



**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**

**Toxicidade genética do ditelureto de difenila: um estudo  
empregando modelos biológicos procariotos e eucariotos**

**Dissertação de Mestrado**

**Tiago Hoerbe Degrandi**

**Porto Alegre**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**Toxicidade genética do ditelureto de difenila: um estudo empregando  
modelos biológicos procariotos e eucariotos**

**Tiago Hoerbe Degrandi**

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

**Orientador:** Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

**Porto Alegre, maio de 2009**

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) e pelo Laboratório de Genotoxicidade do – GENOTOX - Instituto Royal, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A redação da tese fundamentou-se nas recomendações do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, dessa Universidade.

*"Não existem verdades indiscutíveis  
E não existe a fonte da juventude  
Toda noite quando o dia termina  
Eu não peço muito  
Só quero você"*

*Ozzy Osbourne*

*A meus pais  
À minha família e meus amigos  
À Juliana  
Pessoas especiais que foram meu porto seguro nesta etapa*

## 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 Professor João Antonio Pêgas Henriques, pela oportunidade de aprendizado e confiança depositada em mim durante esse ano e pela amizade. Dispensa comentários como pesquisador, é um imortal, mas é também uma grande pessoa e sempre disposto a ajudar e dar condições para que possamos alcançar os objetivos do projeto

Ao Departamento de Biofísica, um ambiente de trabalho muito divertido, onde tudo é possível acontecer, até as coisas mais inacreditáveis.

Ao Elmo e a Ellen, exemplos de competência e dedicação. Os dois sempre estiveram prontos e dispostos a ajudar sempre que surgiram dificuldades durante todo o mestrado. Não eram macacos gordos, mas quebram todos os galhos.

Gostaria de agradecer aos parceiros que contribuíram diretamente para este trabalho. Agradeço ao Iuri, que sempre foi muito mais que colega, é um grande amigo para todas as horas: boas e ruins. É muito bom saber que sempre posso contar com ele, porque para ele nunca há tempo ruim. Com seu jeito calmo e sereno, ele sempre tem um conselho valioso muito racional e inteligente para todas as situações. O Iuri é uma referência de competência e de profissionalismo para mim, que um dia gostaria de alcançar.

Ao Renato, que me proveu de lições inestimáveis, que transformaram minha visão do mundo para sempre. Nunca vou esquecer os seus comentários perspicazes e de como ele tornou minha compreensão das coisas mais fácil e tranqüila. Já era seu amigo antes de trabalhar com ele, mas depois de conviver é que aprendi o valor dessa amizade.

Aos alunos de iniciação científica, Cícero e Gabriel, considerados irmãos e por isso muito referidos como “Cicerel”, por sua dedicação, empenho e competência, contribuíram muito nas atividades. Foi um desafio e um prazer conviver com eles.

À Elaine, a Lalá, que sempre nos alegrou com sua presença e suas histórias animadas e encantou com sua linda imagem. Ao Eduardo, o Fada das muitas coisas, que era uma figura sempre presente que contribuía para o clima de alegria infinita como se fosse vinculado ao laboratório (lavando a louça e atendendo ao telefone, ao ponto que até de o Professor Henriques achar que ele era aluno do laboratório). Foi muito bom trabalhar

com todos vocês. Laboratórios são naturalmente ambientes estressantes e estafantes, porém com este time o trabalho se tornava uma atividade alegre e satisfatória.

À Nucha pela fundamental contribuição na redação do manuscrito, elevando muito a qualidade do mesmo.

Ao Gustavo Reolon que é um irmão para mim. Quando tudo deu errado, por desespero e falta de alternativas tinha desistido de tudo, ele foi o amigo que não desistiu de mim. Sua ajuda que me permitiu ir até o fim.

À Professora Katia Valença, amiga e professora, que nos cordialmente empresta seu laboratório e diariamente nos saudava com sua alegre presença.

À Professora Ana Ligia, à professora Angélica, ao professor Eduardo Diaz, o professor Homero, à dona Helena, à Jussara e a todo excelente time de profissionais que tive o prazer de conviver no departamento de Biofísica.

Aos meus pais, que mesmo com meus erros e minhas mancadas nunca desistiram de me apoiar e incentivar na direção dos princípios e da dignidade. E que sofreram comigo em todos os obstáculos e comemoraram em todas as conquistas.

À Juliana, uma pessoa especial e rara que entrou em minha vida. Uma pessoa mais do que especial, ela foi meu alicerce de carinho e envolvimento nesse período decisivo em minha vida. Palavras não são suficientes para traduzir a importância dela e o que representa para mim.

## SUMÁRIO

Índice de Figuras .....	1
Índice de Tabelas .....	3
Lista de siglas e abreviaturas .....	4
Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução .....	8
1. Telúrio .....	8
2. Farmacologia dos compostos orgânicos contendo telúrio .....	11
3. Toxicologia dos compostos orgânicos contendo telúrio .....	16
4. Toxicidade genética dos compostos orgânicos contendo telúrio .....	17
5. O ditelureto de difenila, objeto desse estudo .....	19
6. Estratégias para estudo dos compostos organotelurados empregadas nesse estudo .....	22
6.1. Teste <i>Salmonella</i> /microsoma .....	22
6.2. A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo .....	25
6.3. Ensaio com células de mamíferos .....	28
6.3.1. Células V79 .....	28
6.3.2. Teste de micronúcleos .....	30
7.1.3. Ensaio cometa .....	32
Objetivos .....	37
Objetivo geral .....	37
Objetivos específicos .....	37
Capítulo I - Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models .....	39
Discussão .....	84

Conclusão .....	94
Conclusão geral .....	94
Conclusões específicas .....	94
Perspectivas .....	97
Referências bibliográficas .....	100

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1: <i>Tellus</i> (Deusa da Terra) .....	8
Figura 2: Estrutura química do ditelureto de difenila .....	19
Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura mostrando a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
Figura 4: A) foto do hamster chinês B) foto mostrando células V79 em cultura C) foto mostrando uma célula de V79 isoladamente .....	28
Figura 5: foto mostrando micronúcleo em V79 .....	30
Figura 6: Esquema mostrando o processo de formação do micronúcleo .....	31
Figura 7: Diferentes classes de danos (0-4) de células obtidas pelo Ensaio de Cometa ....	34

### CAPÍTULO I

Figura 1: Chemical structure of diphenyl ditelluride (DPDT) .....	76
Figura 2: Survival of <i>S. cerevisiae</i> repair deficient strains after treatment with different doses of DPDT .....	77
Figura 3: Determination of TBARS and GSH/GSSG ratio in <i>S. cerevisiae</i> XV185-14c strain treated with DPDT at the indicated concentrations for 2 h .....	78
Figura 4: Determination of TBARS (Panel A) and GSH/GSSG ratio (Panel B) in V79 cells treated with DPDT at the indicated concentrations for 2 h .....	79
Figura 5: Effect of pre-treatment with N-ac (N-acetylcysteine) on DPDT-induced DNA damage in V79 cells evaluated by comet assay or by modified comet assay using Fpg and Endo III enzymes .....	80
Figura 6: Oxidative damage induced by 2 h DPDT treatment in V79 cells with metabolic	

activation ..... 81

Figura 7: Mutagenic effects of DPDT in V79 cells. V79 cells were exposed to DPDS for 2 h and the MN frequency is expressed per 2,000 binucleated cells (BNC) ..... 82

## **DISCUSSÃO**

Figura 8: Modelo esquemático representando o mecanismo de ação do DTDF ..... 92

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1- Linhagens utilizadas no Teste de Ames .....	24
Tabela 2- Ensaio Cometa: Efeito do pH na avaliação do dano no DNA .....	33

### CAPÍTULO I

Table 1: Yeast strains used in this study .....	67
Table 2. Induction of <i>his+</i> revertants in <i>S. typhimurium</i> strains by DPDT with and without metabolic activation (S9 mix) .....	68
Table 3. Induction of point mutation ( <i>his1-7</i> ) ochre allele ( <i>lys1-1</i> ) and frameshift ( <i>hom3-10</i> ) mutation in haploid XV185-14c strain of <i>S. cerevisiae</i> after DPDT treatment during stationary phase without and with N-ac pre-treatment .....	69
Table 4. Effects of DPDT on LDH leakage (% of total) in V79 cells .....	70
Table 5. Genotoxicity induced by 2 h DPDT treatment in V79 cells evaluated by neutral and alkaline comet assay without and with metabolic activation .....	71
Table 6. Effect of DPDT treatment on the cell proliferation measured as percentage of binucleated cells in micronucleus assay .....	72

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP	apurínico/apirimidínico
ATP	trifosfato de adenosina
BER	reparo por excisão de bases
CAT	catalase
CP	ciclofosfamida
DNA	ácido desoxirribonucléico
DSB	quebras duplas
DSS	quebras simples
DTDF	ditelureto de difenila
Endo III	endonuclease III
EROs	espécies reativas de oxigênio
Fapy	formamidopirimidinas
Fpg	formamidopirimidina DNA-glicosilase
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
HR	recombinação homóloga
MDA	malondialdeído
MMS	metil metano sulfonato
N-ac	N-acetilcisteína
NER	reparo por excisão de nucleotídeos
NHEJ	recombinação não homóloga
NMDA	N- metil D –aspartato
OT	organotelurado
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
SOD	superóxido dismutase
Te	telúrio
TLS	síntese translesão
4-HNE	t-4-hidroxi-2-nonenal
δ-ALA-D	enzima δ-aminolevulinato-desidratase

## RESUMO

O ditelureto de difenila (DTDF) é um composto organotelurado simples e estável e é um potencial candidato de protótipos para o desenvolvimento de novas moléculas biologicamente ativas. Então, é importante avaliar os efeitos tóxicos desse composto. No presente estudo, foi avaliada as propriedades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas do DTDF em vários modelos biológicos: em células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês, em linhagens da levedura *S. cerevisiae* proficientes e deficientes em algumas vias de reparação de DNA e na bactéria *Salmonella typhimurium*. O DTDF pode induzir alteração no quadro de leitura em *S. typhimurium* e em linhagem selvagem haplóide de *S. cerevisiae*. Assim, o DTDF apresenta um comportamento similar a um agente intercalante. Os mutantes de *S. cerevisiae* defectivos na reparação por excisão de bases e na reparação recombinacional mostraram elevada sensibilidade ao DTDF. Em células V79 tratadas com concentrações crescentes de DTDF, a atividade citotóxica, foi determinada usando ensaio de lactato desidrogenase no meio extracelular, ocorre na concentração de 1  $\mu$ M após 2 h de exposição. Consistentemente, o tratamento das células por 2 h com concentrações de DTDF citotóxicas aumentaram os níveis de TBARS 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 glutatona intracelular, caracterizando um estado de estresse oxidativo. 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 DTDF induziu a 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. O tratamento também induziu aumento no número de células binucleadas no teste micronúcleo em células V79, demonstrando potencial mutagênico dessa molécula em altas concentrações. Finalmente, o pré-tratamento com N-acetilcisteína, que restaura o GSH ao nível normal, reduziu os efeitos oxidativos, genotóxicos e mutagênicos do DTDF em levedura e em células V79. Em resumo, os efeitos celulares do DTDF parecem ser muito complexos e ligados a sua habilidade induzir distúrbios na homeostase redox celular e na capacidade de intercalar no DNA, que conduzem a dano e a quebras do DNA, danos e morte celular.

## ABSTRACT

Diphenyl ditelluride (DPDT) is a simple and stable organotellurium compound and it is a potential candidate to prototype for a development of novel biological active molecules. Thus, it is important to evaluate the toxic effects of this compound. In the present study, we evaluated the putative cytotoxic, genotoxic, and mutagenic properties of DPDT in various biological models: in V79 Chinese lung fibroblast cells, in strains of the yeast *S.cerevisiae* proficient and deficient in several DNA repair pathways and in *Salmonella typhimurium*. DPDT is able to induce frameshift mutations in *S.typhimurium* and in haploid wild type strain of *S.cerevisiae*. Thus, DPDT presents a behavior similar that of an intercalating agent. Mutants of *S.cerevisiae* defective in base excision repair and in recombinational repair showed high sensitivity to DPDT. In V79 cells treated with increasing concentrations of DPDT, the cytotoxic activity, as determined using lactate dehydrogenase leakage assay, occurs in doses up to 1  $\mu$ M after 2 h of exposure. Accordingly, the treatment of cells for 2 h with cytotoxic doses of DPDT increased TBARS levels and decreased GSH/GSSH ratio in yeast and in V79 cells, indicating that DPDT can lead to increase lipid peroxidation and intracellular glutathione oxidation, characterizing an oxidative stress status. At the higher doses, DPDT generates DNA single and double strand breaks in V79 cells, as observed using the comet assay, at both the alkaline and the neutral versions without and with metabolic activation. DPDT induced pronounced oxidative DNA damage, determined using modified Comet assay with the enzymes formamidopyrimidine DNA-glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III) without and with metabolic activation. The treatment also induced an increase in the number of binucleated cells in the micronucleus test in V79 cells, showing mutagenic risk by this molecule at high concentrations. Finally, pre-incubation with N-acetylcysteine, which restored GSH to normal levels, reduce DPDT oxidant, genotoxic and mutagenic effects in yeast and V79 cells. In summary, the cellular effects of DPDT appear to be very complex and linked to its ability to impose disturbs in redox cellular homeostasis and in the ability to intercalate into DNA, which lead to DNA damage and breakage, cellular injury and cell death.



## **Introdução**

## Introdução

### 1 – Telúrio



Figura 2: *Tellus* (Deusa da Terra)

O telúrio é um semi-metal pertencente ao grupo 16 da tabela periódica, os calcogênios, assim como o enxofre e o selênio. Pouco abundante na natureza, foi descoberto como telureto de ouro (calaverita); na Romênia em 1782; por Frauz Joseph Müller Von Reichstein (Petraghani, 1995). Posteriormente, em 1798, foi isolado por Klaproth, quem lhe deu o nome, em homenagem à deusa da Terra (*Tellus* = terra) (Fig. 1) (para revisão ver Chasteen *et al.*, 2009).

Na natureza, pode apresentar-se em diferentes estados de oxidação:  $\text{Te}^{+6}$  (telurato),  $\text{Te}^{+4}$  (telurito),  $\text{Te}^0$  (telúrio elementar) e  $\text{Te}^{-2}$  (telureto) (Scansetti, 1992). É encontrado em muitos minérios, estando em maior frequência na forma de teluretos de ouro, bismuto, chumbo e prata (Zeni *et al.*, 2003).

O telúrio elementar ( $\text{Te}^0$ ) é usado como componente de muitas ligas metálicas, sendo adicionado ao chumbo para aumentar a sua resistência mecânica, durabilidade e diminuir a ação corrosiva do ácido sulfúrico nos processos industriais (Petraghani, 1995; Taylor, 1996). Quando adicionado ao aço inoxidável e ao cobre os torna mais facilmente manipuláveis (Taylor, 1996).

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 utilizados na produção de explosivos, na vulcanização da borracha, em lubrificantes sólidos, soluções oxidantes para polir metais e na indústria petroquímica (Fairhill, 1969; Taylor 1996). Também o telúrio tem ação bactericida, fungicida e inseticida (Kormutakova *et al.*, 2000; Toptchieva *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2009).

Esse semi-metal recentemente 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 (Schiari *et al.*, 2008; Friedman *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.*, 2008a), 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).

O telúrio pode ser prontamente absorvido pelo organismo, através da dieta, principalmente na forma de compostos orgânicos. Entretanto, a exposição e a absorção de telúrio inorgânico na forma de teluritos e teluratos também ocorre (Larner, 1995; Morgan *et al.*, 1997; Ogra *et al.*, 2008b).

É conhecido que o telúrio e seus compostos são altamente tóxicos em ratos e humanos (Roman *et al.*, 2007; Schiari *et al.*, 2008). Embora as transformações bioquímicas, 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, com o aumento no uso industrial do telúrio, tanto das suas formas orgânicas quanto inorgânicas, trouxe riscos ocupacionais e ambientais para a saúde humana (Meotti *et al.*, 2003; Borges *et al.*, 2007).

Os efeitos do telúrio sobre o organismo animal começaram a ser estudados por Gmelin em 1824. Entretanto, os primeiros relatos a respeito da toxicidade do telúrio aconteceram somente após o incidente em 10 de outubro de 1957, quando um reator na cidade de Windscale, atual Sellafield, na Inglaterra, pegou fogo e liberou grande quantidade de material radioativo, incluindo telúrio 132 (Wakeford, 2007; Bergan *et al.*, 2008). Casos de intoxicação ocupacional aguda por telúrio são raros; entretanto, quando

ocorrem, os sintomas são: dores de cabeça, sonolência, náuseas, alteração da frequência cardíaca, bem como odor característico de alho, na respiração e na urina (Blackadder & Manderson, 1975; Yarema & Curry, 2005).

Os compostos de telúrio são capazes de atravessar as barreiras hematoencefálicas, placentárias e a ependimal-fluido cérebro espinhal-sangue fetal (Deuticke *et al.*, 1992). Portanto, são muito tóxicos para mamíferos em desenvolvimento, podendo causar principalmente hidrocefalia em fetos de ratos (Stangherlin *et al.*, 2005), bem como afetar a pele e outros órgãos, como os rins (Kron *et al.*, 1991; Meotti *et al.*, 2003; Borges *et al.*, 2008).

Os compostos contendo esse semi-metal são potentes agentes neurotóxicos por inibirem a atividade da enzima esqualeno monooxigenase, uma enzima microsomal contendo flavina-adenina-dinucleotídeo que catalisa o segundo passo na biossíntese do colesterol, a conversão do esqualeno a 2,3-epoxiesqualeno (Goodrum, 1998; Laden & Porter, 2000; 2001). A sensibilidade da enzima deve-se à reação desse elemento com grupamentos sulfidríla e com ligação à cisteína presente na estrutura da proteína (Laden & Porter, 2001). Dessa forma, o esqualeno acaba acumulando-se e a síntese do colesterol, que é um precursor da mielina, é inibida nas células de Schwann. A consequência desse processo é uma desmielinização ou hipomielinização (Goodrum, 1998; Gajkowska *et al.*, 1999). Um efeito secundário é a inibição da expressão de genes que codificam as proteínas envolvidas na síntese da bainha de mielina (Toews *et al.*, 1997).

A suscetibilidade preferencial do sistema nervoso periférico à toxicidade do telúrio deve-se provavelmente à grande demanda de colesterol pelos nervos periféricos, e uma menor taxa de acúmulo de colesterol no cérebro (Kaur *et al.*, 2003). Além disso, compostos organotelurados são capazes de reduzir a neurotransmissão glutamatérgica (Nogueira *et al.*, 2001; Avila *et al.*, 2008) e inibir a enzima  $\delta$ -aminolevulinato-desidratase ( $\delta$ -ALA-D) em diversos tecidos humanos (Maciel *et al.*, 2000; Meotti *et al.*, 2003; Borges *et al.*, 2008).

