R.L., Gouvea I.E. & Juliano L. (2009) A glimpse on biological activities of tellurium compounds. *An Acad Bras Cienc* **81**, 393-407.
- Cunha R.L., Urano M.E., Chagas J.R., Almeida P.C., Bincoletto C., Tersariol I.L. & Comasseto J.V. (2005) Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium(IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 755-60.
- de Souza Prestes A., Stefanello S.T., Salman S.M., Pazini A.M., Schwab R.S., Braga A.L., de Vargas Barbosa N.B. & Rocha J.B. (2012) Antioxidant activity of beta-selenoamines and their capacity to mimic different enzymes. *Mol Cell Biochem* **365**, 85-92.

- Degrandi T.H., de Oliveira I.M., d'Almeida G.S., Garcia C.R., Villela I.V., Guecheva T.N., Rosa R.M. & Henriques J.A. (2010) Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* **25**, 257-69.
- Dickey J.S. & Rao V.A. (2012) Current and proposed biomarkers of anthracycline cardiotoxicity in cancer: emerging opportunities in oxidative damage and autophagy. *Curr Mol Med* **12**, 763-71.
- Emanuelli T., Pagel F.W., Alves L.B., Regner A. & Souza D.O. (2001) 5-Aminolevulinic acid inhibits [3H]muscimol binding to human and rat brain synaptic membranes. *Neurochem Res* **26**, 101-5.
- Engman L., Al-Maharik N., McNaughton M., Birmingham A. & Powis G. (2003) Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium antioxidants. *Anticancer Drugs* **14**, 153-61.
- Engman L., Kandra T., Gallegos A., Williams R. & Powis G. (2000) Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. *Anticancer Drug Des* **15**, 323-30.
- Fairhill LT (1969) Tellurium. In: *Industrial Toxicology*. Hafner Publishing Co, New York
- Fridovich I. (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* **201**, 1203-9.
- Friedman M., Bayer I., Letko I., Duvdevani R., Zavaro-Levy O., Ron B., Albeck M. & Sredni B. (2009) Topical treatment for human papillomavirus-associated genital warts in humans with the novel tellurium immunomodulator AS101: assessment of its safety and efficacy. *Br J Dermatol* **160**, 403-8.
- Funchal C., Moretto M.B., Vivian L., Zeni G., Rocha J.B. & Pessoa-Pureur R. (2006) Diphenyl ditelluride- and methylmercury-induced hyperphosphorilation of the high molecular weight neurofilament subunit is prevented by organoselenium compounds in cerebral cortex of young rats. *Toxicology* **222**, 143-53.
- Goncalves T.L., Benvegnu D.M., Bonfanti G., Frediani A.V., Pereira D.V. & Rocha J.B. (2009) Oxidative stress and delta-ALA-D activity in different conditioning regimens in allogeneic bone marrow transplantation patients. *Clin Biochem* **42**, 602-10.
- Green M, Harwood H, Barrowman C, Rahman P, Eggeman A & Festry F (2007) A facile route to CdTe nanoparticles and their use in bio-labelling. *J Mater Chem* **17**:1989–1994
- Gutteridge J.M. & Halliwell B. (2010) Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* **393**, 561-4.
- Halliwell B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **35**, 1147-50.

- Halliwell B. (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* **476**, 107-12.
- Halliwell B. (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* **70**, 257-65.
- Hassan W., Ibrahim M., Nogueira C.W., Braga A.L., Deobald A.M., Mohammadzai I.U. & Rocha J.B. (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.
- Heimfarth L., Loureiro S.O., Dutra M.F., Andrade C., Pettenuzzo L., Guma F.T., Goncalves C.A., da Rocha J.B. & Pessoa-Pureur R. (2012) In vivo treatment with diphenyl ditelluride induces neurodegeneration in striatum of young rats: Implications of MAPK and Akt pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* **264**, 143-52.
- Haynes CA, Koder RL, Miller AF & Rodgers DW (2002) Structures of nitroreductases in three states. Effects of inhibitor binding and reduction. *J Biol Chem* **277**: 11513-11520
- Henriques JA, Dafré AL, Picada JN, Maris AF & Salvador M (2001) Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: Serafini LA, de Barros NM & Azevedo JL (Eds.), *Biotechnology na agricultura e na indústria*. Guaíba:Agropecuária, p. 227-256
- Kaina B. (2003) DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol* **66**, 1547-54.
- Kalechman Y., Gafter U., Weinstein T., Chagnac A., Freidkin I., Tobar A., Albeck M. & Sredni B. (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**, 24724-32.
- Kanski J., Drake J., Aksenova M., Engman L. & Butterfield D.A. (2001) Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(N,N-dimethylamino)benzenetellurenyl]propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. *Brain Res* **911**, 12-21.
- Krause R., Matulla-Nolte B., Essers M., Brown A. & Hopfenmuller W. (2006) UV radiation and cancer prevention: what is the evidence? *Anticancer Res* **26**, 2723-7.
- Laden B.P. & Porter T.D. (2001) Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J Lipid Res* **42**, 235-40.
- Landis G.N. & Tower J. (2005) Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* **126**, 365-79.

- Liu H., Colavitti R., Rovira, II & Finkel T. (2005) Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* **97**, 967-74.
- Ma Q. (2010) Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther* **125**, 376-93.
- Maciel E.N., Bolzan R.C., Braga A.L. & Rocha J.B. (2000) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* **14**, 310-9.
- Madamanchi N.R., Moon S.K., Hakim Z.S., Clark S., Mehrizi A., Patterson C. & Runge M.S. (2005) Differential activation of mitogenic signaling pathways in aortic smooth muscle cells deficient in superoxide dismutase isoforms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 950-6.
- Meotti F.C., Borges V.C., Zeni G., Rocha J.B. & Nogueira C.W. (2003) Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett* **143**, 9-16.
- Miriyala S., Spasojevic I., Tovmasyan A., Salvemini D., Vujaskovic Z., St Clair D. & Batinic-Haberle I. (2012) Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 794-814.
- Moretto M.B., Boff B., Franco J., Posser T., Roessler T.M., Souza D.O., Nogueira C.W., Wofchuk S. & Rocha J.B. (2007) $(45)Ca^{2+}$ influx in rat brain: effect of diorganochalcogenides compounds. *Toxicol Sci* **99**, 566-71.
- Moretto M.B., Funchal C., Zeni G., Rocha J.B. & Pessoa-Pureur R. (2005) Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. *Toxicology* **210**, 213-22.
- Mugesh G., du Mont W.W. & Sies H. (2001) Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem Rev* **101**, 2125-79.
- Muniz Alvarez J.L., Garcia Calzon J.A. & Lopez Fonseca J.M. (2005) Electrochemistry of diphenylditelluride at the hanging mercury drop electrode in a protic medium. *J Colloid Interface Sci* **287**, 592-6.
- Murakami A., Ashida H. & Terao J. (2008) Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* **269**, 315-25.
- Nakabeppu Y., Sakumi K., Sakamoto K., Tsuchimoto D., Tsuzuki T. & Nakatsu Y. (2006) Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol Chem* **387**, 373-9.

- Newman R.A., Osborn S. & Siddik Z.H. (1989) Determination of tellurium in biological fluids by means of electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-mass spectrometry (ETV-ICP-MS). *Clin Chim Acta* **179**, 191-6.
- Nogueira C.W., Rotta L.N., Perry M.L., Souza D.O. & da Rocha J.B. (2001) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res* **906**, 157-63.
- Nogueira C.W., Zeni G. & Rocha J.B. (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* **104**, 6255-85.
- Octavia Y., Tocchetti C.G., Gabrielson K.L., Janssens S., Crijns H.J. & Moens A.L. (2012) Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 1213-25.
- Ogra Y., Kitaguchi T., Suzuki N. & Suzuki K.T. (2008) In vitro translation with [³⁴S]-labeled methionine, selenomethionine, and telluromethionine. *Anal Bioanal Chem* **390**, 45-51.
- Oka S., Hsu C.P. & Sadoshima J. (2012) Regulation of cell survival and death by pyridine nucleotides. *Circ Res* **111**, 611-27.
- Pfeifer G.P., You Y.H. & Besaratinia A. (2005) Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* **571**, 19-31.
- Pinton S., da Rocha J.T., Zeni G. & Nogueira C.W. (2010) Organoselenium improves memory decline in mice: involvement of acetylcholinesterase activity. *Neurosci Lett* **472**, 56-60.
- Pinton S., Luchese C., Stangherlin E.C. & Nogueira C.W. (2011) Acute exposure to diphenyl ditelluride causes oxidative damage in rat lungs. *Ecotoxicol Environ Saf* **74**, 521-6.
- Prochazkova D., Bousova I. & Wilhelmova N. (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **82**, 513-23.
- Psotova J., Svobodova A., Kolarova H. & Walterova D. (2006) Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *J Photochem Photobiol B* **84**, 167-74.
- Pustisek N. & Situm M. (2011) UV-radiation, apoptosis and skin. *Coll Antropol* **35 Suppl 2**, 339-41.
- Ramadan S.E., Razak A.A., Ragab A.M. & el-Meleigy M. (1989) Incorporation of tellurium into amino acids and proteins in a tellurium-tolerant fungi. *Biol Trace Elem Res* **20**, 225-32.