Os compostos de telúrio atravessam as membranas celulares e se localizam no citoplasma das células, mais especificamente nas mitocôndrias, nos primeiros estágios de intoxicação (Mizuno, 1969; Siliprandi & Storey, 1973). A ingestão de determinadas quantidades de telúrio por mamíferos adultos e pássaros faz com que apareçam grânulos negros ou cristais em forma de agulha no citoplasma das células do sistema urogenital, do

trato gastrointestinal, dos órgãos respiratórios, do sistema retículo endotelial e do sistema nervoso (Morgan *et al.*, 1997). O metabolismo do telúrio nos tecidos não está esclarecido, mas é sugerido que os depósitos negros ou os cristais puntiformes contêm telúrio reduzido ou telúrio elementar (Duckett, 1972).

Apesar da toxicidade do elemento, esse metalóide foi amplamente utilizado terapêuticamente em drogas que atuam no sistema imunológico, no tratamento da sífilis e da tuberculose (Kovalev, 1969). Os compostos orgânicos contendo telúrio apresentam propriedades imunomoduladoras, antiinflamatórias, podendo ainda ser empregados como drogas antitumorais e antivirais (Frei *et al.*, 2008; Sredni-Kenigsbuch *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2009). Estudos recentes têm demonstrado que compostos organotelurados podem apresentar atividade antioxidante por mimetizar a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) (Ren *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008) e ação antiproliferativa em diferentes tecidos (Sailer *et al.*, 2003; Kalechman *et al.*, 2004; Sailer *et al.*, 2004). Conseqüentemente, o emprego farmacológico desses agentes cresceu muito nos últimos anos.

O primeiro composto orgânico de telúrio foi sintetizado por Friedrich Wöhler em 1840. 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 fármaco e tóxicológicas (Nogueira *et al.*, 2004; Rezanka & Sigler, 2008).

## **2- Farmacologia dos compostos orgânicos contendo telúrio**

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. Em verdade, é sempre 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. Os compostos orgânicos contendo telúrio são antioxidantes efetivos e com propriedades quimiopreventivas mais interessantes que seus análogos sulfurados ou

selenados. Por exemplo, o aminoácido modificado telúrio-fenil-L-telurocisteína é bioativado em seu telurol correspondente pela enzima cisteína beta liase intracelular e aminoácido oxidase, da mesma forma que ocorre com a selênio-fenil-L-selenocisteína. Essa molécula orgânica contendo telúrio é capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio e algumas isoenzimas do sistema citocromo P-450 responsáveis pela ativação de pró-carcinógenos (Roosebom *et al.*, 2002).

Em 1988, o telureto de tricloro [dioxoetileno-O,O'-] amônio, conhecido pela sigla AS-101- foi a primeira molécula estudada com essa natureza, demonstrando atividade imunomoduladora por aumento dos níveis de expressão do receptor de interleucina-2 em linfócitos murinos e humanos em cultura, além de proporcionar a elevação da produção de fator estimulador de colônias por esplenócitos de camundongos *in vitro*. Em nível sistêmico, esse composto apresentou propriedades antitumorais em camundongos (Sredni *et al.*, 1988). A partir dos resultados obtidos nesses modelos experimentais, Alcocer-Varela *et al.* (1989) realizaram ensaios de modulação do sistema imunológico em leucócitos mononucleares isolados de pacientes normais e pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e verificaram respostas interessantes e promissoras para o uso desse organotelureto em um futuro tratamento para o lúpus e outras patologias auto-imunes (Alcocer-Varela *et al.*, 1989; Blank *et al.*, 1990). Na década de 1990, o AS101 foi estudado em relação à produção de citocinas *in vitro* e *in vivo* em um estudo clínico de fase II com pacientes com AIDS e câncer. Em paralelo, um estudo mostrou ação sinérgica no efeito anticâncer do AS101 em combinação com briostatinas, um grupo de macrolactonas isoladas de invertebrados marinhos, e o mecanismo da ação imunomoduladora da molécula organoteluretada avançou consideravelmente, envolvendo a secreção de interleucina-2, interferon gama e fator de necrose tumoral por células mononucleares (Sredni *et al.*, 1990). Interessantemente, o último trabalho a respeito de efeitos biológicos do AS101 foi publicado em 1993, mostrando que os linfócitos de pacientes portadores de psoríase, quando tratados com a molécula orgânica contendo telúrio, respondiam à radiação UV-B com o aumento da produção de interleucina-2 e elevação da atividade auxiliar de células T CD4 positivas (Shohat *et al.*, 1993). Os ensaios a respeito dos eventos moleculares associados com a ação do AS101, nos últimos anos, permitiram entender alguns mecanismos envolvidos nessa imunomodulação. A substância AS101 reage com tióis biológicos e catalisa a oxidação dessas moléculas. Dessa maneira, esse organotelureto atua

como um inibidor de cisteíno-proteases, causando uma redução significativa na conversão de interleucina 18 e interleucina 1- $\beta$  para suas formas ativas em células mononucleares sanguíneas e em queratinócitos humanos em cultura. Além disso, o AS101 afeta a produção de interleucina-18 em nível pós-traducional e reduz os níveis plasmáticos de IL-18 e IL-1  $\beta$  no modelo animal de sepse induzida por lipossacarídeos e na doença glomerular (Kalechman & Sredni, 1996; Kalechman *et al.*, 2004; Brodsky *et al.*, 2007).

Okun *et al.* (2007) estudaram o AS101 e afirmaram que esse organotelureto possuía atividades pleiotrópicas, em uma comparação com o conceito de pleiotropia gênica. De certa maneira, esses pesquisadores estavam certos nesse comentário. AS101 foi capaz de induzir a produção do fator neurotrófico glial de crescimento celular e recuperar culturas de células neuronais PC-12 em apoptose. Em modelos de isquemia focal em camundongos, o tratamento com essa molécula, tanto em esquema pré- como pós-isquemia, por via intraperitoneal, reduziu dano cerebral, diminuindo a área da região infartada e o edema, melhorando assim as funções cerebrais dos animais. Em estudos com células neurais em cultura submetidas ao modelo de isquemia por privação de glicose, o tratamento com AS101 preveniu a peroxidação lipídica e os eventos apoptóticos, assim como reduziu a internalização de cálcio induzida por glutamato, características de uma ótima molécula neuroprotetora (Okun *et al.*, 2007). Recentemente mostrou-se que AS101 e outros dois compostos orgânicos contendo telúrio, nomeados RF-07 e RF-03, possuem atividade antiepiléptica, em parte, pela capacidade de inibição da catálise mediada por caspases (Persike *et al.*, 2008). Por fim, AS101 é capaz de reduzir a apoptose induzida por homocisteína em células em cultura e causar uma diminuição nos níveis plasmáticos de homocisteína em modelos murinos de hiperhomocisteinemia, além de possuir eficácia em alguns tipos de alopecia (Sredni *et al.*, 2004; Okun *et al.*, 2007b).

O interesse nos estudos de estresse oxidativo e a busca de moléculas com atividade antioxidante 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. Um dos mecanismos propostos é a redução do telúrio IV para o estado divalente nas

condições experimentais. No entanto, utilizando uma metodologia que avalia a oxidação do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil-2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazil (DPPH), os organoteluretos estudados foram menos potentes que a vitamina E, com exceção do telureto de bis(4-aminofenil) (Engman *et al.*, 1995).

A potência dos efeitos antioxidativos dos diteluretos de diarila também foi estudada em sistemas celulares *in vitro* em níveis crescentes de complexidade. Em 1998, Wieslander *et al.* (1998) mostraram que, em presença de glutathiona reduzida (GSH), o telureto de bis(4-hidroxifenil), telureto de bis(4-aminofenil) e o telureto de bis(2-carboxifenil) reduziram o efeito citotóxico do hidróperóxido de *tert*-butil em células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (células V79) em mais de 50% em tratamentos utilizando concentrações inferiores a 2 µM. O telureto de bis(2,6-dimetil-4-hidroxifenil) reduziu os danos causados por acetato de ésteres de forbol em células Caco-2 em cultura utilizando concentrações inferiores a 0,1 µM. Além disso, essas moléculas reduziram a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e protegeram o tecido renal contra o dano oxidativo induzido por reoxigenação após anoxia, indicando um potencial antioxidante interessante, envolvendo no seus efeitos citoprotetivos. Esses efeitos também foram observados em experimentos com administração sistêmica desses compostos em ratos submetidos ao modelo de isquemia e reperfusão. O mecanismo sugerido poderia estar ligado, ao menos em parte, a uma atividade mimética de GPx (Wieslander *et al.*, 1998). Neste contexto, há um grande interesse na produção de compostos organotelurados com propriedades de mimetizar esta importante enzima antioxidante visando uma potencial aplicação farmacológica (Ren *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2004; Back *et al.*, 2005).

Desde então, a busca por compostos orgânicos contendo telúrio com ação antioxidante recebeu grande atenção. Assim sendo, diversas moléculas foram sintetizadas e testadas em diversos modelos *in vitro*, tais como a oxidação da dihidrorodamina 123 induzida por peroxinitrito, hidroxila do benzoato, nitração de acetato de 4-hidroxifenil e peroxidação de metalotioneína por hidróperóxido de *tert*-butil. Nessas triagens, o derivado 3-[4-(*N,N*-dimetilamino)benzenotelurenil] do ácido propanosulfônico, mostrou uma elevada reatividade, o que permitiu sugerí-lo como antioxidante de interesse e como protótipo para drogas liberadoras de zinco mais eficiente que diversos compostos organoselenados (Jacob *et al.*, 2000). Essa molécula também é capaz de prevenir os efeitos do peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila em sistemas *in vitro*, além de proteger

completamente contra os efeitos lesivos de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio em hemácias, sinaptossomas de rato e em cultura de células hipocâmpais, o que permitiu imaginar uma possível aplicação dessa molécula no tratamento das doenças neurodegenerativas cuja patogênese envolva o estresse oxidativo (Kanski *et al.*, 2001). Além disso, análogos de 2,3-dihidrobenzo[b]furan-5-ol contendo telúrio, o composto dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato, o 1-butiltelurenil-2-metilhepteno, o telureto de hidroxifenila, telureto de fenilamina, telureto de N,N-dimetila também possuem ação antioxidante (Tiano *et al.*, 2000; Malmstrom *et al.*, 2001; de Ávila *et al.*, 2006; Savegnago *et al.*, 2006). Recentemente, a ação antioxidante do dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato explicou seus efeitos neuroprotetores contra agentes indutores de excitotoxicidade glutamatérgica em roedores (Ávila *et al.*, 2008)

No contexto da terapia anticâncer, compostos orgânicos contendo telúrio, capazes de ser seletivamente incorporados em células tumorais e de inibirem o sistema tioredoxina redutase foram desenvolvidos. Diversos esteróides, lipídios, aminoácidos, bases nitrogenadas e inibidores de poliaminas contendo telúrio foram capazes de reduzir o crescimento tumoral de células em cultura em concentrações na ordem de micromolar (Sun *et al.*, 1996; Engman *et al.*, 2003).

O ditelureto de difenila (DTDF), assim como o ditelureto de 3,3'-diaminodifenila e o ditelureto de 4,4'-diisopropildifenila induzem morte celular por apoptose em células de leucemia promielocítica humana (linhagem HL-60) em cultura em concentrações da ordem de 1  $\mu\text{mol/L}$  (Sailer *et al.*, 2003). Resultados semelhantes foram encontrados na avaliação do efeito citotóxico do ditelureto de 2,2'-dimetoxidifenila e ditelureto de 2,2'-diamino-3,3',5,5'-tetrametildifenila nessa mesma linhagem celular (Sailer *et al.*, 2004). Alguns compostos orgânicos contendo telúrio são eficientes inibidores seletivos da atividade cisteíno-proteásica da catepsina B, o que os torna candidatos para drogas com atividade antimetastática (Cunha *et al.*, 2005). Os estudos utilizando HL-60 como modelo experimental também mostraram que outra molécula contendo telúrio, conhecida como RT-04, o qual também inibe a ação da catepsina B, é capaz de induzir apoptose nessa linhagem celular por meio do aumento da atividade das caspases 3, 6 e 9. O mecanismo envolvido nesse fenômeno inclui a redução da expressão de Bcl-2 (Abondanza *et al.*, 2008)

### 3- Toxicologia dos compostos orgânicos contendo telúrio

Embora exista um crescente uso de compostos orgânicos contendo telúrio nos campos da química e bioquímica, não existem muitos relatos sobre a toxicidade dessas substâncias até o momento. No entanto, da mesma forma que na toxicologia dos compostos organoselenados, as moléculas contendo telúrio são menos tóxicas do que os compostos iônicos desse metalóide. Além disso, a toxicidade de compostos organotelurados é inferior à dos análogos organoselenados (Nogueira *et al.*, 2004).

Os compostos orgânicos contendo telúrio com potencial uso farmacodinâmico, como o AS101, o dietil-ditelurofenil-vinilfosfato e outros teluretos vinílicos foram, inicialmente, avaliados em relação à sua toxicidade sistêmica em animais, sendo identificadas as faixas seguras de doses para os testes farmacológicos (Nyska *et al.*, 1989; Ávila *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2008). No entanto, algumas moléculas mostraram-se bastante tóxicas.

O telureto de bis-(tetrafenil-fosfônio)tetracianato-bis-p-metoxi-p-fenila e o telurato de bis-(tetraheptil-amônio) tetraiodociclopentano, quando administrado em dose única por via intraperitoneal em ratos, causaram sintomas colinérgicos, resultantes da redução da atividade da esterase de acetilcolina e monoaminoxidase no soro e cérebro, além de uma redução significativa nos níveis de glutathiona hepática e na atividade da fosfatase alcalina em fígado e rins (Srivastava *et al.*, 1983)

Realmente, muitos efeitos tóxicos dos compostos orgânicos contendo telúrio devem-se à inibição da atividade enzimática. Nesse sentido, o ditelureto de dimetila e o dicloreto de dimetiltelúrio interagem com grupamentos sulfidríla da enzima esqualeno monoxigenase, causando uma inibição da função catalítica e conseqüente desmielinização das células de Schwann (Goodrum 1998, Laden & Porter, 2001). Esse mecanismo explica um quadro patológico conhecido como neuropatia induzida por telúrio.

#### **4- Toxicidade genética dos compostos orgânicos contendo telúrio**

As células estão em constante interação com o meio interno e o meio externo (ambiente), representado pelo fluido intersticial e tecidos adjacentes. As interações químicas entre as diversas substâncias tanto exógenas quanto endógenas e lipídios, proteínas e ácidos nucleicos podem conduzir a alterações da estrutura física dessas biomoléculas. Entre as biomoléculas, somente os ácidos nucleicos não são passíveis de substituição quando danificados, mas podem ser reparados. A fidelidade do processo de reparação de DNA é requisito fundamental para evitar que uma lesão física na estrutura da fita fixe-se no genoma na forma de mutação (Marnett & Plataras, 2001; Wogan *et al.*, 2004).

Uma lesão a um ácido nucleico, denominada lesão genotóxica, corresponde a uma alteração na estrutura química e/ou física da dupla hélice, perturbando as funções que necessitam da integridade conformacional do polímero, tais como a replicação e transcrição. Essas lesões são variadas e incluem quebras simples, quebras duplas, ligações cruzadas entre as fitas de DNA de moléculas diferentes, ligações cruzadas entre DNA e proteínas e DNA e lipídios, distorções na hélice, formação de dímeros, pontes intercadeias, alquilações das bases, perda de bases, desaminações, depurinações (comum nas altas temperaturas que ocorrem durante a inflamação sistêmica) e oxidações das bases, entre outras (Luch, 2005; Marnett & Plataras, 2001; Pages & Fuchs, 2002; Houtgraaf *et al.*, 2006; Roos & Kaina, 2006).

Imediatamente após o estresse genotóxico, as vias de sinalização que percebem o dano reduzem a velocidade de progressão do ciclo celular, com o intuito de favorecer a reparação do material lesado (Bartek & Lukas 2007; Budzowska M & Kanaar, 2009; de Bruin RA & Wittenberg, 2009). Quando a lesão é muito complexa e/ou muito numerosa, as vias de indução de morte celular programada eliminam a célula danificada da população (Roos & Kaina, 2006; Clarke & Allan, 2009; Wee *et al.*, 2009). No entanto, algumas vezes, um sistema de reparação de DNA permite que a célula tolere o dano – síntese translesão de DNA - e embora não consiga corrigir a lesão eficientemente, garante a sobrevivência celular; desse modo, as lesões removidas de forma ineficiente acabam gerando a restauração imperfeita da seqüência de nucleotídeos original, causando mutação gênica (Jeggo & Lobrich, 2006; Natarajan & Palitti, 2009). Em verdade, quando uma lesão

genotóxica não é reparada antes da divisão celular, tem-se uma situação muito delicada, que freqüentemente acarreta eventos recombinacionais, aberrações cromossômicas e instabilidade genômica como conseqüência da ação das DNA polimerases atuantes na síntese translesão. É importante considerar que os tecidos do organismo possuem diferentes capacidades de reparação das lesões ao DNA bem como graus diferenciados de suscetibilidade a agentes genotóxicos, fato que é uma conseqüência da capacidade de proliferação celular de cada tecido, do conteúdo hídrico e lipídico, da ploidia e do metabolismo (Hanahan & Weinberg 2000; Karpinets & Foy 2005; Bartek & Lukas 2007; Baute & Depicker, 2008; Hanawalt & Spivak, 2008).

Essas mutações gênicas podem atingir alvos críticos, como proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes envolvidos na reparação de DNA ou indução de apoptose, acarretando alterações no ciclo celular, acúmulo de mutações, mutações na estrutura física dos cromossomos - mutação cromossômica - configurando um quadro de extrema instabilidade genômica, o qual desencadeia a transformação celular maligna, o primeiro evento do processo carcinogênico. As estratégias para erradicar as células tumorais são diversas, mas o postulado mais antigo da quimioterapia baseia-se nos mesmos mecanismos que atuaram como geradores do problema. Uma vez que as lesões genotóxicas podem perturbar a manutenção da integridade genômica e causar uma transformação maligna, o uso de drogas (e radiações) que causem lesões extensas ao DNA dessas células, as quais proliferam em maior ritmo que células saudáveis, pode induzir a morte celular programada e bloquear o desenvolvimento tumoral (Hanahan & Weinberg 2000; Karpinets & Foy 2005; Hoang *et al.* 2007; Leonetti & Zupi 2007; Nishiyama *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009).

O aumento do uso de compostos contendo telúrio como catalisadores e reagentes nucleofílicos em síntese orgânica, assim como diversas aplicações industriais e como componentes de formulações pesticidas são fatores responsáveis pelo aumento da exposição de seres humanos a este semi-metal e seus derivados. Além desses fatores, a crescente investigação da bioquímica e farmacologia de moléculas contendo telúrio revela, rapidamente, várias estruturas químicas candidatas a potenciais fármacos ou protótipos para desenvolvimento de fármacos. Dessa forma, o conhecimento da toxicidade, em todos seus aspectos – citotoxicidade, genotoxicidade, toxicidade sistêmica e reprodutiva – torna-se essencial. Surpreendentemente, o único relato de investigação da toxicidade genética de compostos orgânicos contendo telúrio é um trabalho realizado por Guillamet *et al.* (2008)

mostrando que altas concentrações de telureto de hidroxifenila, telureto de fenilamina, telureto de N,N-dimetila induzem quebras ao DNA, avaliadas pelo ensaio cometa em células TK6 em cultivo.