- Ren X., Xue Y., Zhang K., Liu J., Luo G., Zheng J., Mu Y. & Shen J. (2001) A novel dicyclodextrinyl ditelluride compound with antioxidant activity. *FEBS Lett* **507**, 377-80.
- Rezanka T. & Sigler K. (2008) Biologically active compounds of semi-metals. *Phytochemistry* **69**, 585-606.
- Rigobello M.P., Folda A., Citta A., Scutari G., Gandin V., Fernandes A.P., Rundlof A.K., Marzano C., Bjornstedt M. & Bindoli A. (2011) Interaction of selenite and tellurite with thiol-dependent redox enzymes: Kinetics and mitochondrial implications. *Free Radic Biol Med* **50**, 1620-9.
- Rosa R.M., do Nascimento Picada J., Saffi J. & Henriques J.A. (2007a) Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutat Res* **628**, 87-98.
- Rosa R.M., Melecchi M.I., da Costa Halmenschlager R., Abad F.C., Simoni C.R., Caramao E.B., Henriques J.A., Saffi J. & de Paula Ramos A.L. (2006) Antioxidant and antimutagenic properties of Hibiscus tiliaceus L. methanolic extract. *J Agric Food Chem* **54**, 7324-30.
- Rosa R.M., Moura D.J., Romano E.S.A.C., Saffi J. & Pegas Henriques J.A. (2007b) Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res* **631**, 44-54.
- Rossato J.I., Ketzer L.A., Centuriao F.B., Silva S.J., Ludtke D.S., Zeni G., Braga A.L., Rubin M.A. & Rocha J.B. (2002) Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res* **27**, 297-303.
- Sailer B.L., Liles N., Dickerson S., Sumners S. & Chasteen T.G. (2004) Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicol In Vitro* **18**, 475-82.
- Salgo M.G. & Pryor W.A. (1996) Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys* **333**, 482-8.
- Sarma B.K., Manna D., Minoura M. & Mugesh G. (2010) Synthesis, structure, spirocyclization mechanism, and glutathione peroxidase-like antioxidant activity of stable spirodiazaselenurane and spirodiazatellurane. *J Am Chem Soc* **132**, 5364-74.
- Scandalios J.G. (2002) The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* **27**, 483-6.
- Scansetti G. (1992) Exposure to metals that have recently come into use. *Sci Total Environ* **120**, 85-91.
- Schiar V.P., Dos Santos D.B., Paixao M.W., Nogueira C.W., Rocha J.B. & Zeni G. (2009) Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds

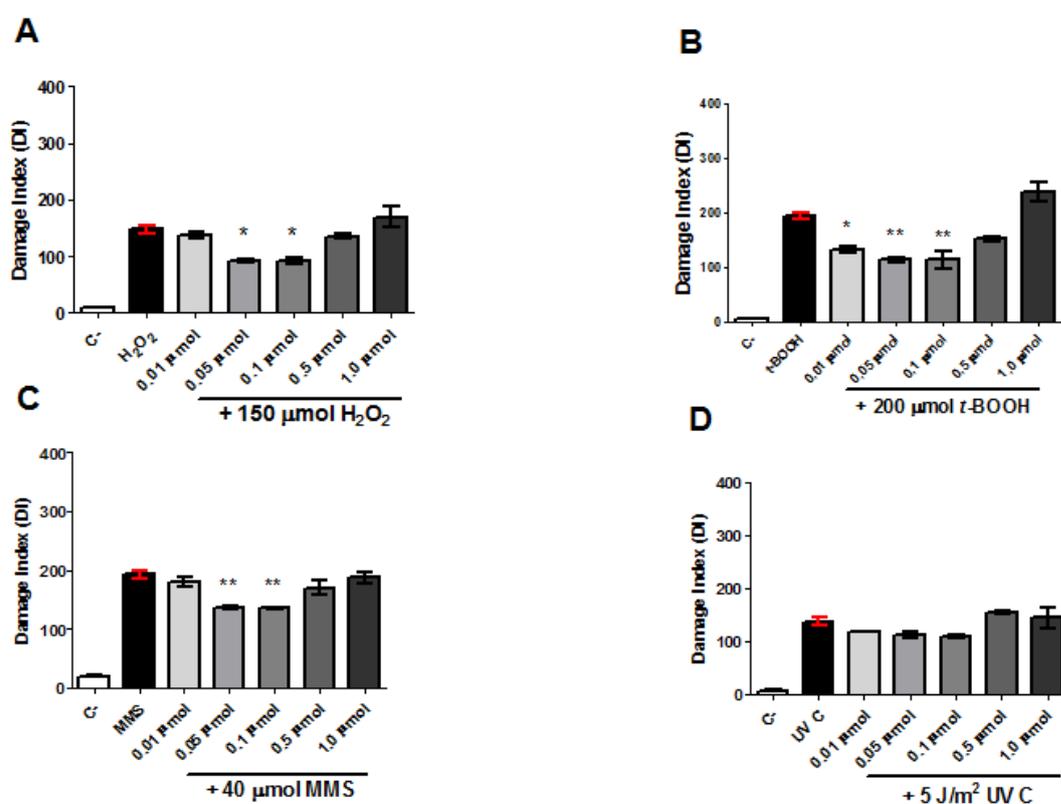
- increased by GSH or glucose: a possible involvement of reactive oxygen species. *Chem Biol Interact* **177**, 28-33.
- Siddik Z.H. & Newman R.A. (1988) Use of platinum as a modifier in the sensitive detection of tellurium in biological samples. *Anal Biochem* **172**, 190-6.
- Sredni-Kenigsbuch D., Shohat M., Shohat B., Ben-Amitai D., Chan C.C. & David M. (2008) The novel tellurium immunomodulator AS101 inhibits interleukin-10 production and p38 MAPK expression in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* **50**, 232-5.
- Sredni B. (2012) Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. *Semin Cancer Biol* **22**, 60-9.
- Stangherlin E.C., Favero A.M., Zeni G., Rocha J.B. & Nogueira C.W. (2005) Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. *Toxicology* **207**, 231-9.
- Svilar D., Goellner E.M., Almeida K.H. & Sobol R.W. (2011) Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal* **14**, 2491-507.
- Tang D.G., La E., Kern J. & Kehrer J.P. (2002) Fatty acid oxidation and signaling in apoptosis. *Biol Chem* **383**, 425-42.
- Taylor A. (1996) Biochemistry of tellurium. *Biol Trace Elem Res* **55**, 231-9.
- Thomas P. & Fenech M. (2011) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. *Methods Mol Biol* **682**, 217-34.
- Tirmenstein M.A., Nicholls-Grzemeski F.A., Zhang J.G. & Fariss M.W. (2000) Glutathione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspensions. *Chem Biol Interact* **127**, 201-17.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J. & Telser J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* **266**, 37-56.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. & Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**, 1-40.
- van Loon B., Markkanen E. & Hubscher U. (2010) Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair (Amst)* **9**, 604-16.
- Voulgaridou G.P., Anestopoulos I., Franco R., Panayiotidis M.I. & Pappa A. (2011) DNA damage induced by endogenous aldehydes: current state of knowledge. *Mutat Res* **711**, 13-27.
- Wyatt M.D. & Pittman D.L. (2006) Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol* **19**, 1580-94.