## 5- O ditelureto de difenila, objeto desse estudo

O ditelureto de difenila (DTDF) é um composto organotelurado (Fig. 2), sólido, de peso molecular de 407,2g e altamente hidrofóbico. É um importante intermediário em reações de síntese orgânica, em especial de drogas contendo telúrio (Muñiz *et al.*, 2005). Dessa maneira, essa molécula representa um potencial risco ocupacional para

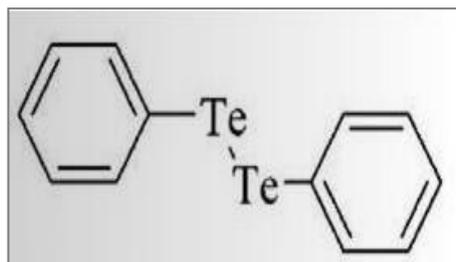


Figura 2: Estrutura química do ditelureto de difenila

trabalhadores da indústria química (Taylor 1996; Meotti *et al.*, 2003). Esse composto tem sido estudado devido às suas propriedades toxicológicas e interessantes atividades farmacológicas, com fins ao desenvolvimento de novos fármacos organotelurados.

Em 1998, Barbosa *et al.* observaram que o DTDF era capaz de inibir a atividade da enzima sulfidrilica  $\delta$ -ALA-D *in vitro* em sobrenadante de fígado com IC<sub>50</sub> de aproximadamente 10 $\mu$ M, 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.*, 2003). 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  $\delta$ -ALA-D, o ácido aminolevulínico, o qual promove uma condição pró-oxidante (Emanuelli *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2009). Embora tenha sido observada a inibição desta enzima *in vitro* em sobrenadante de fígado, 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 *et al.* (2000) demonstraram a inibição da  $\delta$ -ALA-D em fígado, cérebro e rim em camundongos após administração aguda de ditelureto de difenila na dose de 500 $\mu$ mol/Kg, bem como inibição da enzima hepática e cerebral após exposição sub crônica (14 dias) nas doses de 10 e 25 $\mu$ 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 150µmol/Kg. (Meotti *et al.*, 2003). Nogueira *et al.* (2003) observaram a inibição dessa enzima em eritrócitos humanos a partir da concentração de 4µM .

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. Dessa forma, esta molécula orgânica contendo telúrio pode também alterar o sistema glutamatérgico, diminuindo a captação vesicular *in vitro* de [<sup>3</sup>H]glutamato e diminuindo a ligação específica de [<sup>3</sup>H]glutamato ao receptor N- metil D –aspartato (NMDA) em preparação de membranas *in vitro* e *ex vivo* em baixas concentrações (Nogueira *et al.*, 2001; 2002). Isto se deve à presença de grupamentos sulfidrílicos nos transportadores de glutamato de alta especificidade sódio-dependentes, assim como a presença, no receptor NMDA, de um sítio redox dependente da forma reduzida de seus grupos sulfidrílicos para a união específica com o neurotransmissor, ambos facilmente oxidáveis pelos compostos orgânicos de telúrio (Brito, 2007; Guan, 2008). Nesse sentido, Borges *et al.* (2004) demonstraram que o ditelureto de difenila é capaz de reduzir a neurotransmissão glutamatérgica em plaquetas de humanos.

O DTDF também inibe a atividade da enzima Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase em membrana plasmática provenientes de sinapses de córtex cerebral de ratos jovens (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 (Geering, 2008). A inibição da atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase está relacionada com o aumento da liberação de neurotransmissores excitatórios (Vyskocil, 1979). Verificou-se que o DTDF é capaz de inibir esta enzima *in vitro*, em de baixas concentrações, sendo que esta inibição pôde ser revertida pela co-incubação com ditiotreitol (DTT), comprovando o envolvimento da oxidação dos grupamentos tiólicos (Borges *et al.*, 2005). Esse composto mostrou oxidar resíduos tiólicos em eritrócitos humanos e cérebro de ratos (Hassan *et al.*, 2008; Schiar *et al.*, 2009).

A perturbação desses processos bioquímicos mediados por diversas enzimas acarreta várias conseqüências fisiológicas em nível de sistemas e organismos. 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; 2007; Funchal *et al.*, 2006). São relatadas ainda alterações na memória em ratos no modelo de reconhecimento de novos objetos (Stangherlin *et al.*, 2009).

O DTDF também pode provocar desmielinização. Essa neuropatia periférica e suas conseqüências induzidas por compostos orgânicos de telúrio devem-se à inibição de uma outra enzima sulfidrílica importante na biossíntese do colesterol, principal lipídio presente na mielina, a esqualeno monooxigenase. Esta enzima contém grupamentos sulfidrílicos vicinais que são oxidáveis tanto por telúrio elementar quanto por telúrio inorgânico e pelas formas orgânicas de telúrio, dicloreto de dimetiltelúrio, cloreto de trimetiltelúrio e dimetiltelureto (Toews *et al.*, 1997; Goodrum, 1998; Laden & Porter, 2001).

Há 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 (Meotti *et al.*, 2003; Maciel *et al.*, 2000), redução da excreção de creatinina e uréia, que conseqüentemente se tornam aumentadas no plasma (Barbosa *et al.*, 1998; Maciel *et al.*, 2000).

Essa molécula orgânica contendo telúrio 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. A exposição a este composto também causa estresse oxidativo no córtex cerebral, hipocampo e estriado dos filhotes, por meio da inibição da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e  $\delta$ -ALA-D. 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).

Uma característica tóxica bastante descrita para os compostos orgânicos de telúrio é a citotoxicidade. O DTDF é capaz de afetar sistemas de fosforilação e desfosforilação de proteínas celulares, alterando a organização e a estrutura celular (Moretto *et al.*, 2005). Este composto também é capaz de induzir a ativação de caspases em concentração de

apenas 1µM (Iwase *et al.*, 2004). Sailer *et al.* (2004) mostraram em um trabalho comparativo, que outros diteluretos diarílicos são capazes de causar apoptose através de alterações no ciclo celular de células promielocíticas humanas.

Em contraste ao seu aspecto toxicológico, esse composto contendo telúrio é um potencial antioxidante, apresenta atividade mimética de GPx (Ren *et al.*, 2002). Além disso, reduz o nível de peroxidação lipídica em cérebro, rim e fígado de ratos, induzida por vários oxidantes (Rossato *et al.*, 2002; Hassan *et al.*, 2008).

## **6- Estratégias para estudo dos compostos organotelurados empregadas nesse estudo**

### **6.1- Teste *Salmonella*/microsoma**

O teste *Salmonella*/microsoma, desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores na década de 70 é um ensaio bacteriano de curta duração que busca identificar substâncias que causem danos genéticos e possam evoluir a mutações. Este ensaio se baseia na indução de mutações reversas em linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina que conduzem as mesmas à prototrofia (Maron & Ames 1983; Gee *et al.*, 1994; Mortelmans & Zeiger 2000).

Em bactérias, danos no DNA ou inibição na replicação podem desencadear uma série de alterações fenotípicas, denominadas Funções SOS. Esta resposta depende da expressão dos alelos selvagens de *recA* e *lexA* e desencadeia a expressão de pelo menos 27 outros genes, muitos dos quais estão envolvidos em processos de reparação do DNA. Na forma desligada do sistema, a proteína LexA está reprimindo a transcrição dos genes alvo. Quando ocorre um dano no DNA é emitido um sinal indutor que ativa RecA na presença de ATP. Esta forma ativada da protease RecA promove a auto-clivagem do repressor LexA, em uma ponte Ala – Gly, que resulta na desrepressão do regulon, possibilitando a expressão ou superexpressão dos genes alvo controlados pelas funções SOS. Conforme a lesão é reparada, o sistema volta à sua forma desligada (Babynin *et al.*, 2004; Janion, 2008; Butala *et al.*, 2009).

Nas linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no teste *Salmonella*/microsoma, a resposta aos danos ao DNA é potencializada pela presença do plasmídeo pKM101, o qual permite a síntese translesão de DNA, levando, portanto, à mutagênese (Mortelmans, 2006). Estas linhagens ainda contam com outras mutações que também auxiliam a identificação de substâncias que lesam o DNA: mutação no gene *rfa*, que acarreta na perda parcial da barreira de polissacarídeos da parede bacteriana, desta forma aumentando a permeabilidade e facilitando a entrada de moléculas maiores na célula; deleção do gene *uvrB*, responsável pelo sistema de reparação por excisão de nucleotídeos do DNA, o que impede esta via de reparação de atuar nestas linhagens, possibilitando a fixação das mutações (Mortelmans & Zeiger, 2000; Swartz *et al.*, 2007).

Cada linhagem de *S. typhimurium* é mutada de forma diferente no operon da histidina, o que confere maior especificidade na detecção de um determinado tipo de mutágeno, sendo as linhagens TA97a, TA98, TA100, TA1535 e TA102 as mais utilizadas (Tabela 1) (Gatehouse *et al.*, 1994; Mortelmans & Zeiger, 2000). A linhagem TA97a, que apresenta uma mutação no operon do gene *his*<sub>01242</sub>, detecta mutágenos que causam erro no quadro de leitura do DNA. A mutação detectada por esta linhagem resulta da adição de mais uma citosina no gene da histidina, formando uma seqüência de seis citosinas (C-C-C-C-C-C), que altera o quadro de leitura e, conseqüentemente, leva a reversão ao caráter prototrófico (Levin *et al.*, 1982b; Mortelmans & Zeiger, 2000). A linhagem TA98 detecta agentes mutagênicos que causam erro no quadro de leitura do DNA. Apresenta como ponto preferencial de lesão oito resíduos repetitivos GC no operon do gene *his*<sub>d3052</sub>, que codifica a enzima histidinol desidrogenase (Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000). As linhagens TA100 e TA1535 detectam compostos mutagênicos que causam substituição de pares de base do DNA, por meio de uma mutação no gene *his*<sub>G46</sub>, que codifica a primeira enzima da biossíntese de histidina. Têm como ponto preferencial para a reversão o par GC, sendo a mutação uma substituição de uma prolina por uma leucina (Mortelmans & Zeiger, 2000). A linhagem TA1535 difere da sua isogênica TA100 por não possuir o plasmídeo pKM101 (Mortelmans & Zeiger, 2000; Mortelmans, 2006). A linhagem TA102 contém pares de bases AT no sítio mutante da *his*<sub>G428</sub> introduzidos pela inserção do plasmídeo multicópia pAQ1, com objetivo de amplificar o número de sítios alvos. A mutação *his*<sub>G428</sub> pode ser revertida por seis possibilidades de trocas de pares de bases (transversão/transição). Esta mutação também é revertida por agentes que causam danos

oxidativos. Como o gene *uvrB* não foi disrupto, a bactéria é proeficiente no sistema de reparação NER (reparo por excisão de nucleotídeos), aumentando assim a sua habilidade para detectar agentes indutores de pontes entre as cadeias do DNA (interstrand DNA crosslinking), que são reparadas por esta via de reparo (Levin *et al.*, 1982; Mortelmans & Zeiger, 2000).

Tabela 1- Linhagens utilizadas no Teste de Ames

<b>Linhagem</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Tipo da Mutação Detectada</b>	<b>Referência</b>
<b>TA100</b>	<i>bio chlD uvrB gal</i> , rfa, pKM101	Substituição de pares de bases	Mortelmans & Zeiger, 2000
<b>TA1535</b>	<i>bio chlD uvrB gal</i> , rfa	Substituição de pares de bases	Mortelmans & Zeiger, 2000
<b>TA97a</b>	<i>bio chlD uvrB gal</i> , rfa, pKM101	Alteração no quadro de leitura	Levin <i>et al.</i> , 1982b
<b>TA98</b>	<i>bio chlD uvrB gal</i> , rfa, pKM101	Alteração no quadro de leitura	Mortelmans & Zeiger, 2000
<b>TA102</b>	rfa, pKM101, pAQ1	Transição/transversão	Levin <i>et al.</i> , 1982

Em testes com procariotos um componente importante é o sistema de indução microsomal, extraído de células de fígado de ratos pré-tratados com um indutor enzimático com a função de reproduzir o metabolismo de mamíferos, permitindo que também seja avaliada a ação genotóxica dos metabólitos dos agentes testados (Bock *et al.*, 1990; Mortelmans & Zeiger, 2000). Além disso, já existem preparações da fração microsomal hepática humana disponíveis para o uso em testes de mutagênese (Hakura *et al.*, 2005). A combinação de testes com presença e ausência de ativação metabólica e linhagens bacterianas sensíveis a diferentes agentes possibilita determinar tanto substâncias com ação genotóxica direta como monitorar a atividade, positiva ou negativa, dos metabólitos gerados pela biotransformação (Ku *et al.*, 2007).

O teste de Ames é o mais recomendado internacionalmente para avaliação do potencial mutagênico de substâncias provenientes das mais diversas fontes: alimentos, nutracêuticos, medicamentos e produtos biotecnológicos, efluentes industriais e poluentes ambientais (Abdelwahed *et al.*, 2008; Bandyopadhyay *et al.*, 2008; McLain, 2008; Wills *et al.*, 2008; Asare *et al.*, 2009; Ansare & Malik, 2009). Existe uma correlação importante

entre os resultados do teste Ames e testes de carcinogênese em roedores (Mortelmans & Zeiger, 2000; Shelby, 1988; Wogan *et al.*, 2004). Além do teste em *Salmonella*, outros ensaios de genotoxicidade em procariotos também contribuem valiosamente para a toxicologia genética e áreas correlatas (Adris *et al.* 2007; Podgórska *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2009).

## 6.2 - A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 3) é um fungo unicelular com ciclo eucarioto típico e completo e tem sido amplamente estudada, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas biomédicas em razão da sua simplicidade e similaridade genética, bioquímica e funcional com mamíferos em vários aspectos. Dessa maneira, esse organismo é um modelo útil para o melhor entendimento de diversas funções biológicas, principalmente na biologia do câncer, estudos de genética toxicológica e doenças humanas (Altmann & Trachsel, 1994; Foury 1997;

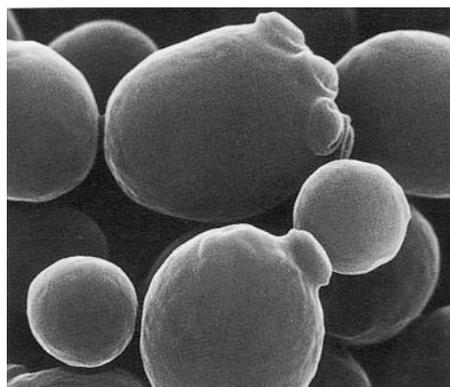


Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura mostrando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Lafon *et al.*, 2007; McCue & Phang, 2008; Miller-Fleming *et al.*, 2008; Parrella & Longo, 2008; Perocchi *et al.*, 2008; Valente *et al.*, 2009). Além disso, é utilizada na indústria química e de alimentos; na indústria farmacêutica, com ênfase na produção de proteínas terapêuticas, incluindo proteínas humanizadas, vacinas e probióticos; e na tecnologia ambiental, com fins de bioremediação, tratamento de resíduos e recuperação do solo (Forsburg, 2001; Sturgeon *et al.*, 2006; Keenan *et al.*, 2007; Menacho-Marquez & Murguía, 2007; Abe *et al.*, 2009; Pennacchia *et al.*, 2009; Remondo *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2009; Shibasaki *et al.*, 2009).

Algumas das propriedades que fazem a levedura particularmente apropriada para estudos biológicos incluem o seu rápido crescimento, segurança, o fato de possuir um sistema genético bem definido e mais significativamente, o conhecimento da sequência completa do seu genoma. *S.cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a possuir o

genoma completamente seqüenciado e depositado em bases de dados especializadas (como <http://www.yeastgenome.org>) e também existem ferramentas moleculares apropriadas para manipulação gênica e estudos de expressão, como o transcriptoma, proteoma, metaboloma, lipidoma e interatoma (Parsons *et al.*, 2003; Pena-Castillo & Hughes, 2007; Ejsing *et al.*, 2009; Gibson & Goldberg, 2009).

Os estudos em levedura foram muito úteis para a elucidação funcional de genes e proteínas, uma vez que existe uma facilidade imensa na construção de linhagens mutantes por meio de disrupção gênica e em estudos de complementação fenotípica por meio de genética reversa (Osborn & Miller, 2007; Menotta *et al.*, 2006; Ouyang *et al.*, 2009). A levedura também possui um sistema de transformação de DNA altamente versátil, sendo viáveis com numerosos marcadores genéticos; plasmídeos podem ser introduzidos nas células tanto como moléculas replicativas, quanto para integração no genoma. Diferente do que ocorre em outros microrganismos, a integração de uma seqüência de DNA procede quase que exclusivamente via recombinação homóloga. Igualmente, a recombinação homóloga combinada ao alto grau de conversão gênica das leveduras, possibilitou o desenvolvimento de técnicas para substituição direta de seqüências de DNA geneticamente modificadas, no lugar de sua cópia normal no cromossomo. Deste modo, genes intactos, mesmo daqueles dos quais não se conhecem mutações, podem ser convenientemente substituídos por alelos modificados. Estas técnicas têm sido extensivamente exploradas em análises que vão desde a regulação até relação estrutura-atividade de proteínas, incluindo mutagênese e reparação (Klinner & Schafer, 2004; Le Meur & Gentleman, 2008; Schöner *et al.*, 2008).

Ao contrário da maioria dos microrganismos, linhagens da levedura *S. cerevisiae* são estáveis tanto em estado haplóide quanto diplóide. Assim, mutações recessivas podem ser convenientemente isoladas e manifestadas em linhagens haplóides, e testes de complementação e segregação gênica podem ser plenamente estudados em linhagens diplóides. A levedura é geneticamente bem caracterizada, especialmente quanto à sua resposta a agentes causadores de danos ao DNA nas pesquisas sobre mutagênese e reparo desta biomolécula e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo e homeostase metálica (Herrero *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Acevedo-Torres *et al.*, 2009).

Os ensaios com leveduras têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias. Esses testes são rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis, apresentando resultados confiáveis na identificação biológica. Além disto, a levedura possui um sistema endógeno de ativação metabólica constituído por um complexo enzimático (citocromo P-450) e detoxificação, sem a necessidade da adição de um sistema exógeno, sendo, desta forma, uma vantagem sobre os ensaios bacterianos (Zimmermann *et al.*, 1984; Kirpnick *et al.*, 2005; Toussaint & Conconi, 2006; Toussaint *et al.*, 2006; Knight *et al.*, 2007).

Para avaliação de toxicidade genética, experimentos de mutações reversas são os mais comumente utilizados. Estes se baseiam na restauração ou compensação de um defeito gênico responsável por um requerimento nutricional (Kilbey, 1975; Zimmermann, 1975). A restauração se deve a uma reversão exata do defeito original, enquanto que a compensação pode ser devido a uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação externa, como no caso dos alelos “nonsense”. Para que seja identificada a mutação reversa é necessário a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas, como por exemplo, a linhagem haplóide XV 185-14c (Hannan & Nasim, 1975; Zimmermann *et al.*, 1984). Esta linhagem permite a detecção de dois tipos de mutações locus específicas: reversões do alelo *lys1-1* ou do alelo *his1-7*, ocorrendo por mutações de sentido incorreto “missense” e reversões por deslocamento de quadro de leitura do DNA “frameshift” verificadas no locus *hom3-10*. As células revertentes podem ser detectadas pela semeadura em placas contendo meio seletivo no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em quantidades muito pequenas, permitindo um “background” de crescimento (Kilbey, 1975; Zimmermann, 1975).

Muitos agentes químicos e físicos que induzem mutagênese podem aumentar a frequência de recombinação em células diplóides, como um reflexo de danos induzidos no DNA. Algumas substâncias carcinogênicas, no entanto, são negativas em testes que detectam mutagênese, mas induzem recombinação, sugerindo que estes fenômenos podem estar interligados. No *crossing over*, ou permuta, ocorre a troca recíproca de segmentos de DNA entre dois cromossomos homólogos, sendo então utilizadas linhagens diplóides

heterólogas de *S. cerevisiae* podem ser utilizadas para detecção deste fenômeno (Zimmermann, 1975; Zimmermann & Vig, 1975; Lichten, 2008).

Além da resposta mutagênica e recombinogênica, os ensaios em levedura permitem investigar os mecanismos moleculares envolvidos na geração e reparação do dano. Para determinar a natureza das lesões geradas por um determinado agente, compara-se a sensibilidade da droga em mutantes deficientes em uma ou mais vias de reparação de DNA com a respectiva linhagem isogênica proficiente na via de reparo. Quando um mutante deficiente em uma via de reparação do DNA apresenta uma sensibilidade maior que a linhagem selvagem proficiente na reparação, pode-se inferir que a via deficiente é necessária para a reparação das lesões provocadas pela substância (Soares *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2004; Seiple *et al.*, 2006; Vasconcellos *et al.*, 2007).

Dessa maneira, mais de 1000 laboratórios em todo o mundo já utilizaram este organismo como modelo de estudo, sendo uma excelente ferramenta para desenvolvimento de modelos de biologia celular, molecular e genética (Mustacchi *et al.*, 2006; Gibson & Goldberg, 2009; Irons, 2009; Lorenz *et al.*, 2009).

### 6.3- Ensaio com células de mamíferos

#### 6.3.1 - Células V79

Os ensaios de mutagênese empregando células de mamíferos em cultura datam de 1968 e as primeiras linhagens celulares utilizadas para esse propósito foram os fibroblastos de pulmão de hamster chinês

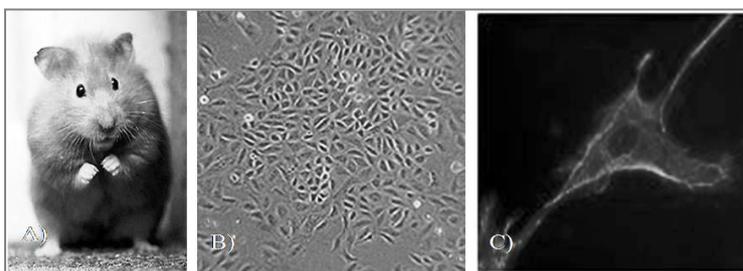


Figura 4: A) foto do hamster chinês B) foto mostrando células V79 em cultura C) foto mostrando uma célula de V79 isoladamente

(Fig. 4), conhecida como V79, e as células de ovário de hamster chinês, as CHO (Bradley *et al.*, 1981).

As células V79 possuem interessantes propriedades para ensaios de toxicologia genética: fácil cultivo e manutenção; crescimento rápido e curto período de adaptação;

tempo de geração entre 12 e 16 horas e capacidade de iniciar um rápido crescimento exponencial a partir um pequeno inóculo. Além disso, possuem uma elevada eficiência de clonagem, em torno de 75-95%, pertencem ao gênero masculino e apresentam cariótipo estável ( $22\pm 1$ ) (Bradley *et al.*, 1981). Essas células recuperam-se rapidamente após estoque em nitrogênio líquido, o que permite criopreservação sem afetar suas características, e possuem uma baixa frequência de mutação espontânea (Bradley *et al.*, 1981).

De tal forma, o emprego das células V79 em estudos de genotoxicidade é indiscutível. Para avaliação de lesões ao DNA utiliza-se principalmente o ensaio cometa enquanto para avaliação de potencial mutagênico, utilizam-se os ensaios de mutação empregando o locus da hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase ou da bomba de sódio e potássio. Uma pequena porcentagem de trabalhos avalia mutação utilizando marcas auxotróficas e prototróficas, mutações que conferem sensibilidade à temperatura e mutações medidas pela resistência a várias drogas. O ensaio de micronúcleo é empregado para avaliar quebras cromossômicas e essas células também são primeira escolha para o teste de aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs (Kalweit *et al.*, 1999; von der Hude *et al.*, 2000; Osada *et al.* 2005).

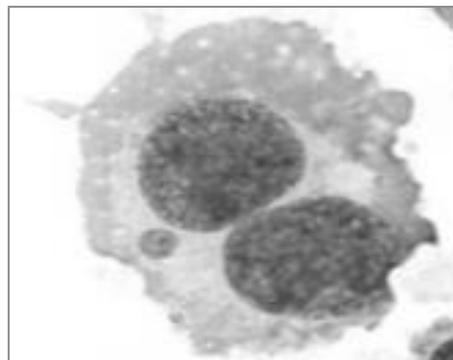
Os elementos básicos de estrutura e reparação de DNA nas células V79 são similares, mas não idênticos, aos de células humanas. De tal maneira que as conseqüências da interação química de xenobióticos com o DNA, seja de células humanas ou de células V79 são similares. Portanto, os resultados obtidos nessa linhagem são extremamente relevantes para humanos, sendo inclusive mais importantes que a extrapolação dos dados obtidos em procariotos (Bradley *et al.* 1981). Além disso, essas células podem ser adaptadas para uso com sistemas de ativação metabólica, simulando o metabolismo *in vivo* para detecção de pró-mutágenos (Nakagawa *et al.* 2008). Novas metodologias para ensaios de transformação celular têm sido desenvolvidas para permitir ensaios de promoção tumoral, com especial atenção para detecção de carcinógenos não-genotóxicos (Sakai *et al.* 2002).

As células V79 têm sido amplamente empregadas em estudos de diversas áreas, como estresse oxidativo (Kim *et al.* 2007; Roy *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2008), mutagênese e reparação de DNA (Campa *et al.* 2004; Jagetia *et al.* 2007; Pathak *et al.* 2007; Slamenova *et al.* 2007; Speit *et al.* 2007; Baum *et al.*, 2008; Bryant *et al.*, 2008; Cavalcanti *et al.*, 2008; Smart *et al.*, 2008), mecanismos da morte celular programada (Wang *et al.*

2007; Zhang *et al.*, 2008) e metabolismo (Miyagoshi & Fujikawa-Yamamoto, 2006; Oda, 2006; Yamada *et al.*, 2008).

### 6.3.2- *Teste de micronúcleos*

As anormalidades na estrutura do cromossomo são uma consequência direta do dano em nível de DNA. Por exemplo, as quebras cromossômicas podem resultar de quebras duplas de DNA não reparadas e os rearranjos cromossômicos, do reparo incorreto de quebras na fita de DNA. A perda de cromossomos e os erros de segregação são eventos importantes na carcinogênese, causados principalmente por



defeitos na formação do fuso, centrômero e alterações na condensação da cromatina antes da metáfase (Fenech, 2000). Nas técnicas citogenéticas clássicas, os cromossomos são estudados diretamente pela observação de aberrações nas metáfases. Entretanto, essa abordagem, embora mais detalhista, é bastante complexa e trabalhosa. Desse modo, o desenvolvimento de um sistema simples para avaliação do dano cromossômico foi necessário. A resposta para o problema foi proposta independentemente por Schmid e Heddle: acessar o dano cromossômico *in vivo* pela medida do micronúcleo (Fig. 5), também conhecido pelos hematologistas como corpos de Howell-Jolly em linfócitos, em populações de células em divisão. O ensaio de micronúcleo é hoje um dos testes citogenéticos *in vivo* mais bem estabelecidos, com validação internacional e aplicável a qualquer população celular nucleada(Fenech, 2000).

Figura 5: foto mostrando micronúcleo em V79

As quebras cromossômicas que não possuem centrômero não podem ligar-se às fibras cinetocóricas e conseqüentemente, não podem migrar para os pólos opostos da célula juntamente com os demais cromossomos durante a anáfase. Na telófase, tanto da mitose quanto meiose, a membrana nuclear é refeita ao redor do conjunto de cromossomos. Os fragmentos acêntricos ou até mesmo um cromosso inteiro que não estava ligado ao fuso mitótico são incapazes de integrarem-se aos novos núcleos (Fig. 6). Em

razão disso, esses fragmentos formam um pequeno núcleo individual, denominado micronúcleo, o qual é detectado em células interfásicas como um pequeno corpúsculo arredondado de cromatina, separado do núcleo principal (Fig. 5 e 6) (Fenech, 2000; 2006; 2007).

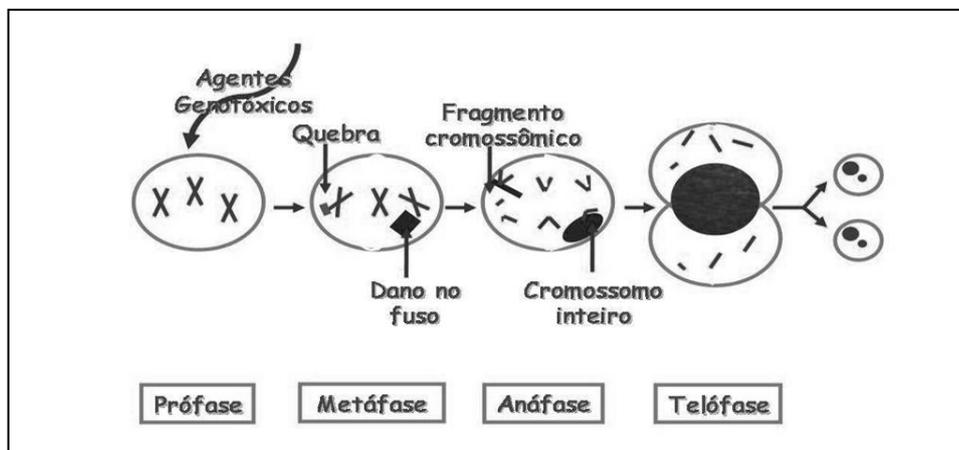


Figura 6: Esquema mostrando o processo de formação do micronúcleo

O micronúcleo constitui um índice de quebras cromossômicas permanentes e perda cromossomal que pode ser detectado em células que tenham completado ao menos uma divisão celular, sendo desejável a avaliação no estágio de células binucleadas (Fenech, 2000). Ocasionalmente, pontes nucleoplásmicas entre os núcleos também podem ser observadas e freqüentemente correspondem a cromossomos dicêntricos em que os centrômeros foram puxados para pólos opostos da célula, constituindo assim em um indicativo de rearranjo cromossômico. O teste de micronúcleos, portanto, detecta mutagênese cromossômica do tipo clastogênese, aneugênese, danos no fuso mitótico, aberrações numéricas e cromossômicas. O micronúcleo aparece pela primeira vez no final da primeira divisão mitótica, após clastogênese ou aneugênese, porém micronúcleos adicionais podem se formar nas divisões seguintes. Em razão disso, as células precisam ter passado por um ciclo mitótico (Fenech, 2000; 2006; 2007).

Para a execução da técnica, a população celular deve dividir-se e a cinética dessa divisão celular deve ser bem estabelecida. Considerando que as células de uma população não dividem-se ao mesmo tempo, várias abordagens foram desenvolvidas para facilitar a execução do teste. Uma das mais conhecidas é o teste de micronúcleo com bloqueio na citocinese. Nessa variação do teste, as células que completaram uma divisão nuclear são

tratadas com citocalasina B, um inibidor da polimerização da actina, necessária para formação dos microfilamentos que constriem o citoplasma entre os núcleos filhos durante a citocinese, permitindo que as células em divisão sejam rapidamente identificadas pelo aspecto binucleado (Fenech, 2000). O uso da citocalasina B possibilita o acúmulo das células em divisão no estágio binucleado na população, independente da sincronização e proporção de células em divisão (Fenech, 2006).

Algumas inovações foram realizadas na técnica ao longo desses 20 anos, e atualmente o teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese é um método útil para medida de quebras cromossômicas, perda cromossômica, não disjunção cromossômica, necrose, apoptose e efeito citostático (Fenech, 2006).

### 5.3.3- *Ensaio cometa*

O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese de célula única em gel, é amplamente empregado para avaliar dano ao DNA e reparação em células eucarióticas. A popularidade deste teste deve-se à sua sensibilidade, custo relativamente baixo e simplicidade. Além disso, o teste pode ser realizado em uma suspensão celular contendo uma população pequena de células, em proliferação ou não, e corresponde a um teste citogenético (Tice & Strauss, 1995; Hartmann *et al.*, 2001; Collins, 2004; Dusinska & Collins, 2008; Shaposhnikov *et al.*, 2008).

O princípio desse ensaio leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização no núcleo celular. Para a realização do ensaio, as células são embebidas em agarose, suas membranas são rompidas com uso de detergentes em pH alcalino e as proteínas nucleares são removidas com uso de altas concentrações salinas. Dessa maneira, em lâmina permanece apenas o nucleóide. Quando a lâmina é submetida ao campo elétrico, o DNA do nucleóide migra no gel de acordo com seu tamanho. Os fragmentos pequenos migram com uma velocidade maior que a matriz nuclear. Assim sendo, os fragmentos do DNA danificado formam, após a migração, o aspecto de um cometa e a extensão da migração correlaciona-se diretamente com a quantidade de dano ocorrido (Fig. 7) (Tice *et al.*, 2000; Lee & Steinert, 2003; Collins, 2004; Burlinson *et al.*, 2007 ; Kumaravel *et al.*, 2009).

Esse teste é uma avaliação de genotoxicidade, o qual detecta danos primários ao DNA induzidos por uma série de substâncias químicas, como agentes intercalantes, alquilantes e oxidantes (Collins, 2004). Os danos detectados são principalmente quebras simples e duplas na fita de DNA, eventos de reparo por excisão incompletos, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas entre moléculas de DNA, entre DNA e proteínas e entre DNA e xenobióticos (Tice *et al.*, 2000; Olive & Banáth, 2006; Collins *et al.*, 2008; Shaposhnikov *et al.*, 2008). Embora seja possível quantificar o dano, não é possível identificar com clareza qual desses eventos foi responsável pela indução da lesão. Basicamente existem dois protocolos principais para a execução do teste: a versão neutra, conforme o método original aprimorado por Ostling e Johanson em 1984, utiliza eletroforese em tampão de pH entre 7,0 e 8,0 para detecção quebras duplas nas fitas de DNA e ligações cruzadas DNA-DNA, DNA-proteína, DNA-xenobiótico (Ostling & Johanson, 1984); a versão alcalina realiza eletroforese em pH maior que 13,0, desnaturando o DNA, podendo detectar quebras simples e duplas, sítios álcali-lábeis, sítios de reparo por excisão incompletos e as ligações cruzadas. A versão alcalina é mais empregada por ser mais abrangente, pois além de detectar danos diretos, torna possível a avaliação de danos indiretos como lesões por metilação e adutos, os quais sendo álcali-lábeis, expressam-se como quebras simples frente ao tratamento alcalino. Além disso, pode-se ainda utilizar o protocolo levemente alcalino, cuja eletroforese acontece em pH 12,1 e assim não detecta danos álcali-lábeis (Tabela 2) (Tice *et al.* 2000; Olive & Banáth, 2006).

Tabela 2- Ensaio Cometa: Efeito do pH na avaliação do dano no DNA

pH 7-8	pH 12,1	pH > 13
Quebras duplas de DNA	Quebras duplas de DNA	Quebras duplas de DNA
Crosslinks	Quebras simples de DNA	Quebras simples de DNA
	Reparo por excisão	Reparo por excisão
	<i>Crosslinks</i>	<i>Crosslinks</i>
		Danos alcalilábeis

O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas por esse teste podem ser reparadas (Tice *et al.* 2000; Collins *et al.*, 2008; Shaposhnikov *et al.*, 2008). A análise dos resultados pode ser realizada visualmente em microscópio ótico quando as células forem coradas com nitrato de prata ou em microscópio de fluorescência, quando coradas com brometo de etídeo, laranja de acridina ou iodeto de propídeo. As células são classificadas de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça (núcleo) em 4 classes de danos: classe 0: sem cauda (sem dano); classe 1: com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; classe 2: com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 3: com uma cauda longa, superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 4: cauda longa e espalhada em forma de leque (Fig. 7). O teste ainda permite inferir fragmentação apoptótica de DNA, em células cujo nucleóide não mostra-se denso e apresenta-se difuso, ao contrário da célula sem dano, em que o material nuclear está compacto (Olive & Banath, 2006; Kumaravel *et al.*, 2009).

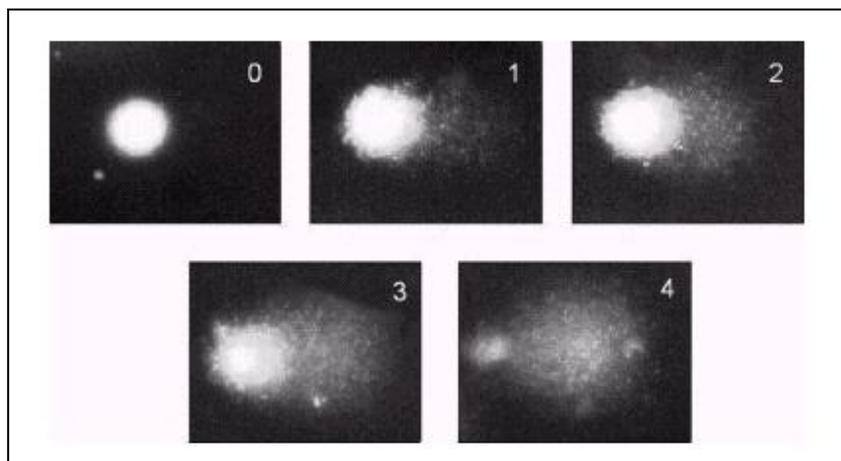


Figura 7: Diferentes classes de danos (0-4) de células obtidas pelo Ensaio de Cometa. Adaptado de Kumaravel *et al.* (2009).