- Yu L., He K., Chai D., Yang C. & Zheng O. (1993) Evidence for telluroamino acid in biological materials and some rules of assimilation of inorganic tellurium by yeast. *Anal Biochem* **209**, 318-22.
- Yuzhalin A.E. & Kutikhin A.G. (2012) Inherited variations in the SOD and GPX gene families and cancer risk. *Free Radic Res* **46**, 581-99.
- Zeni G., Braga A.L. & Stefani H.A. (2003) Palladium-catalyzed coupling of sp²-hybridized tellurides. *Acc Chem Res* **36**, 731-8.
- Zhang J.G., Nicholls-Grzemeski F.A., Tirmenstein M.A. & Fariss M.W. (2001) Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chem Biol Interact* **138**, 267-84.
- Zheng K., Board P.G., Fei X., Sun Y., Lv S., Yan G., Liu J., Shen J. & Luo G. (2008) A novel selenium-containing glutathione transferase zeta1-1, the activity of which surpasses the level of some native glutathione peroxidases. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 2090-7.
- Zhang H & Swihart MT (2007) Synthesis of tellurium dioxide nanoparticles by spray pyrolysis. *Chem Mater* **19**:1290–1301

8 Anexos

Anexo 1 – Dados suplementares

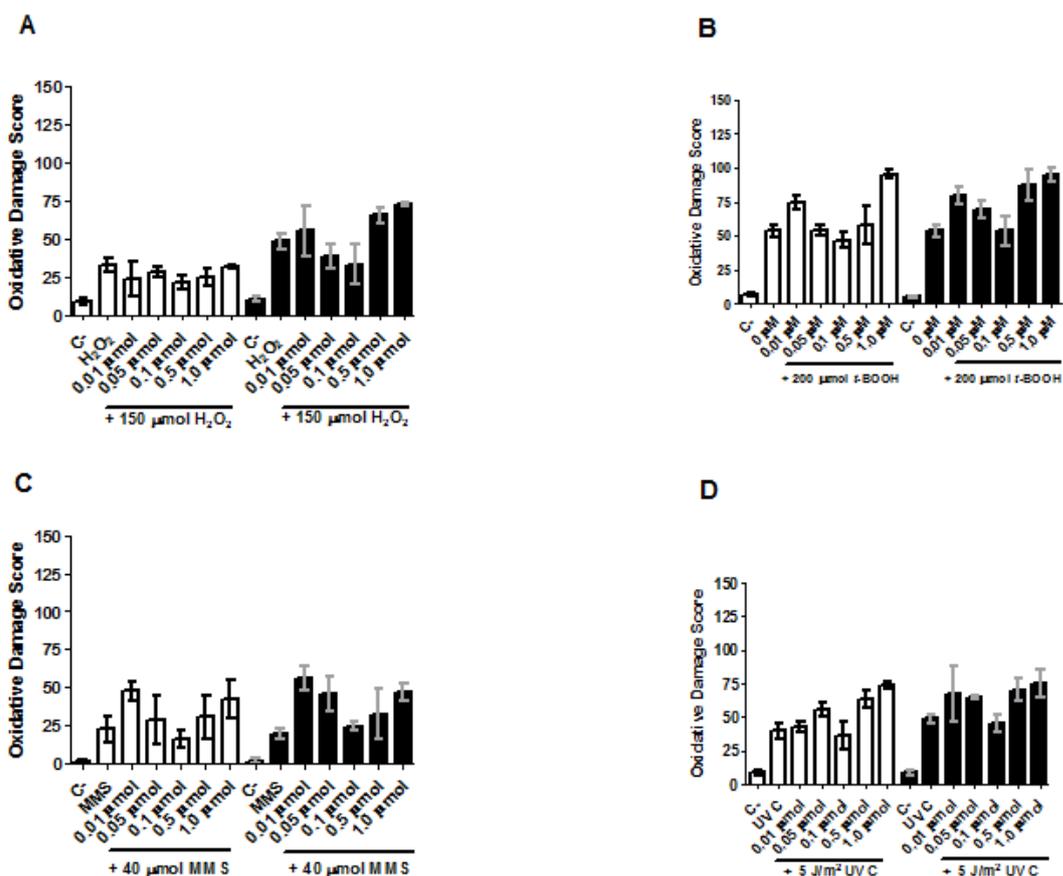
Co-tratamento



DPDT co-treatments were compared to cells only exposed to mutagen. Solvent was used as a negative control. Data are expressed as means \pm SDs, $n = 5$. The symbols * represents $p < 0.05$, and ** represents $p < 0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test).

Anexo 2 – Dados suplementares

Co-tratamento

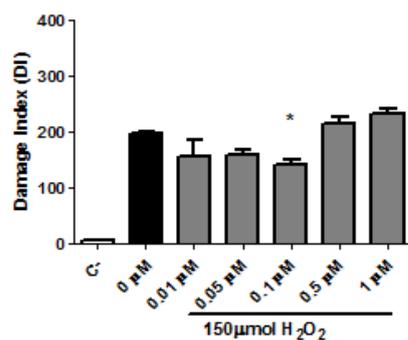


DPDT co-treatments were compared to cells only exposed to mutagen as evaluated by a modified comet assay using FPG (clear bars) and Endo III (black bars) enzymes. The oxidative damage score was calculated as the difference between the score obtained after incubation with the respective enzyme or with the enzyme buffer. Solvent was used as a negative control. Data are expressed as means \pm SDs, $n = 3$. The symbols * represents $p < 0.05$, and ** represents $p < 0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test).