A avaliação de quebras simples na cadeia de DNA fornece informações limitadas, já que estas são rapidamente reparadas e não são consideradas como lesões mutagênicas ou letais significativas. Muitos agentes lesivos ao DNA não induzem quebras diretamente, mas apenas criam locais vulneráveis, que são álcali-lábeis e provavelmente convertidos a quebras quando sob solução de eletroforese de alto pH (Tice *et al.* 2000; Shaposhnikov *et*

*al.*, 2008; Kumaravel *et al.*, 2009). Então, para tornar a pesquisa mais sensível e específica, introduziu-se uma nova etapa de digestão com enzimas de reparo sítio-específicas. Para cada tipo específico, os sítios sensíveis à enzima são identificados e convertidos em quebra, aumentando a cauda migratória do cometa. São exemplos: endonuclease III (Endo III) para detecção de pirimidinas oxidadas; formamidopirimidina DNA glicosilase (Fpg) para identificação de 8oxoG, assim como outras purinas danificadas; T4 endonuclease V para com dímeros de ciclobutano pirimidina gerados por UV; AlkA que reage com 3-metiladeninas; e uvrABC que reconhece lesões de maior tamanho. Quando os nucleóides são incubados com essas enzimas, os sítios específicos reconhecidos por esses agentes são incisados e, a partir disso, geram uma quebra de cadeia de DNA que pode então ser detectada pelo ensaio cometa. Dessa forma, a diferença entre o índice de dano de uma amostra tratada com uma enzima de reparação de DNA para um dano específico e a mesma amostra não tratada (incubada somente com o tampão de reação) fornece a quantificação da lesão em análise (Speit *et al.*, 2004; Müller, 2006; 2006b; Gajski *et al.*, 2008).

Esse teste pode ser realizado tanto *in vitro* como *in vivo*, em diversos tipos celulares, incluindo fungos, vegetais e células animais; existe um grande interesse no cometa *in vivo* em animais com fins de detecção de lesões ao DNA em diferentes órgãos (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Juchimiuk *et al.*, 2006). Dessa maneira, o ensaio cometa também é amplamente empregado em biomonitoramento humano e ambiental utilizando diversos organismos (Guecheva *et al.* 2001; Collins *et al.*, 2004; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Szeto *et al.*, 2005; Villela *et al.*, 2007). Além disso, programas de computador foram desenvolvidos para aperfeiçoar a análise de resultados e permitir a quantificação exata do conteúdo de DNA na cabeça e cauda, tanto em protocolos empregando corantes fluorescentes como em experimentos utilizando coloração com prata. Atualmente a análise automatizada tem sido utilizada exponencialmente em trabalhos empregando o ensaio cometa, embora a análise visual seja extremamente válida (Burlinson *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2007; Kumaravel *et al.*, 2009).



## **Objetivos**

## **Objetivos**

### **Objetivo geral**

- A proposta desse trabalho é ampliar os conhecimentos a respeito da toxicidade genética do ditelureto de difenila por meio de ensaios em bactéria, levedura e em células de mamíferos e sugerir os mecanismos moleculares e celulares envolvidos.

### **Objetivos específicos**

- Investigar a atividade mutagênica do ditelureto de difenila em procariotos utilizando o Teste *Salmonella*/Microsoma;
- Avaliar a ação mutagênica e pro-oxidante do ditelureto de difenila no organismo modelo eucariótico *Saccharomyces cerevisiae* , investigando também as possíveis vias de reparo de DNA envolvidas nos danos induzidos por esse composto;
- Avaliar o perfil de citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico dessa molécula em células V79 em cultura por diferentes ensaios de viabilidade celular; pelo uso de diferentes versões do ensaio cometa; pela determinação da peroxidação lipídica e dos níveis de GSH.



## **Capítulo I**

**Evaluation of the cytotoxicity,  
genotoxicity, and mutagenicity of  
diphenyl ditelluride in several  
biological models**

**Submetido à revista  
Biochemical Pharmacology**

# EVALUATION OF THE CYTOTOXICITY, GENOTOXICITY, AND MUTAGENICITY OF DIPHENYL DITELLURIDE IN SEVERAL BIOLOGICAL MODELS

Tiago Hoerbe Degrandi<sup>1</sup>, Iuri Marques Oliveira<sup>1</sup>, Gabriel Silveira d'Almeida<sup>1</sup>, Cícero Rafael Leão Garcia<sup>1</sup>, Izabel Villela<sup>1</sup>, Temenouga Nikolova Guecheva<sup>1</sup>, Renato Moreira Rosa<sup>2</sup> and João Antonio Pêgas Henriques<sup>1,2</sup> \*.

<sup>1</sup>Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, 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

Diphenyl ditelluride (DPDT) is an organotellurium compound candidate to prototype for a development of novel biological active molecules. Thus, it is important to evaluate its toxic effects. We evaluated the genetic toxicity of DPDT in various biological models: Chinese hamster lung fibroblast (V79), in yeast *S. cerevisiae* strains proficient and deficient in several DNA repair pathways and *Salmonella typhimurium*. DPDT induced frameshift mutations in *S.typhimurium* and in haploid wild type strain of *S. cerevisiae*. Thus, DPDT presents a behavior similar to an intercalating agent. Mutants of *S. cerevisiae* defective in base excision repair and in recombinational repair showed high sensitivity to DPDT. In V79 cells, its cytotoxic activity occurs in doses from 1  $\mu$ M after 2 h of exposure. Accordingly, the treatment with cytotoxic doses of DPDT increased TBARS levels and decreased GSH/GSSH ratio in yeast and V79 cells. At the higher doses, DPDT generates DNA single and double strand breaks in V79 cells, without and with metabolic activation, determined using alkaline and neutral comet assay. DPDT induced oxidative DNA damage, determined using Comet assay employing the enzymes Fpg and Endo III. The treatment also induced an increase in the number of binucleated cells in the micronucleus test in V79 cells, indicating mutagenic properties. Finally, pre-incubation with N-acetylcysteine, which restored normal GSH content, reduce DPDT oxidative, genotoxic and mutagenic effects. In summary, the cellular effects of DPDT are complex and linked to its ability to disturb the redox homeostasis and to intercalate into DNA, which lead to DNA damage, cellular injury and death.

**KEYWORDS:** diphenyl ditelluride, V79 cells, *Saccharomyces cerevisiae*, genotoxicity, oxidative stress

## 1. INTRODUCTION

Tellurium (Te), a chemical element which name derives from the Latin Tellus (Earth), rarely occurs in the free state in the nature; the most common compounds are tellurates and tellurides of gold, silver and bismuth. Moreover, this metalloid is known to be present in plants, particularly in members of the *Alium* family. A number of studies have shown that trace amounts of Te are present in body fluids, such as blood and urine [1]. Moreover, Te has been shown to be present as tellurocysteine and telluromethionine in several proteins in bacteria, yeast and fungi. But till now, no telluroproteins have been identified in animal cell [2].

Currently, inorganic Te is used in vulcanization of rubber, metaloxidizing solutions to blacken or tarnish metals and in the industry of nanoparticulate semiconductors. Moreover, the use of organic Te compounds will increase due to its importance as catalyst in inorganic and organic synthesis, as stabilizer for polymers, as a component of insecticides, in phase-change optical magnetic disks (such as DVD-RAM and DVD-recordable disk DVD-RW) and in the photography industry [1]. This implies in an increased risk of occupational and environmental human exposure to this element.

The main attention to the biological effects of this element has been drawn to its toxicity, since Te is a non essential and harmful metalloid. Inorganic and organic Te compounds are highly toxic to the central nervous system of rodents causing demyelization, probably by disrupting cholesterol synthesis in Schwann cells through the inhibition of squalene monooxygenase [3, 4], which sequentially affects the expression of the myelin proteins themselves at the transcriptional level [5]. In addition, it causes persistent neuromotor impairment and deficit of learning in several tasks of investigation and memory [6].

Synthetic organotellurium compounds (OT) have found limited use in the past, but they have become a promising and advantageous alternative for numerous applications with a corresponding increase in the reports about OT chemistry appearing in the literature. In this sense, OT compounds have been synthesized since 1840, however only in the last two decades, evidences indicating that OT molecules are promising pharmacological agents possessing interesting biological activities have accumulated. Several reports have

been published showing immunomodulating, antioxidant, anticancer and anti-inflammatory properties of OT compounds [7-9].

Diphenyl ditelluride (DPDT; Fig. 1) is a solid, non-volatile, hydrophobic, simple and stable OT used as an important and versatile intermediate in organic synthesis. It is extremely toxic to rodents causing marked neurotoxic effects in mice after acute or prolonged exposure. Furthermore, it is highly toxic to rats inducing changes in the brain neurochemical parameters after *in vitro* and *in vivo* exposure [6, 10-12]. Besides, DPDT can be teratogenic, causing various morphologic abnormalities in rat fetuses in development [13, 14]. In addition, it produces hematological disorders in rodents, renal and hepatic toxicity [15, 16]. In contrast to these toxic effects, studies have demonstrated that DPDT has glutathione peroxidase-like activity and is able to prevent oxidative stress induced by several oxidizing agent [17].

The aim of the present study was to investigate the cytotoxic effects of DPDT, focusing on its effects on cellular redox status, genotoxicity, and mutagenicity, employing three different test systems: *Salmonella*/microsome assay, repair proficient and deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains, and permanent lung fibroblast cell line derived from Chinese hamster (V79 cells). For this purpose, we determined the cytotoxicity, glutathione levels and lipid peroxidation after DPDT exposure in *S. cerevisiae* and V79 cells. DPDT-induced DNA damage was estimated by using the comet assay and micronucleus test in mammalian cells. The mutagenic potential of DPDT was also evaluated in bacteria and in the simple eukaryote *S. cerevisiae*, where haploid strains with different defects in DNA repair were tested. This study is relevant to human health, since it is reasonable to presume that the exposure of humans to OT may increase in the future, which can provoke occupational and environmental risks. Moreover, it is important to evaluate the safety for a possible future pharmacological application and to explore new biological properties of this compound or derivatives.

## 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 (GC/HPLC) [18]. Yeast extract, bacto-peptone, and bacto-agar were obtained from Difco Laboratories (Detroit, MI). 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). Aflatoxina B1, 4-nitroquinoline (4-NQO), sodium azide (l-histidine, l-threonine, l-methionine, l-tryptophan, l-leucine, l-lysine), nitrogen bases (adenine and uracil), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), NADPH, glutathione reductase, thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TMP), N-acetyl-cysteine (N-ac), 5,5'-dithionitrobenzoic acid (DTNB), cytochalasin-B (Cyt-b), methyl methanesulphonate (MMS), cyclophosphamide (CP), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 4-vinylpyridine 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, also known as MutM), and endonuclease III (Endo III, also known as Nth) were obtained from BioLabs (New England). The S9 fraction, prepared from livers of Sprague-Dawley rats, pre-treated with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254, was purchased from Moltox (Annapolis, MD, USA). All others reagents were of analytical grade.

### 2.2. Assays in bacteria

#### 2.2.1 Strains and culture conditions in bacteria assays

*Salmonella typhimurium* strains TA98, TA97a, TA100 and TA1535 and TA102, described by (Mortelmans 2000), were kindly provided by B. M. Ames (University of California, Berkeley, CA, USA). Bacterial media were prepared according to Mortelmans

and Zeiger [19]. Complete medium for growing strains (NB) contained 2.5% oxid nutrient broth #2. Solidified medium with 1.5% bacto-agar, supplemented with 1× Vogel-Bonner salts and 2% glucose, was used for plates.

### **2.2.2 *Salmonella*/microsome mutagenicity assay**

Mutagenicity was assayed by the pre-incubation procedure proposed Maron and Ames [20], and revised by Mortelmans and Zeiger [19]. The S9 metabolic activation mixture (S9 mix) was prepared according to Maron and Ames [20]. DPDT was dissolved in DMSO immediately before use. 100 µL of test bacterial cultures ( $(1-2) \times 10^9$  cells/mL) were incubated in the dark at 37 °C with different concentrations of DPDT (4, 8, 12 16 and 20 mg/plate) in the presence or absence of the S9 mix for 20 min, without shaking. Subsequently, 2mL soft agar (0.6% agar, 0.5% NaCl, 5 mM histidine, 50 mM biotin, pH 7.4, 45 °C) was added to the test tube, and immediately poured onto a minimal agar plate (1.5% agar, Vogel-Bonner E medium containing 2% glucose). Aflatoxin B1 (0.5 µg/plate) was used as positive control for all strains in the metabolic assay with the S9 mix. In the absence of the S9 mix, positive controls were 4-NQO (0.5µg/plate) for TA98, TA97a, and TA102, whereas sodium azide (0.5 µg/plate) was used for TA100 and TA1535. Plates were incubated in the dark at 37 °C for 48 h before revertant colonies were counted.

## **2.3. Assays in yeast**

### **2.3.1 Strains and media for yeast assays**

The relevant genotypes of *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. Media, solutions, and buffers were prepared as previously described by Burke [21]. The complete medium (YPD) containing 0.5% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose was used for routine growth. The minimal medium (MM) contained 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, 2% bacto-agar. The synthetic complete medium (SC) was MM supplemented with 2 mg adenine, 2 mg arginine, 5 mg lysine, 1 mg histidine, 2 mg leucine, 2 mg methionine, 2 mg uracil and 2 mg tryptophan per 100 mL MM. For plates, the medium was solidified with 2% bacto-agar. For mutagenesis in XV185-14c

strain was used omission medium lacking lysine (SC-lys), histidine (SC-his) or homoserine (SC-hom).

### **2.3.2 Yeast growth**

Stationary cultures were obtained by inoculation of an isolated colony in liquid YPD medium and grown for 48 h at 30 °C with aeration by shaking, the cultures contained  $(1-2) \times 10^8$  cells/mL with 20-30% budding cells. Cells were harvested and washed twice with saline solution. The number of cells with and without buds was determined by counting in Neubauer chamber by microscope counts.

### **2.3.3. Cytotoxicity in yeast strains proficient and deficient in DNA repair**

The sensitivity to DPDT was assayed by incubation of  $2 \times 10^8$  cells/mL of stationary cultures in phosphate-buffered saline solution (PBS 0.067 M, pH 7.0) with different concentrations (1.0, 5.0, 10, 50, 100, 500 and 1000  $\mu$ M) of the compound in rotary shaker at 30 °C for 2 h. After treatment, cells were harvested by centrifugation at  $12,000 \times g$  for 1 min, washed twice in PBS, counted, diluted, and plated on solid YPD. Plates were incubated at 30 °C for 3-5 days before counting.

### **2.3.4. Detection of DPDT-induced reverse and frameshift mutation in *S. cerevisiae***

Mutagenesis was measured in *S. cerevisiae* XV185-14c strain. A suspension of  $2 \times 10^8$  cells/mL in stationary phase was incubated for 2 h at 30 °C with different concentrations of DPDT in PBS. Cells were pre-treated with N-ac for 18 h before DPDT treatment. Cell survival was determined in SC (3-5 days, 30 °C), and mutation induction (LYS, HIS, or HOM revertants) in the appropriate omission media (7-10 days, 30 °C). Whereas his1-7 is a non-suppressible missense allele, and reversions result from mutation at the locus itself, lys1-1 is a suppressible ochre nonsense mutant allele, which can be reverted either by locus-specific or forward mutation in a suppressor gene. True reversions and forward (suppressor) mutations at the lys1-1 locus were differentiated according to Schuller and von Borstel. It is believed that hom3-10 contains a frameshift mutation due to

its response to a range of diagnostic mutagens [22]. Assays were repeated at least three times and plating was in triplicate for each dose.

### **2.3.5. Preparation of yeast cell-free extracts**

Crude yeast extracts were prepared by glass bead lysis as follows: cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 7.2) with an equal volume of acid-washed 425-600  $\mu\text{m}$  glass beads and PMSF, vortexed for 10-15 cycles (30 s each), followed by 30 s of cooling. The mixture was then centrifuged for 5 min at  $6,000 \times g$  to remove cellular debris and the glass beads [21]. The supernatant was kept on ice for immediate use. Protein concentration was determined by the Bradford assay [23].

### **2.3.6. Measurement of lipid peroxidation in yeast**

The extent of DPDS-induced lipid peroxidation was determined by the reaction of TBA with malondialdehyde (MDA), a product formed by lipid peroxidation. The assays were performed according to Salgo and Pryor [24], with minor modifications. Two mL 0.4 mg/mL TCA, 0.25 M HCl were added to the lysate, which was then incubated with 6.7 mg/mL TBA for 15 min at 100 °C. The mixture was centrifuged at  $750 \times g$  for 10 min. As TBA reacts with other products of lipid peroxidation in addition to MDA, results are expressed in terms of thiobarbituric reactive species (TBARS), which were determined by absorbance at 532 nm. Hydrolyzed TMP was used as the standard. The results were normalized by protein content [23].

### **2.3.7. Determination of total glutathione, GSH and GSSG in yeast**

Total glutathione (GSH plus GSSG) was determined by photometric determination of 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), which was produced from DTNB in a kinetic assay, according Akerboom and Sies [25] with minor modifications. An equal volume of 2 M  $\text{HClO}_4$ - 4 mM EDTA was added to the cell extract, and the precipitated proteins were sedimented by centrifugation at  $8000 \times g$  for 10 min at 4 °C. The supernatant was

neutralized with 2 M KOH and 0.3 M Mops, and the insoluble residue was removed by centrifugation under the same conditions. For the spectrophotometric determination, 910  $\mu\text{L}$  of the cell extract supernatant or of the standard glutathione solution, in the same phosphate-EDTA buffer, were mixed with 50  $\mu\text{L}$  of 4 mg/ml NADPH in 0.5% (w/v)  $\text{NaHCO}_3$ , 20  $\mu\text{L}$  of 6 U/ml glutathione reductase in phosphate-EDTA buffer, and 20  $\mu\text{L}$  of 1.5 mg/ml DTNB in 0.5%  $\text{NaHCO}_3$ . The increase in absorbance was measured at 412 nm. Total glutathione content was determined in  $\text{nmol}/10^6$  viable cells. For GSSG determination, 4-vinylpyridine was added to a final concentration of 0.1% (v/v), and then incubated for 1 h at room temperature. At this concentration, 4-vinylpyridine is able to react with all GSH without interfering with the GSSG determination. GSH was determined based on the total glutathione and GSSG concentration results. The results were expressed as GSH/GSSG ratio.

## **2.4. Assays in V79 cells**

### **2.4.1. V79 cells culture and treatments**

V79 cells were cultured under standard conditions in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated-FBS, 0.2 mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin. Cells were kept in tissue-culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  in air, and were harvested by treatment with 0.15% trypsin-0.08% EDTA in phosphate-buffered saline solution (PBS). Cells were seeded ( $3 \times 10^6$  cells) in 5 mL complete medium in a 25- $\text{cm}^2$  flask, and grown for 2 days up to 60-70% confluence before the treatment with the test substance. DPDT was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and added to FBS-free medium to achieve the different designed 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 pre-treated with 5 mM N-ac for 24 h in complete medium.

#### **2.4.2. Cytotoxicity evaluation in V79 cells using the assay of LDH leakage**

After submitted to the treatments, the fraction of total LDH activity in the supernatants is taken as an indicator of membrane leakage or cell lysis. The activity of the enzyme LDH was estimated according to the method described by Wroblewski and Ladue [26] by assessing the rate of conversion of NADH (1.5 mmol/L) to NAD<sup>+</sup> in the presence of L-(+)-lactic acid (50 mmol/L) in culture supernatants (S) and in the remaining cells (C) after lysis with serum-free medium contained 1% Triton X-100. The percentage of LDH leakage was calculated as follows: % leakage =  $S \div (S + C) \times 100$ .