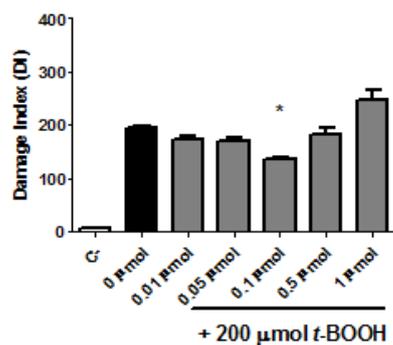
Anexo 3 – Dados suplementares

Pós-tratamento

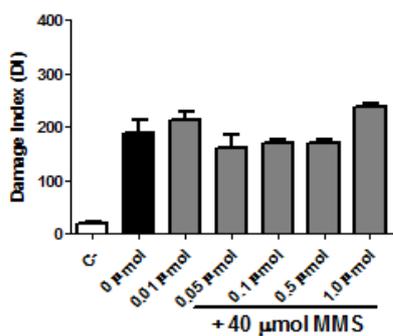
A



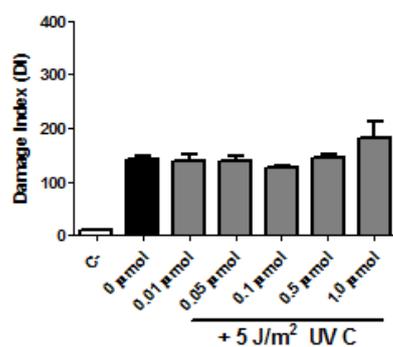
B



C



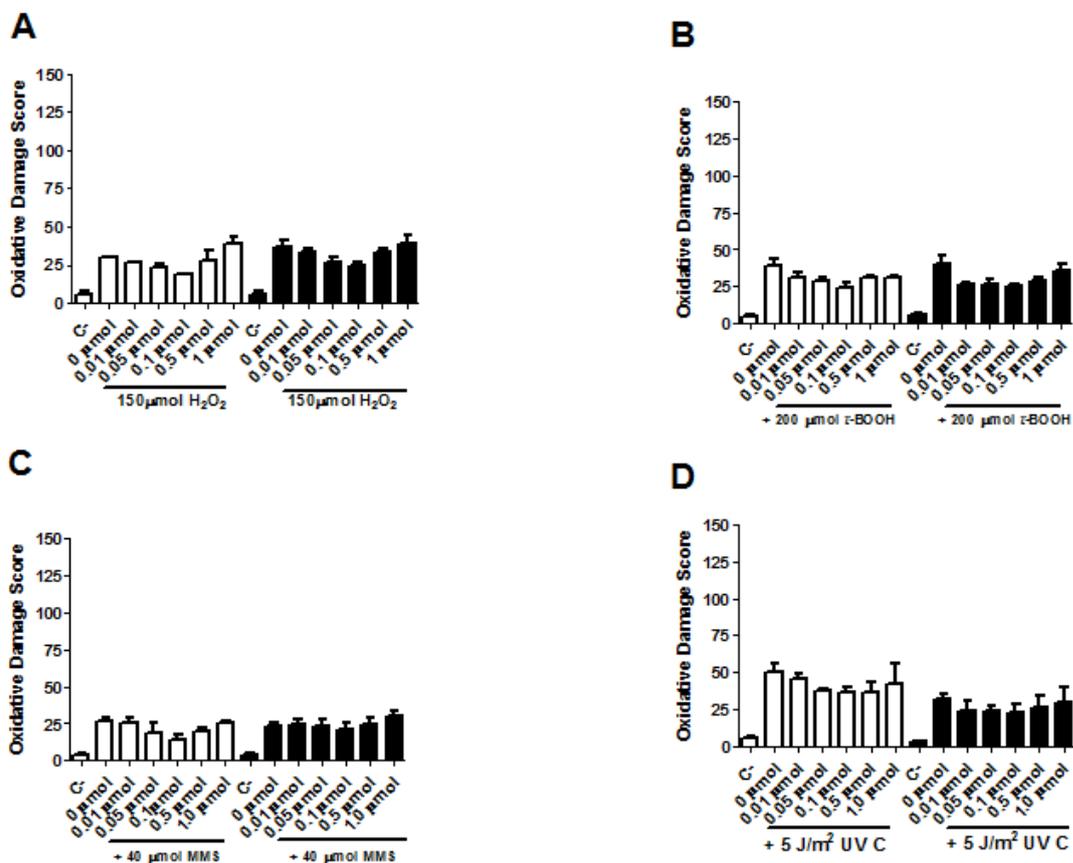
D



DPDT pos-treatments were compared to cells only exposed to mutagen. Solvent was used as a negative control. Data are expressed as means \pm SDs, $n = 5$. The symbols * represents $p < 0.05$, and ** represents $p < 0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test).