#### **2.4.3 Preparation of V79 cell-free extracts**

Briefly, V79 cells ( $3 \times 10^6$  cells) were incubated with various concentrations of DPDT for 2 h in FBS-free medium, and after lysis with Tris.HCl (15 mM for 1 h).

#### **2.4.4. Measurement of lipid peroxidation in V79 cells**

The lipid peroxidation in V79 cells was measurement as described in item 2.3.6

#### **2.4.5. Determination of total glutathione, GSH and GSSG in V79 cells**

The total glutathione, GSH and GSSG in V79 cells was measurement as described in item 2.3.7

#### **2.4.6. Comet assay**

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al., with minor modifications [27]. V79 cells were incubated with various concentrations of DPDT for 2 h in FBS-free medium. After treatment, cells were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and resuspended in complete medium. Then, 20  $\mu$ L of cell suspension ( $3 \times 10^6$  cells/mL) were dissolved in 0.75% low-melting point agarose, and immediately spread onto a glass microscope slide pre-coated with a layer of 1% normal melting point agarose. Agarose was allowed to set at 4 °C for 5 min. The slides were then incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10.0) at

4 °C for at least 1 h in order to remove cellular proteins and membranes, leaving the DNA as “nucleoids”. The assay at pH 8.5 was performed essentially according to the same procedure as the alkaline version except the pH value. In the neutral version, electrophoresis was run in a buffer consisting of 100 mM Tris and 300 mM sodium acetate at pH 8.5 [27]. In the modified Comet assay, slides were removed from the lysing solution, washed three times in enzyme buffer (40 mM Hepes, 100 mM KCl, 0.5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0), and incubated with 70 µL Fpg (100 mU per gel; 45 min 37°C), or EndoIII (100 mU per gel; 30 min 37°C). After the lysis procedure, the slides were placed on a horizontal electrophoresis unit. The unit was filled with fresh buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13.0), which covered the slides for 20 min at 4 °C in order to allow DNA unwinding and expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V (74 V/cm). All the above steps were performed under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), washed in bi-distilled water, and stained using a silver staining protocol as described in [28]. After staining step, gels were left to dry at room temperature overnight and analyzed. One hundred cells (50 cells from each of two replicate slides) for the concentration of each test substance were selected, and analyzed visually using an optical microscope according to the tail length and the amount of DNA present in the tail. When selecting cells, edges and cells around air bubbles were avoided [28]. These 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 1–2× the diameter of the head; (4) class 3: with a tail longer than 2× 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. The genotoxic effect of DPDT in V79 cells was estimated by two different parameters - damage index (DI) and damage frequency (DF). Damage index ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells × 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells × 4) [28, 29]. Damage frequency (%) was calculated based on number of cells with tails as compared with those with no tail. International guidelines and recommendations for the comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method [29]. The vehicle was used as negative control, and MMS treatment at  $4 \times 10^{-5}$  M for 1 h was used as positive control in absence of metabolization, and  $1.5 \times 10^{-5}$  M CP in presence of metabolization. In the modified comet assay, the

vehicle was used as negative control, and treatment with 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 5 min at 4 °C was used as positive control. In the experiment involving metabolic activation, the S9 mix was prepared according to [30]. Cells were incubated with S9 mix for 30 min, and then treated with several concentrations of DPDT at 37 °C for 20 min.

#### **2.4.7. Micronucleus test**

The micronucleus assay was performed according to Bonacker et al. [31], with minor modifications. V79 cells were incubated with various DPDT concentrations for 2 h in FBS-free medium. After treatment, cultures were washed twice with the medium, and Cyt-B was added at final concentration of 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cultures were harvested 21 h after Cyt-B addition. Cells were separated from the bottle by trypsinization, and the cellular suspension was centrifuged at  $1000 \times g$  for 5 min. Cells were then resuspended in 0.075 M KCl solution maintained at 4 °C for 3 min (mild hypotonic treatment). Subsequently, cells were centrifuged, and methanol/acetic acid (3:1) solution was carefully added. This fixation step was repeated twice, and finally, cells were resuspended in a small volume of methanol/acetic acid, and dropped onto clean slides. Slides were stained with 10% Giemsa (pH 6.8) for 3-4 min. Slides were mounted, and coded prior to analysis. MMS, at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration, was used as positive control, and the vehicle as negative control. Micronuclei were counted in 2000 binucleated cells (BNC) with well-preserved cytoplasm. The identification of micronuclei was carried out according to Fenech [32].

#### **2.5. Statistical analysis**

Mutagenicity data were analyzed with Salmonel software. A compound was considered positive for mutagenicity only when: (a) the number of revertants was at least double the spontaneous yield ( $\text{MI} \geq 2$ ; mutagenic index (MI): number of induced colonies in the sample/number of spontaneous in the negative control); (b) a significant response for analysis of variance ( $P \leq 0.05$ ) was found; and (c) a reproducible positive dose–response ( $P \leq 0.01$ ) was present, evaluated by the Salmonel software [33]. A cytotoxic effect was considered when  $\text{MI} \leq 0.6$ .

All experiments were independently repeated at least threefold, with triplicate samples for each treatment. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by test of Tukey.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### **3. RESULTS**

#### **3.1. *Salmonella*/microsome assay**

The DPDT dose range was determined in TA100 strain, with and without metabolization, where cytotoxicity was observed in concentrations higher than 20 $\mu$ g/mL (data not shown). The effect of DPDT on the frameshift mutation-detecting strains TA97a (detects frameshift mutation in -C-C-C-C-C-C-; +1 cytosine) and TA98 (detects frameshift in DNA target -C-G-C-G-C-G-C-G) indicates a clear mutagenic induction response in the absence and presence of metabolic activation, as shown in Table 2. No mutagenicity of DPDT was seen in both strains detecting base pair substitution in the absence of metabolic activation - TA100 (detect base pair substitution of a leucine [GAG] by proline [GGG]) and the corresponding isogenic strain TA1535 (harboring the plasmid pKM101 that enhances induced mutagenesis via an increase in the error-prone recombinational DNA repair pathway). However, in TA1535 a weak mutagenic response was detected at highest dose in presence of metabolic activation. Negative results for mutagenicity were also observed in TA102 (detects transversions/transitions in TAA DNA sequence), that detects oxidative and alkylating mutagens (Table 2).

#### **3.2. DPDT cytotoxicity and mutagenicity in strains of the yeast *S. cerevisiae***

DPDT induces a moderate dose-dependent cytotoxicity in stationary phase cultures of the wild type yeast *S. cerevisiae* XV185-14c haploid strain (Table 3). In respect to mutagenicity we can observe in Table 3 that the mutation frequency at the *his1* and *lys1* loci was significant for treatments employing higher concentrations of DPDT, while the mutation frequency at the *hom3* locus was significant at almost all doses. Moreover, this DPDT-induced mutagenesis was abolished when cells were pre-treated with N-ac (Table 3).

We also performed survival assays to compare the sensitivity among single, double, triple and quadruple mutants defective in base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), homologous recombination (HR), non-homologous end joining (NHEJ) and translesion synthesis (TLS), in order to evaluate the overlay of DNA repair pathways in response to the DPDT-induced DNA damage.

On the Fig. 2, we can see that the SJR751 WT had the same sensitivity to DPDT as the BY4742 WT, indicating that the genetic background of the wild type strains does not cause any difference in the sensitivity to DPDT. The single mutants *rad1Δ*, *rad6Δ* and *rev3Δ* (Fig. 2B) exhibited the same sensitivity observed to WT cells. In addition, the mutant strains *rad50Δ*, *xrs2Δ* and *mre11* also showed DPDT sensitivity as compared to the isogenic BY4741 WT strain (Fig. 2C). The recombination-deficient *rad52Δ* mutant showed the highest sensitivity to DPDT (Fig. 2C). Finally, the single BER mutants *ntg1Δ*, *ntg2Δ* and *ogg1Δ* had a significantly higher sensitivity to DPDT when compared to the WT, as we can observed on Fig. 2A. It is important to note that the double mutant *ntg1Δntg2Δ* is more sensitive than the single mutants.

Figure 2D shows that the triple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δ* is more sensitive than the single and double mutants. The quadruple mutants *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ* and *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ* show the same sensitivity to DPDT, which is equal to the response of the triple mutant. However, the mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* shows the same sensitivity as the single mutant *rad52Δ*.

### 3.3. Oxidative stress biomarkers in yeast

In order to determine the oxidative damage triggered by DPDT, we examined two well established oxidative stress biomarkers: the concentration-dependent degree of lipid peroxidation, measured by TBARS levels, and the GSH/GSSG ratio. As can be seen in Fig. 3A, the treatment of cells with DPDT resulted in a dose-dependent increase in TBARS production in wild type yeast. This increase was statistically significant after the incubation in doses higher than 10.0 μM for 2 h. Pre-incubation with N-ac prevented DPDT-generated oxidative damage at all exposure doses, reducing the levels of TBARS in yeast. In respect to intracellular glutathione content, treatments with 50, 100, 500, and 1000 μM for 2 h significantly reduced the GSH/GSSG ratio in *S. cerevisiae* (Fig. 3B)

### **3.4. Cytotoxic effects in V79 cells**

The dose- and time-dependent changes of cell viability in DPDT-treated cells were evaluated by plasma membrane damage assessed by monitoring of LDH leakage from exposed cells. The significant cytotoxic effects can be seen starting at concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  for the 6 h treatment and at 1  $\mu\text{M}$  after 2 h of exposure to DPDT when compared against the negative control (Table 4). Moreover, the viability of the cells treated with all concentrations employed decreased further with the increase of the concentration and incubation time. This finding suggests that DPDT is cytotoxic at concentration range of 0.5-50  $\mu\text{M}$ . Since our interest is focused in the genetic toxicity of the cells exposed to DPDT, we choose to perform all subsequent experiments using treatment of 2 h in function of the low cytotoxicity observed at this time point (until 25% approximately).

### **3.5. Oxidative stress biomarkers in V79 cells**

As can be seen on Fig. 4A, the treatment of cells with DPDT resulted in a dose-dependent increase in TBARS production in V79 cells at concentrations from 0.5  $\mu\text{M}$ . Pre-incubation with N-ac prevented DPDT-generated oxidative damage at all exposure doses, reducing the levels of TBARS. In addition, the 2h treatment at concentration range of 0,5-50  $\mu\text{M}$  significantly reduced the ratio GSH/GSSG in V79 cells (Fig. 4B).

### **3.6. DNA damage in V79 cells**

The Table 5 showed the effects of DPDT on DI and DF in V79 cells according to the comet assay, without and with metabolic activation. DPDT clearly induced a dose-response increase in the means of DI and DF in relation to the control group, both in the alkaline and neutral comet assay, in concentrations range of 1.0 - 50.0  $\mu\text{M}$ . The comet assay under alkaline conditions simultaneously detects DNA single and double strand breaks and alkali-labile sites, while the neutral conditions allow the detection of DNA double-strand breaks [27]. In this sense, we can infer therefore that DPDT induces DNA single strand breaks (SSBs) and double strand breaks (DSBs), in presence and absence of

metabolic activation (Table 5). The extent of DNA damage in cells exposed to these compounds was concentration dependent.

In order to determine the nature of the DPDT-induced DNA damage in V79 cells, we carried out the modified comet assay. While the alkaline version of the comet assay detects DNA single- and double-strand breaks, crosslinks and alkali-labile sites, the modified comet assay is more specific than the standard method. In this version, there is an incubation step of lysed cells with lesion-specific enzymes, which recognizes certain damaged bases, and the resultant abasic sites are converted in single-strand breaks [34, 35]. The enzyme Fpg is specific for oxidized purines, including 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, as well as other ring-opened purines and Endo III recognizes oxidized pyrimidines, including thymine glycol and uracyl glycol [36]. In this manner, DI increases in a dose-related manner after incubation with the lesion-specific enzymes and this increment represents the extension of oxidative DNA damage. The levels of Endo III- and Fpg-sensitive sites were calculated from the score obtained with the enzyme incubation minus the score without enzyme (incubated with the enzyme buffer only) and denominated oxidative damage score. It can be seen on Figure 5B and 5C that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment increases the extent of oxidative DNA damage recognized by Endo III and Fpg in V79 cells, indicating the presence of oxidized pyrimidines and oxidized purines, respectively, validating the experiment. The oxidative damage score in V79 cells treated with DPDT, without (Fig. 5B and 5C) and with metabolic activation (Fig. 6A and 6B) indicated the occurrence of oxidative DNA damage. Cyclophosphamide (CP) is an alkylating agent widely used as positive control in tests using metabolic activation [37]. The damage generated by CP is expected to be recognized only by Fpg, as few authors reported that Fpg is able to recognize and to remove alkylating damage as well [34]. We found a significant difference between the buffer level and incubation with Fpg after CP treatment (Fig. 6A).

Our results demonstrate that N-ac pre-treatment was able to decrease the DPDT-induced DNA damage in V79 cells (Fig. 5A). Moreover the extension of oxidative damage recognized by Fpg (Fig. 5B) and Endo III (Fig. 5C) decreases significantly, indicating that the pre-treatment with N-ac prevent the DPDT-induced oxidative DNA damage.

The treatment with DPDT decreased the percentage of binucleated V79 cells in a dose-response manner, reinforcing the cytotoxic effect of this molecule on cell

proliferation (Table 6). Furthermore, the exposure at concentration range of 0,5 to 50  $\mu\text{M}$  significantly increased the micronucleus frequency in relation to the untreated control (Fig. 7).

#### 4. DISCUSSION

In this study we evaluate the toxic and mutagenic properties of DPDT in bacteria, yeast and cultured mammalian cells. As expected, the cytotoxic threshold of DPDT shows different values in each biological model. In *Salmonella* TA100 strain, this OT molecule was cytotoxic at concentrations higher than 20  $\mu\text{M}$  (data not shown), while in *S.cerevisiae* these effects were observed starting at concentration of 100  $\mu\text{M}$  (Table 3). The toxicity of tellurium (as tellurite) was described previously in bacterial cells [1, 38], however, this is the first report about the effects of OT in yeast. Our results in mammalian cell culture shown in Table 4 indicate that this OT molecule exhibits cytotoxic effect in time- and dose-dependent manner in V79 cells. Moreover, the data of cell proliferation using the percentage of binucleated cells (BNC) in micronucleus assay also show the cytotoxic effect of DPDT (Table 6). These results are in agreement with Sailer et al. that reported cell death induction in promyelocytic HL-60 cell line at the same concentration range of DPDT [9]. It is known that the toxicity of OT may depend to a large degree on the relative solubility of these compounds and therefore attraction to the cell membranes [9]. In this manner, DPDT, highly hydrophobic, is one of the most toxic among the simple organotellurides. Engman et al. investigated the cytotoxic potential of water soluble OT compounds diaryl ditelluride, alkyl aryl telluride and dialkyl telluride and they found that these molecules inhibited the growth of MCF-7 and HT-29 human cancer cells in culture at concentration range of 5-10  $\mu\text{M}$ , but their hydrophilicity seemed to restrict cellular uptake [39]. The cytotoxicity of some other tellurium containing compounds was reported recently and their employment in the anti-proliferative therapy was suggested [40-42].

In contrast to selenium, no biological function has been described for tellurium, which probably is related to its superior reactivity when compared to selenium. Indeed, tellurium has a similar electronic configuration to selenium and, consequently, it shares some chemical properties with selenium [43]. Organometalloids containing tellurium or selenium may have the ability to disturb the redox homeostasis in cells at physiological pH

reducing the oxygen to various reactive oxygen species (ROS) [44, 45]. In order to investigate this hypothesis, we measured the extension of lipid peroxidation in yeast and mammalian DPDT-treated cells. The occurrence of an increase in TBARS levels, shown in Fig. 3A and 4A, suggests that ROS play an important role in DPDT cytotoxicity in *S. cerevisiae* and V79 cells. In accordance with this, Borges et al. observed that the repeated administrations of DPDT induced lipid peroxidation in liver and kidney of rats [46]. Moreover, DPDT treatment of female rats during the lactation period caused elevated levels of lipid peroxidation in several cerebral structures in the progeny through passage by maternal milk [47].

The present study also evidenced that in presence of DPDT, the oxidation of GSH increase markedly in *S. cerevisiae* and V79 cells in a dose-dependent manner (Fig. 3B and 4B) therefore, strongly suggesting that DPDT can react with biological thiols. The GSH depletion represents a decrease of the non-enzymatic antioxidant defense, which can lead to oxidative stress and consequently to induction of oxidative lesions, cell injury and loss of viability [48]. If GSH is involved in the effects of DPDT, a pre-treatment with the compounds that stimulate an increase in cellular GSH can lower or even abolish this effect. N-ac is an antioxidant molecule that acts primarily by two mechanisms: (i) promoting GSH synthesis, as it is readily deacetylated in cells to yield L-cysteine, and (ii) as a ROS scavenger, reacting (GSH-like) with various types of ROS, including hydroxyl radicals [49]. In agreement with this, our results show that DPDT genotoxicity in V79 cells (Fig. 5A) and mutagenicity in yeast (Table 3) can be prevented by N-ac pre-treatment, thereby maintaining (not decreasing) cellular reduced GSH levels. This finding is consistent with the several reports about selenium and tellurium interaction with biological thiols, including our previous results about the toxic effects of diphenyl diselenide in yeast, V79 cells and in mice organs [50-53].

In this context, DPDT inhibits  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase in several tissues and organs of rats and in human erythrocytes, as well as voltage-dependent calcium channel and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in mouse brain [54, 55]. The enzyme activity can be restored and protected by GSH and DTT treatment, indicating that this organochalcogen interacts with the sulfhydryl groups essential for the enzyme activity. DPDT also disturbs the calcium influx in hippocampal brain slices *in vitro* and the glutamatergic neurotransmission in

several models [12, 56, 57]. These effects were attributed, at least in part, to modulation of the cellular redox status affecting proteins containing thiol moieties.

In order to increase the knowledge about the toxicity of DPDT, an investigation of its genotoxic profile was performed. We observed frameshift mutation induction in the *Salmonella*/microsome assay in TA97a and TA98 strains (Table 2), which suggests that DPDT cytotoxicity may be linked to its ability to intercalate into DNA in addition to the oxidant effect. Interestingly, negative result for mutagenesis was obtained in *S. typhimurium* TA102, a strain that has a proven ability to detect mutagens that generate ROS and cause oxidative DNA damage [19]. Similarly, diphenyl diselenide showed the same behavior as DPDT in the Ames test [53].