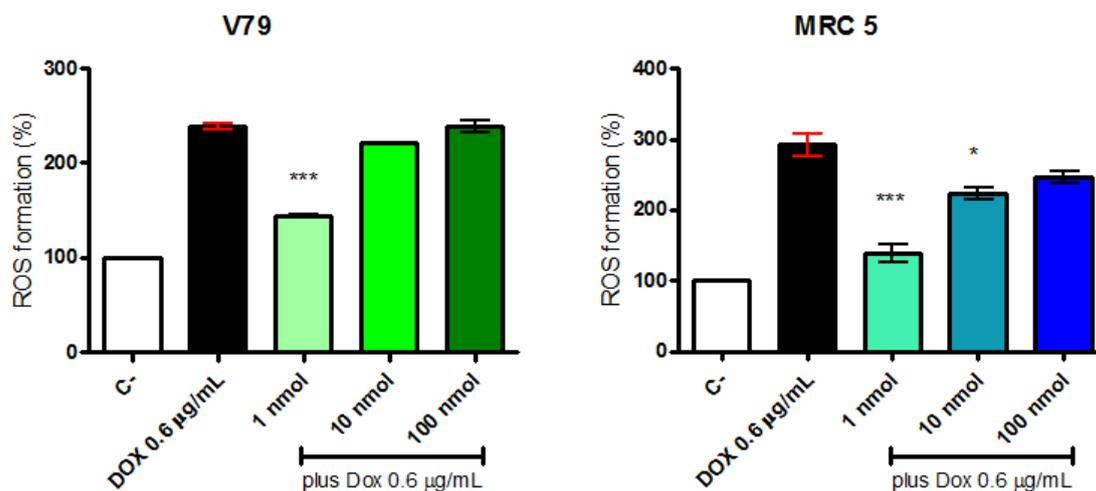
Anexo 4 – Dados suplementares

Pós-tratamento



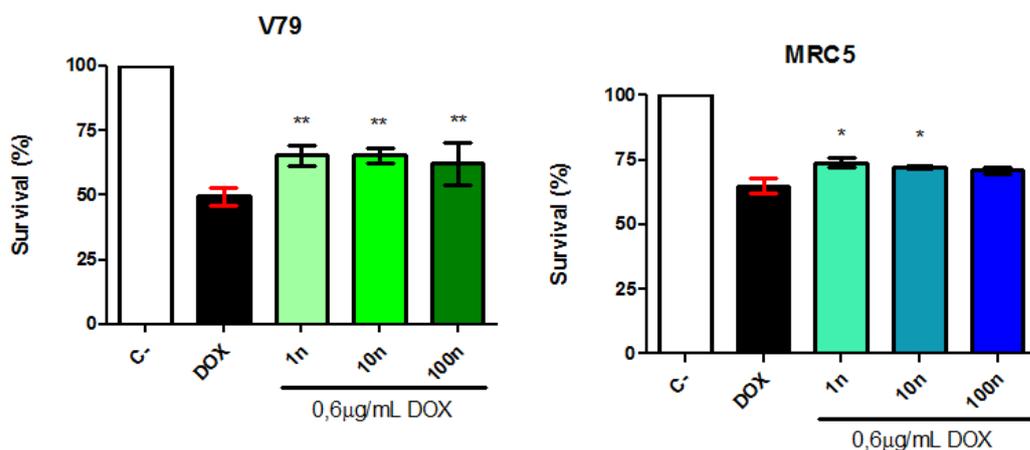
DPDT pos-treatments were compared to cells only exposed to mutagen as evaluated by a modified comet assay using FPG (clear bars) and Endo III (black bars) enzymes. The oxidative damage score was calculated as the difference between the score obtained after incubation with the respective enzyme or with the enzyme buffer. Solvent was used as a negative control. Data are expressed as means \pm SDs, $n = 3$. The symbols * represents $p < 0.05$, and ** represents $p < 0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test).

Anexo 5 – Datos suplementares



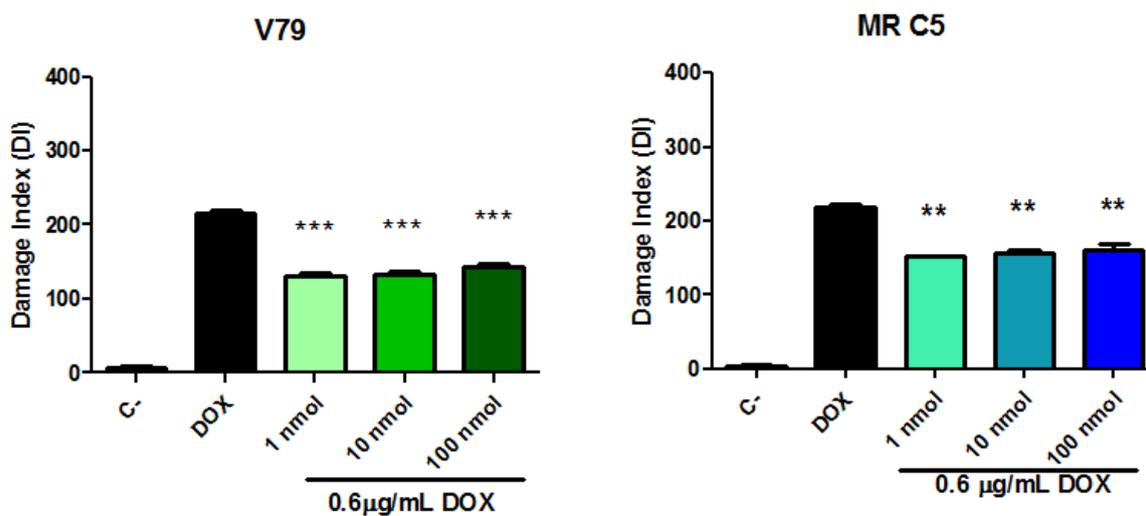
Flow cytometry analysis of ROS generation induced by DPDT at the indicated concentrations for 2 h in V79 or MRC5 cells. Increased ROS production after treatment with DPDT evidenced by the cells shift to the right on the linear x-axis of the representative histograms. Data are expressed as mean \pm SD, n = 5. Significantly different in relation to the negative control or in relation to the treatment at the same DPDT concentration, *P , 0.05, **P, 0.01 and ***P , 0.001 by one-way analysis of variance with Tukey's Multiple Comparison Test.