In the present work, we also showed that DPDT treatment clearly induces frameshift mutation in yeast (Table 3). In order to gain insight into these mechanisms, we studied the response of *S. cerevisiae* mutants defective in DNA repair to treatment with this OT. Results of survival assays demonstrated that DPDT leads to a pronounced sensitivity of *apn1* $\Delta$ , *ntg1* $\Delta$  and *ntg2* $\Delta$  single mutants (Fig. 2A). Apn1, Ntg1 and Ntg2 are important proteins of BER: Apn1p is the major AP endonuclease in *S. cerevisiae* and Ntg1p and Ntg2p are DNA glycosylases and AP lyases that recognize and remove oxidized purines and pyrimidines. The generated by glycosylase activity AP sites can be removed by the lyase activity of the enzyme or by endonuclease Apn1p [58]. In the absence of these proteins, there is an accumulation of AP sites generated after removing the damaged base, which are potentially mutagenic and lethal lesions that can block DNA replication and transcription [58, 59]. Restart of stalled forks can occur through a recombination-associated pathway or mutagenic translesion DNA synthesis (TLS). The fact that *ntg1* $\Delta*ntg2* $\Delta$  and *ntg1* $\Delta*ntg2* $\Delta*apn1* $\Delta$  mutants were sensitive to DPDT (Fig. 2D) may indicate that both Ntg1 and Ntg2 proteins are important DNA in the repair of the DPDT-induced lesions. In agreement with this, *ogg1* $\Delta$  single mutant showed a sensitivity to DPDT, since OGG1 gene encodes a DNA glycosylase with associated lyase activity that excises 8-hydroxyguanine (8-oxoG) and oxidized formamidopyrimidines (FapyG) [59].$$$

The *rad1* $\Delta$  (deficient in DNA endonuclease subunit of nucleotide excision repair factor 1 that cleaves single stranded DNA during NER and DSB repair), *rad6* $\Delta$  (ubiquitin-conjugating enzyme (E2), involved in TLS) [60] and *rev3* $\Delta$  (deficient in catalytic subunit of DNA polymerase zeta, which is involved in DNA repair and TLS [61]) did not present

sensitivity for DPDT (Fig. 2B). These data suggest that NER and TLS pathways alone are not decisive in repairing DPDT-induced DNA damage. Reinforcing, our data showed that the quadruple mutants involving BER and NER, *ntg1Δntg2Δapn1Δrad1Δ*, as well as BER and TLS, *ntg1Δntg2Δapn1Δrev3Δ* show sensitivity similar to *ntg1Δntg2Δapn1Δ* triple mutant after treatment with DPDT (Fig. 2D). The hypersensitivity of the *rad52Δ* mutant strain to DPDT (Fig. 2C), suggests that recombinational repair is critical for the processing of potentially lethal genetic lesions and/or the rescue of collapsed replication forks resulting from DPDT-induced DNA damage. In addition, after treatment with DPDT, the quadruple mutant *ntg1Δntg2Δapn1Δrad52Δ* showed highest sensitivity (Fig. 2D), indicating that both BER and HR pathways are important for the repair of DPDT-induced lesions. Thus, BER pathway could initiate the repair, recognizing and removing the damaged DNA base by Apn1, Ntg1 and Ntg2 proteins, leading to strand-breaks formation. These repair intermediates could stall the replication forks, resulting in DSBs that are substrate for the HR repair pathway. If not repaired, the DSBs lead to chromosomal breakage and rearrangements, which in mammalian cells lead to chromosomal aberrations and micronucleus formation, as observed in our experiment (Fig. 7), and can trigger cell death [62,63]. Moreover, we observed enhanced sensitivity in strains deficient in subunits of MRX complex (Fig. 2C) that processes DSBs in the NHEJ pathway in an error prone manner and could participate in the mutagenesis observed after DPDT treatment [63].

In V79 cells, DPDT treatment induced DNA damage, detected by neutral and alkaline comet assay. We found that DNA DSBs, as detected by neutral comet assay, were significantly higher in V79 cells following exposure to this substance (Table 5). The DNA damage in V79 observed after DPDT exposure could be a result of free radical attack to DNA as a consequence of its ability to impose oxidative stress, since ROS may cause base damage, SSBs, DSBs, and mutation [44, 64]. In fact, the results of modified comet assay employing Endo III and Fpg enzymes reinforce the oxidative nature of the DNA damage in DPDT-exposed cells. In addition, as N-ac pretreatment was able to prevent DPDT-induced oxidative DNA damage (Fig. 5B and 5C), DNA strand breaks can be attributed to the indirect action by decreasing of GSH levels, which propitiate a pro-oxidant cellular status. In addition, the DSBs observed after DPDT treatment can indicate the ability of this compound to intercalate into DNA and/or affect the topoisomerase activity. In agreement, DPDT treatment induced a time-dependent increase in the number of apoptotic cells from

the S and G2+M portions of the cell cycle in HL-60 cells, whereas, no cell cycle specificity of the apoptosis induction was noted for the two other OT compounds, 3,3'-diaminodiphenyl ditelluride and 4,4'-diisopropylidiphenyl ditelluride [9]. This suggests that DPDT interferes either with DNA replication or with cell division processes. The proposed ability of DPDT to intercalate into DNA is also consistent with our data demonstrating frameshift mutation induction in bacteria and yeast.

Although the cytotoxicity and systemic toxicity of tellurium and OT in mammals have been reported the genotoxic properties of these compounds are still unclear. In agreement with our data about the genotoxicity of DPDT, diaminophenyl telluride and dihydroxyphenyl telluride at 30  $\mu$ M are able to induce DNA breakage in trout erythrocytes evaluated by comet assay [65]. Sodium tellurite induces oxidative stress, which leads to DNA breakage and increases the micronucleus frequency in human lymphocytes [66]. It is important to mention that the mutagenic potential of DPDT can be the reason of its reproductive toxicity described for this OT in rodents [14, 15].

Several observations suggest that organotellurides are more reactive than the structurally related organoselenium compounds, essentially due to their higher electronegativity in relation to carbon, which is associated with a larger atomic volume [43]. This enhanced reactivity is evidenced in our study, where DPDT was cytotoxic, genotoxic and mutagenic in V79 cells at concentration range lower than that of diphenyl diselenide evaluated in the same experimental conditions [51].

In summary, the cellular effects of DPDT appear to be very complex and linked to its ability to disturb the cellular redox homeostasis, which leads to DNA damage, and cell death. Moreover, N-ac pre-treatment can prevent the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of this OT compound, preventing the intracellular GSH depletion. In addition, the DPDT induced frameshift mutations in *S. typhimurium* and *S. cerevisiae* and the results obtained from neutral comet assay in V79 cells suggest that this molecule can intercalate into DNA and generate DSBs.

## **5. ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and GENOTOX-Genotoxicity Laboratory – Royal Institute, T.H.

## 6. REFERENCES

- [1] T.G. Chasteen, D.E. Fuentes, J.C. Tantaleán, C.C. Vásquez, Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance, *FEMS Microbiol. Rev.* (2009) 1-13
- [2] G.P. Bienert, M.D. Schüssler, T.P. Jahn, Metalloids: essential, beneficial or toxic? Major intrinsic proteins sort it out. *Trends Biochem. Sci.* 33 (2008) 20-26.
- [3] P. Morell, A.D. Toews, Schwann cells as targets for neurotoxicants, *Neurotoxicology* 17 (1996) 685-695.
- [4] J.F. Goodrum, Role of organotellurium species in tellurium neuropathy, *Neurochem. Res.* 23 (1998)1313-1319.
- [5] A.D. Toews, C.E. Eckermann, M.D. Roberson, S.Y. Lee, P. Morell, Primary demyelination induced by exposure to tellurium alters mRNA levels for nerve growth factor receptor, SCIP, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, and myelin proteolipid protein in rat sciatic nerve, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 11(1991) 321-325.
- [6] E.C. Stangherlin, J.B. Rocha, C.W. Nogueira, Diphenyl ditelluride impairs short term memory and alters neurochemical parameters in young rats, *Pharmacol. Biochem. Beha.* 91 (2009) 430-435.
- [7] C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B. Rocha, Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 6255-6285.
- [8] M. Friedman, I. Bayer, I. Letko, R. Duvdevani, O. Zavarov-Levy, B. Ron, M. Albeck, B. Sredni, 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 (2009) 403-408.
- [9] B.L. Sailer, N. Liles, S. Dickerson, T.G. Chasteen, Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line, *Arch. Toxicol.* 77 (2003) 30-36.
- [10] C.W. Nogueira, L.N. Rotta, M.L. Perry, D.O. Souza, J.B. Rocha, Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system *in vitro* and *in vivo*, *Brain Res.* 906 (2001)157-163.
- [11] V.C. Borges, J.B. Rocha, C.W. Nogueira, Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats, *Toxicology* 215 (2005) 191-197.
- [12] M.B. Moretto, B. Boff, J. Franco, T. Posser, T.M. Roessler, D.O. Souza, C.W. Nogueira, S. Wofchuk, J.B. Rocha, (45)Ca(2+) influx in rat brain: effect of diorganylchalcogenides compounds, *Toxicol. Sci.* 99 (2007) 566-571.

- [13] E.C. Stangherlin, A.M. Favero, G. Zeni, J.B. Rocha, C.W. Nogueira, Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride, *Toxicology* 207 (2005) 231-239.
- [14] S.S. Roman, A. Nava, A.M. Favero, S.N. Weis, G. Zeni, J.B. Rocha, C.W. Nogueira, Diphenyl ditelluride effect on embryo/fetal development in mice: interspecies differences, *Toxicology* 231 (2007) 243-249.
- [15] E.N. Maciel, R.C. Bolzan, A.L. Braga, J.B. Rocha, Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, and brain of mice, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14 (2000) 310-319.
- [16] V.P. Schiar, D.B. Dos Santos, M.W. Paixão, C.W. Nogueira, J.B. Rocha, G. Zeni, 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 (2009) 28-33.
- [17] W. Hassan, M. Ibrahim, C.W. Nogueira, A.L. Braga, A.M. Deobald, I.U. Mohammadzai, J.B. Rocha, Influence of pH on the reactivity of diphenyl ditelluride with thiols and anti-oxidant potential in rat brain, *Chem. Biol. Interact.* (2008) In press
- [18] A.L. Braga, C.C. Silveira, A. Reckziegel, P.H. Menezes, Convenient preparation of alkynyl selenides, sulfides and tellurides from terminal alkynes and phenylchalcogenyl halides in the presence of copper (I) iodide, *Tetrahedron Lett.* 34 (1993) 8041-8042.
- [19] K. Mortelmans, E. Zeiger, The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.* 455 (2000) 29-60.
- [20] D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.* 113 (1983) 173-215.
- [21] D. Burke, D. Dawson, T. Stearns, *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual, CSH Laboratory Press (2000).
- [22] R.C. Von Borstel, K.T. Cain, C.M. Steinberg, Inheritance of spontaneous mutability in yeast, *Genetics* 69 (1971) 17-27.
- [23] M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [24] M.G. Salgo, W.A. Pryor, Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* 15 (1996) 482-488.
- [25] T. Akerboom, H. Sies, Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples, *Meth. Enzymol.* 77 (1981) 373-382.
- [26] F. Wroblewski, J. Ladue, Lactic dehydrogenase activity in blood, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90 (1955) 210-213.

- [27] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Scheider. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp.Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [28] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, R. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [29] B. Burlinson, R.R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S.Y. Brendler-Schwaab, A.R. Collins, P. Escobar, M. Honma, T.S. Kumaravel, M. Nakajima, Y.F. Sasaki, V. Thybaud, Y. Uno, M. Vasquez, A. Hartmann, in: *Proceedings of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: Results of the In Vivo Comet Assay Workgroup*, vol. 627, *Mutat. Res.* (2007) 31–35.
- [30] Ku WW, Bigger A, Brambilla G, Glatt H, Gocke E, Guzzie PJ, Hakura A, Honma M, Martus HJ, Obach RS, Roberts S & Strategy Expert Group, IWGT, Strategy for genotoxicity testing--metabolic considerations. *Mutat. Res.* 627(2007) 59-77.
- [31] D. Bonacker, T. Stoiber, M. Wang, K.J. Bohm, I. Prots, E. Unger, R. Their, H.M. Bolt, G.H. Degen, Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function, *Arch. Toxicol.* 78 (2004) 575–583.
- [32] M. Fenech, The *in vitro* micronucleus technique, *Mutat. Res.* 455 (2000) 81–95.
- [33] L. Myers, N. Adams, L. Kier, T.K. Rao, B. Shaw, L. Williams, Microcomputer software for data management and statistical analysis of the Ames/*Salmonella* test, in: D. Krewski, C.A. Franklin (Eds.), *Statistics in Toxicology*, Gordon and Breach, New York, 1991, pp. 265–279.
- [34] G. Speit, P. Schutz, I. Bonzheim, K. Trenz, H. Hoffmann, Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay, *Toxicol. Lett.* 146 (2004) 151-158.
- [35] L.F. da Costa Medina, C.M. Viau, D.J. Moura, J. Saffi, V. Stefani, A. Brandelli, J.A. Henriques, Genotoxicity of aminohydroxynaphthoquinones in bacteria, yeast, and Chinese hamster lung fibroblast cells, *Mutat. Res.* 650 (2008) 140-149.
- [36] M. Dizdaroglu, Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases, *Mutat. Res.* 591 (2005) 45-59.
- [37] M. Otto, S.H. Hansen, L. Dalgaard, J. Dubois, L. Badolo, Development of an *in vitro* assay for the investigation of metabolism-induced drug hepatotoxicity, *Cell Biol. Toxicol.* 24 (2008) 87–99.
- [38] M.M. Gharieb, G.M. Gadd, Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal(loid) tolerance: vacuolar-lacking and -defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite, *Biometals* 2 (1998) 101-106.

- [39] B.L. Sailer, N. Liles, S. Dickerson, S. Sumners, T.G. Chasteen, Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog, *Toxicol. In Vitro* 18 (2004) 475-482.
- [40] L. Engman, T. Kandra, A. Gallegos, R. Williams, G. Powis, Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells, *Anticancer Drug Des.* 15(2000) 323-330.
- [41] G.M. Frei, I. Leberthal, M. Albeck, A. Albeck, B. Sredni, Neutral and positively charged thiols synergize the effect of the immunomodulator AS101 as a growth inhibitor of Jurkat cells, by increasing its uptake, *Biochem. Pharmacol.* 74 (2007) 712-722.
- [42] M. McNaughton, L. Engman, A. Birmingham, G. Powis, I.A. Cotgreave, Cyclodextrin-derived diorganyl tellurides as glutathione peroxidase mimics and inhibitors of thioredoxin reductase and cancer cell growth, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 233-239.
- [43] J.V. Comasseto, L.W. Ling, N. Petragani, H.A. Stefani, Vinylid selenides and tellurides-preparation, reactivity and synthetic applications, *Synthesis* 4 (1997) 373-403.
- [44] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact* 160 (2006) 1-40.
- [45] L.O. Klotz, K.D. Kröncke, D.P. Buchczyk, H. Sies, Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress, *J. Nutr.* 133(2003) 1448S-1451S.
- [46] V.C. Borges, J.B. Rocha, L. Savegnago, C.W. Nogueira, Repeated administration of diphenyl ditelluride induces hematological disorders in rats, *Food Chem Toxicol* 45 (2007)1453-1458.
- [47] E.C. Stangherlin, A.P. Ardais, J.B. Rocha, C.W. Nogueira, Exposure to diphenyl ditelluride, via maternal milk, causes oxidative stress in cerebral cortex, hippocampus and striatum of young rats, *Arch. Toxicol.* (2008) In press
- [48] M. Zafarullah, W.Q. Li, J. Sylvester, M. Ahmad, Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 6-20.
- [49] J.M. Estrela, A. Ortega, E. Obrador, Glutathione in cancer biology and therapy, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 43 (2006) 143-181.
- [50] R. Moreira Rosa, R.B. de Oliveira, J. Saffi, A.L. Braga, R. Roesler, F. Dal-Pizzol, J.C. Fonseca Moreira, M. Brendel, J.A. Pegas Henriques, Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions, *Life Sci.* 77 (2005) 2398-2411.

- [51] R.M. Rosa, J.D. Picada, J. Saffi, J.A. Henriques, Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts, *Mutat. Res.* 628 (2007) 87-98.
- [52] R.M. Rosa, N.C. Hoch, Furtado GV, Saffi J, Henriques JA, DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide, *Mutat. Res.* 633(2007) 35-45.
- [53] R.M. Rosa, K. Sulzbacher, J.N. Picada, R. Roesler, J. Saffi, M. Brendel, J.A. Henriques, Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast, *Mutat. Res.* 563(2004):107-15.
- [54] N.B. Barbosa, J.B. Rocha, G. Zeni, T. Emanuelli, M.C. Beque, A.L. Braga, Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149(1998) 243-253.
- [55] C.W. Nogueira, V.C. Borges, G. Zeni, J.B. Rocha, Organochalcogens effects on delta-aminolevulinate dehydratase activity from human erythrocytic cells *in vitro*, *Toxicology* 191(2003) 169-178.
- [56] M.B. Moretto, A.P. Thomazi, G. Godinho, T.M. Roessler, C.W. Nogueira, D.O. Souza, S. Wofchuk, J.B. Rocha, Ebselen and diorganylchalcogenides decrease *in vitro* glutamate uptake by rat brain slices: prevention by DTT and GSH, *Toxicol. In Vitro* 21 (2007) 639-645.
- [57] V.C. Borges, C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B. Rocha, Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets, *Neurochem. Res.* 29 (2004) 1505-1509.
- [58] K.L. Meadows, B. Song, P.W. Doetsch, Characterization of AP lyase activities of *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: implications for biological function, *Nucleic Acids. Res.* 31 (2003) 5560-5567.
- [59] S. Boiteux, M. Guillet, Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*, *DNA Repair* 3 (2004) 1-12.
- [60] S. Prakash, L. Prakash, Nucleotide excision repair in yeast, *Mutat. Res.* 451 (2000) 13-24.
- [61] G.N. Gan, J.P. Wittschieben, B.O. Wittschieben, R.D. Wood, DNA polymerase zeta in higher eukaryotes, *Cell Res.* 18 (2008) 174-183.
- [62] Z. Yang, A.S. Waldmann, M.D. Wyatt, DNA damage and homologous recombination signaling induced by thymidylate deprivation, *Biochem Pharmacol.* 76 (2008) 987-996.
- [63] E. Pastwa, J. Blasiak, Non-homologous DNA end joining, *Acta Biochim. Polonica* 50 (2003) 891-908.

[64] S.S. David, V.L. O'Shea, S. Kundu, Base-excision repair of oxidative DNA damage, *Nature* 447(2007) 941-950.

[65] L. Tiano, D. Fedeli, A.M. Santroni, M. Villarini, L. Engman, G. Falcioni, Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress *in vitro*, *Mutat. Res.* 464 (2000) 269-277.

[66] L. Migliore, L. Cocchi, C. Nesti, E. Sabbioni, Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts, *Environ. Mol. Mutagen.* 34 (1999) 279–284.