Anexo 6 – Datos suplementares



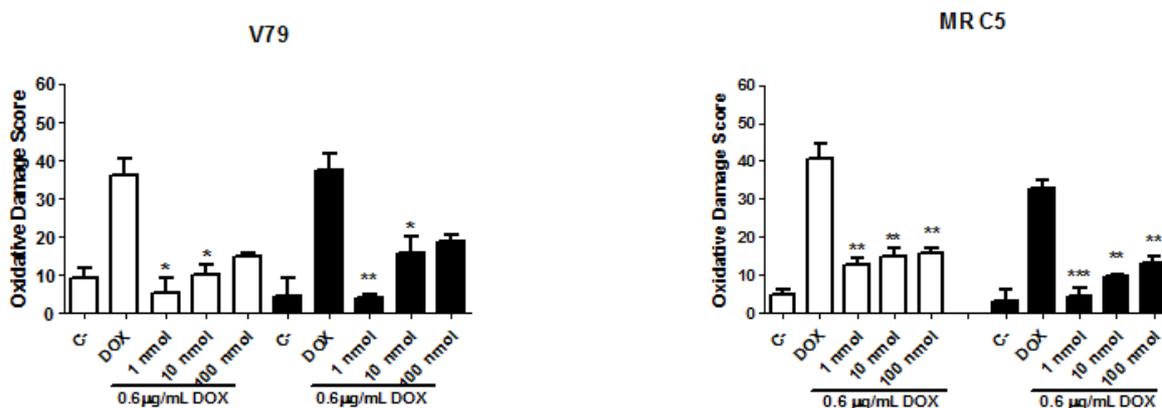
Celular survival of V79 or MRC5 cells pretreated with non-cytotoxic doses of DPDT for 2h in medium without FBS, and challenged with mutagen for 3 at 37°C in the dark by MTT 72h after the treatment. Results are expressed as mean \pm SD, n=4. The symbol * represents $p < 0.05$, and ** represents $p < 0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test): DPDT pretreated cells were compared to cells only exposed to mutagens.

Anexo 7 – Datos suplementares



DPDT pre-treatments were compared to cells only exposed to mutagen. Solvent was used as a negative control. Data are expressed as means \pm SDs, $n = 5$. The symbols * represents $p < 0.05$, and ** represents $p < 0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test).

Anexo 8 – Dados suplementares



DPDT pre-treatments were compared to cells only exposed to mutagen as evaluated by a modified comet assay using FPG (clear bars) and Endo III (black bars) enzymes. The oxidative damage score was calculated as the difference between the score obtained after incubation with the respective enzyme or with the enzyme buffer. Solvent was used as a negative control. Data are expressed as means \pm SDs, $n = 3$. The symbols * represents $p < 0.05$, and ** represents $p < 0.001$, as tested by one way ANOVA (Tukey test).

9 *Currículo vitae - resumido*

Identificação

Nome

Cristiano Trindade

Nome em citações bibliográficas

TRINDADE, C.;Trindade, Cristiano

Sexo

Masculino

Endereço

Endereço Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Departamento de Biofísica.

Bento Gonçalves, 9500

Agronomia

91501-970 - Porto Alegre, RS - Brasil

Telefone: (51) 33087602

Formação acadêmica/titulação

2006 – 2009 Graduação em Biomedicina.

Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.

Formação Complementar

2012 – 2012 "Survival Analysis. Theory and Application". (Carga horária: 12h).

Associação Latino Americana de Genética.

- 2011 – 2011** Extensão universitária em Virologia Molecular: o HIV como modelo de estudo. (Carga horária: 15h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
- 2011 – 2011** Controle da expressão gênica por micro RNA. (Carga horária: 2h).
Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental.
- 2009 – 2009** Extensão universitária em Monitor de Microbiologia Clínica. (Carga horária: 60h).
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.
- 2009 – 2009** Extensão universitária em Monitor de Líquidos Corporais. (Carga horária: 61h).
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.
- 2009 – 2009** Extensão universitária em CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E BIOENGENHARIA TECIDU. (Carga horária: 24h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
- 2009 – 2009** Extensão universitária em Monitor de Microbiologia Clínica. (Carga horária: 60h).
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.
- 2009–2009** Genética Forense. (Carga horária: 4h).
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.
- 2008 – 2008** Extensão universitária em Monitor de Líquidos Corporais. (Carga horária: 52h).
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.
- 2008 – 2008** Controle de Qualidade em Laboratório de Microbiolo. (Carga horária: 3h).
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.
- 2007 – 2007** Percepção de risco em laboratório clínico. (Carga horária: 4h).
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.

Artigo completo publicado em periódico

1. Greggio, Samuel ; de Paula, Simone ; de Oliveira, Iuri M. ; **TRINDADE, C.** ; Rosa, Renato M. ; Henriques, João A.P. ; DaCosta, Jaderson C. . NAP prevents acute cerebral oxidative stress and protects against long-term brain injury and cognitive impairment in a model of neonatal hypoxia ischemia. *Neurobiology of Disease* ^{JCR}, v. 44, p. Pages 152-159, 2011.