Table 1: Yeast strains used in this study

Strains	Relevant genotypes	DNA repair pathway affected	Source
BY4742 (WT)	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i>	-	Euroscarf
<i>apn1Δ</i>	BY4742; with <i>apn1::kanMX4</i>	BER	Euroscarf
<i>rad1Δ</i>	BY4742; with <i>rad1::kanMX4</i>	NER	Euroscarf
<i>rad52Δ</i>	BY4742; with <i>rad52::kanMX4</i>	HR	Euroscarf
<i>rev3Δ</i>	BY4742; with <i>rev3::kanMX4</i>	TLS	Euroscarf
<i>ogglΔ</i>	BY4742; with <i>oggl::kanMX4</i>	BER	Euroscarf
BY4741 (WT)	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	-	Euroscarf
<i>rad50Δ</i>	BY4742; with <i>rad50::kanMX4</i>	NHEJ	Euroscarf
<i>mre11Δ</i>	BY4742; with <i>mre11::kanMX4</i>	NHEJ	Euroscarf
<i>xrs2Δ</i>	BY4742; with <i>xrs2::kanMX4</i>	NHEJ	Euroscarf
SJR751 (WT)	<i>MATα; ade2-101<sub>oc</sub>; his3Δ200; ura3ΔNco; lys2ΔBgl; leu2-R</i>	-	RL Swanson*
<i>ntg1Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2</i>	BER	RL Swanson*
<i>ntg2Δ</i>	SJR751; with <i>ntg2::hisG</i>	BER	RL Swanson*
<i>ntg1Δ ntg2Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG</i>	BER	RL Swanson*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3</i>	BER	RL Swanson*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad1Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3 rad1::hisG</i>	BER/NER	RL Swanson*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rev3Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3 rev3::kanMX4</i>	BER/TLS	RL Swanson*
<i>ntg1Δ ntg2Δ apn1Δ rad52Δ</i>	SJR751; with <i>ntg1::LEU2 ntg2::hisG apn1::HIS3 rad52::URA3</i>	BER/HR	RL Swanson*
XV185-14C	<i>MATα; ade2-2; arg4-17; his1-7; lys1-1; trp5-48; hom3-10</i>	-	<b>R.C Von Borstel</b>

\* Swanson *et al.* (1999)

Table 2. Induction of *his+* revertants in *S. typhimurium* strains by DPDT with and without metabolic activation (S9 mix)

Substance	Concentration (µg/plate)	<i>S. typhimurium</i> strains									
		TA98		TA97a		TA100		TA1535		TA102	
		Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>
Without metabolic activation (-S9)											
NC <sup>c</sup>	-	10.67±1.53	-	110.00±33.81	-	125.33±10.07	-	10.00±1.00	-	396.00±10.58	-
PC <sup>d</sup>	0.5	68.00±9.00***	6.37	410±23.06**	3.72	1101.33±180.0**	8.78	1757.66±56.5**	175.76	2910±300**	9.38
DPDT	4	21.33±3.21*	2.00	578.67±88.57**	5.26	107.33±44.60	0.85	12.67±2.31	1.26	466.67±60.18	1.18
	8	39.67±7.51**	3.72	585.33±58.29**	5.32	96.00±14.00	0.76	6.33±1.53	0.63	488.00±66.09	1.23
	12	29.67±3.21*	2.78	626.00±19.70**	5.69	112.67±14.05	0.90	12.33±3.06	1.23	462.67±20.13	1.18
	16	45.00±5.65**	4.22	728.00±39.40***	6.60	97.33±15.01	0.77	10.00±2.00	1.00	425.33±22.03	1.07
	20	40.33±9.29**	3.78	737.33±44.06***	6.70	52.00±16.37	0.41	10.00±2.83	1.00	526.67±20.13	1.33
With metabolic activation (+S9)											
NC <sup>c</sup>	-	27.33±1.53	-	141.33±16.65	-	171.67±15.05	-	8.67±3.06	-	389.33±57.46	-
PC <sup>d</sup>	0.5	58.00±8.71*	2.12	585.66±129.3**	4.14	1034.0±173.7***	6.02	107.66±4.04***	12.41	1382.66±11.54**	3.55
DPDT	4	34.33±2.52	1.25	426.67±62.14**	3.02	172.67±35.12	1.01	13.00±3.00	1.49	404.67±92.92	1.04
	8	45.00±9.00	1.64	530.67±79.43**	3.75	168.00±14.00	0.98	22.67±9.61	2.61	536.00±54.11	1.37
	12	46.67±6.11	1.71	530.67±18.48**	3.75	156.00±26.23	0.91	19.67±8.33	2.26	497.33±54.60	1.27
	16	57.50±6.36*	2.10	623.67±113.5**	4.41	143.33±30.62	0.83	21.67±3.79	2.49	524.67±84.72	1.34
	20	50.00±3.61	1.82	624.00±77.87***	4.41	204.00±39.04	1.19	32.00±3.61**	<b>3.67</b>	542.67±83.27	1.34

<sup>a</sup>Number of revertants/plate: mean of three independent experiments ± SD; <sup>b</sup>MI: mutagenic index (n°. of *his+* induced in the sample/n°. of spontaneous *his+* in the negative control); <sup>c</sup>PC: positive control (-S9) sodium azide to TA100 and TA1535; 4-NQO to TA97a, TA98 and TA102; (+S9) aflatoxin B1; <sup>d</sup>NC: negative control dimethyl sulfoxide (25 µl) used as a solvent for DPDT. \*Data significant in relation to DPDT treatments as compared to the negative control  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$

Table 3. Induction of point mutation (*his1-7*) ochre allele (*lys1-1*) and frameshift (*hom3-10*) mutation in haploid XV185-14c strain of *S. cerevisiae* after DPDT treatment during stationary phase without and with N-ac pre-treatment

Agent	Treatment ( $\mu\text{M}$ )	Survival (%)	HIS/ $10^7$ survivors <sup>a</sup>	LIS/ $10^7$ survivors <sup>b</sup>	HOM/ $10^7$ survivors <sup>a</sup>
NC <sup>c</sup>		100 (134)	9,75 $\pm$ 0,96	3,77 $\pm$ 0,96	2,78 $\pm$ 0,96
PC <sup>d</sup>		53,27 $\pm$ 1,97 (65)**	127,28 $\pm$ 6,34***	47,77 $\pm$ 4,99***	31,54 $\pm$ 2,65***
DTDF	1	97,21 $\pm$ 1,60 (128)	10,51 $\pm$ 1,29	4,21 $\pm$ 0,95	3,26 $\pm$ 1,26
	5	84,11 $\pm$ 1,56 (115)	11,02 $\pm$ 1,83	4,52 $\pm$ 1,29	8,51 $\pm$ 1,29*
	10	78,69 $\pm$ 3,92 (107)	12,01 $\pm$ 2,16	5,75 $\pm$ 1,50	14,22 $\pm$ 1,70***
	50	71,02 $\pm$ 2,66 (99)	13,75 $\pm$ 1,26	7,23 $\pm$ 1,71	18,53 $\pm$ 1,29***
	100	65,43 $\pm$ 4,82 (88)*	16,50 $\pm$ 1,29*	9,22 $\pm$ 0,96*	24,51 $\pm$ 1,27***
	500	53,81 $\pm$ 2,66 (76)**	20,50 $\pm$ 1,29***	11,74 $\pm$ 0,95*	28,25 $\pm$ 1,28***
	1000	45,73 $\pm$ 4,83 (61)**	25,76 $\pm$ 1,71***	15,25 $\pm$ 0,50***	32,26 $\pm$ 2,22***
	N-ac pre-treatment				
NC <sup>c</sup>		100 (133)	9,01 $\pm$ 0,82	3,25 $\pm$ 0,95	2,77 $\pm$ 0,48
PC <sup>d</sup>		61,52 $\pm$ 2,67 (71)**	72,75 $\pm$ 3,40	20,75 $\pm$ 2,98	19,76 $\pm$ 3,31
DTDF	1	95,17 $\pm$ 1,61 (125)	9,21 $\pm$ 1,25	3,53 $\pm$ 0,98	3,28 $\pm$ 0,57
	5	92,61 $\pm$ 1,65 (121)	9,50 $\pm$ 2,08	4,27 $\pm$ 0,93	3,27 $\pm$ 0,55
	10	91,04 $\pm$ 1,61 (119)	10,02 $\pm$ 0,81	4,58 $\pm$ 0,58	3,79 $\pm$ 0,58
	50	88,02 $\pm$ 2,05 (115)	10,50 $\pm$ 1,03	4,76 $\pm$ 0,52	4,27 $\pm$ 0,97
	100	83,63 $\pm$ 1,82 (108)	11,27 $\pm$ 0,95	5,23 $\pm$ 0,99	4,76 $\pm$ 0,99
	500	77,12 $\pm$ 2,31 (96)	11,74 $\pm$ 0,52	5,79 $\pm$ 1,56	5,24 $\pm$ 0,54
	1000	62,78 $\pm$ 3,23 (83)*	12,23 $\pm$ 0,53	6,53 $\pm$ 1,73	5,53 $\pm$ 1,31

<sup>a</sup> Locus-specific revertants; <sup>b</sup> Locus non-specific revertants (forward mutation); <sup>c</sup> Negative control; <sup>d</sup> Positive control: 4-NQO treatment at 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; <sup>e</sup> Numbers of colonies; <sup>f</sup> Mean and standard deviation from three independent experiments; \*Data significant in relation to the positive control group at  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ / One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

Table 4. Effects of DPDT on LDH leakage (% of total) in V79 cells

	Control <sup>a</sup>	0.1 $\mu$ M DPDT	0.5 $\mu$ M DPDT	1.0 $\mu$ M DPDT	5.0 $\mu$ M DPDT	10.0 $\mu$ M DPDT	50.0 $\mu$ M DPDT
0 h	11.8 $\pm$ 0.6	12.3 $\pm$ 2.2	12.1 $\pm$ 1.0	11.6 $\pm$ 2.3	12.4 $\pm$ 1.7	14.2 $\pm$ 6.2	18.6 $\pm$ 2.3
2 h	15.1 $\pm$ 1.3	16.2 $\pm$ 1.9	17.3 $\pm$ 2.1	19.4 $\pm$ 0.9*	20.5 $\pm$ 1.5*	22.3 $\pm$ 1.4*	28.1 $\pm$ 2.0**
4 h	14.5 $\pm$ 0.5	18.0 $\pm$ 2.0	20.2 $\pm$ 1.7*	22.7 $\pm$ 0.6*	26.4 $\pm$ 1.0**	30.5 $\pm$ 1.9**	41.3 $\pm$ 1.7***
6 h	14.9 $\pm$ 0.7	19.8 $\pm$ 0.3*	21.9 $\pm$ 1.3*	25.9 $\pm$ 1.7*	29.9 $\pm$ 3.0**	36.8 $\pm$ 2.1**	52.1 $\pm$ 3.2***
8 h	15.4 $\pm$ 1.6	22.0 $\pm$ 2.4*	27.0 $\pm$ 3.3**	35.5 $\pm$ 1.8***	42.0 $\pm$ 2.6***	50.4 $\pm$ 1.5***	64.3 $\pm$ 5.1***
12 h	17.6 $\pm$ 2.6	30.2 $\pm$ 4.4**	37.7 $\pm$ 4.3***	48.2 $\pm$ 2.5***	56.5 $\pm$ 5.8***	69.5 $\pm$ 2.7***	83.3 $\pm$ 2.3***
24 h	21.4 $\pm$ 2.4	44.6 $\pm$ 6.7***	58.6 $\pm$ 4.9***	68.8 $\pm$ 4.2***	84.7 $\pm$ 5.6***	87.6 $\pm$ 6.2***	96.7 $\pm$ 3.2***

<sup>a</sup> Negative control (solvent); Data are expressed as mean  $\pm$  SD, n= 12. \*Data significant in relation to the control group  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*  $P<0.001$ /One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

Table 5. Genotoxicity induced by 2 h DPDT treatment in V79 cells evaluated by neutral and alkaline comet assay without and with metabolic activation.

Agent	Treatment ( $\mu\text{M}$ )	Damage Index <sup>c</sup>		Damage frequency (%) <sup>c</sup>	
		Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix
Alkaline condition (pH~13.0)					
NC <sup>a</sup>		25.3±3.9	29.8±11.9	20.0±4.7	21.2±3.5
PC <sup>b</sup>		117.5±6.8**	217.0±8.3***	75.0±1.2**	88.3±2.3**
DPDT	0.1	37.8±7.8	52.5±10.2	31.3±4.5	38.5±5.6
	0.5	56.3±4.2	60.8±11.9	44.2±2.2	51.6±6.1
	1.0	99.3±7.3**	129.0±14.1***	55.3±3.3*	68.3±2.5*
	5.0	127.3±9.5**	169.5±14.6***	66.8±2.7**	78.4±1.9**
	10.0	170.5±10.5**	217.5±8.6***	75.7±3.5**	86.3±2.7**
	50.0	248.3±8.0**	292.5±14.0***	93.2±2.9**	96.2±1.6**
Neutral conditions (pH~8.0)					
NC <sup>a</sup>		19.8±4.8	24.3±5.9	18.5±5.1	22.0±4.7
PC <sup>b</sup>		102.3±5.9**	224.5±22.2***	50.8±3.9**	82.1±2.8**
DPDT	0.1	24.5±7.2	31.8±6.3	35.0±8.3	37.9±3.6
	0.5	27.5±6.8	38.0±4.6	40.5±1.7	44.2±2.2
	1.0	52.3±11.6**	79.3±9.3**	46.8±5.9*	52.1±3.9*
	5.0	66.5±16.4**	87.3±11.6**	50.7±3.3**	59.2±3.5**
	10.0	79.0±14.5**	105.3±7.3**	56.0±2.4**	63.6±1.3**
	50.0	108.8±15.5**	149.5±14.3***	64.3±2.5**	73.9±2.4**

<sup>a</sup> Negative control (solvent); <sup>b</sup>Positive control: MMS treatment at  $4 \times 10^{-5}$  M in absence of metabolization, and  $1.5 \times 10^{-5}$  M CP in presence of metabolization; <sup>c</sup> mean values and standard deviation obtained from average of 100 cells per experiment – total of four experiments per dose for each substance; \*data significant in relation to DPDT treatments as compared to the negative control  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ /One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

Table 6. Effect of DPDT treatment on the cell proliferation measured as percentage of binucleated cells in micronucleus assay.

DPDT	% Binucleated cells (BNC)
Negative control	89.0±3.20
0.1 µM	91.8±4.10
0.5 µM	85.7±2.23
1.0 µM	63.2±1.42*
5.0 µM	54.4±1.56**
10.0 µM	21.5±0.17**
50.0 µM	9.2±0.53**
Positive control	59.1±0.82**

V79 cells were exposed to DPDT for 2 h and the BNC (binucleated cells) were counted. MMS (methylmethanesulfonate) was used as positive control. Data are expressed as mean ± SD, n= 4 \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  (ANOVA, Tukey's test): untreated cells versus DPDT exposure; positive control versus negative control.

## LEGENDS FOR FIGURES

Fig. 1. Chemical structure of diphenyl ditelluride (DPDT).

Fig. 2. Survival of *S. cerevisiae* repair deficient strains in (A) BER pathway, (B) NER and TLS pathways, (C) HR and NHEJ pathways and (D) triple and quadruple mutants combining deficiencies in BER pathway with NER, TLS or HR after treatment with different doses of DPDT. Error bars represent the standard deviations for three separately treated cultures.

Fig. 3. Determination of TBARS (Panel A) and GSH/GSSG ratio (Panel B) in *S. cerevisiae* XV185-14c strain treated with DPDT at the indicated concentrations for 2 h. Open bars represent negative control or treatment with DPDT. Filled bars represent the effect of pre-treatment with 5 mM N-ac (N-acetylcysteine) on DPDT exposure. Solvent was used as negative control. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, n = 4. The symbol \* indicates  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ /One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test. Open bars are compared to the negative control. Filled bars are compared against open bars at the same DPDT concentration.

Fig. 4. Determination of TBARS (Panel A) and GSH/GSSG ratio (Panel B) in V79 cells treated with DPDT at the indicated concentrations for 2 h. Open bars represent negative control or treatment with DPDT. Filled bars represent the effect of pre-treatment with 5 mM N-ac (N-acetylcysteine) on DPDT exposure. Solvent was used as negative control. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, n = 4. The symbol \* indicates  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ /One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test. Open bars are compared to

negative controls. Filled bars are compared against open bars at the same DPDT concentration.

Fig. 5. Effect of pre-treatment with N-ac (N-acetylcysteine) on DPDT-induced DNA damage in V79 cells evaluated by comet assay (Panel A) or by modified comet assay using Fpg (Panel B) and Endo III (Panel C) enzymes. The V79 cells were treated with DPDT for 2 h without metabolic activation. The oxidative damage score were calculated as the difference between the score obtained after incubation with the respective enzyme minus the score without enzyme. Open bars represent negative control or treatment with only DPDT. Filled bars represent the effect of pre-treatment with 5mM N-ac (N-acetylcysteine) on DPDT exposure. Solvent was used as negative control. Open bars are compared to the negative control. Filled bars are compared against open bars at the same DPDT concentration. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, n = 4. The symbol \* indicates  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ /One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

Fig. 6. Oxidative damage induced by 2 h DPDT treatment in V79 cells with metabolic activation. Oxidative damage score represent the levels of Fpg (Panel A) and Endo III (Panel B) sensitive sites, which were calculated as the score obtained with enzyme incubation minus the score without enzyme. Cells treated with DPDT were compared to the negative control. Solvent was used as negative control. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, n = 4. The symbol \* indicates  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ /One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

Fig. 7. Mutagenic effects of DPDT in V79 cells. V79 cells were exposed to DPDS for 2 h and the MN frequency is expressed per 2,000 binucleated cells (BNC). MMS (methylmethanesulfonate) was used as positive control. Solvent was used as negative control. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, n = 4. The symbol \* indicates  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ /One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

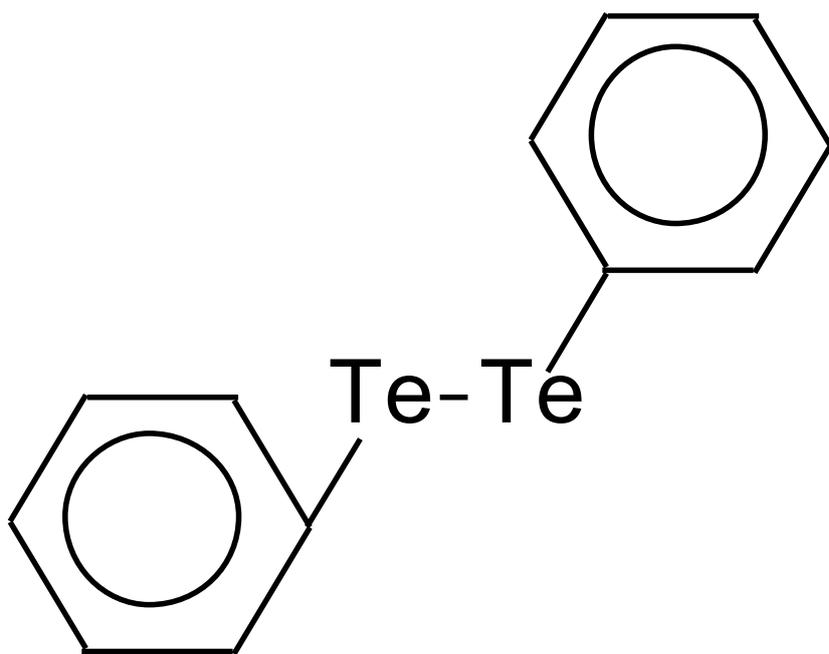


Fig. 1

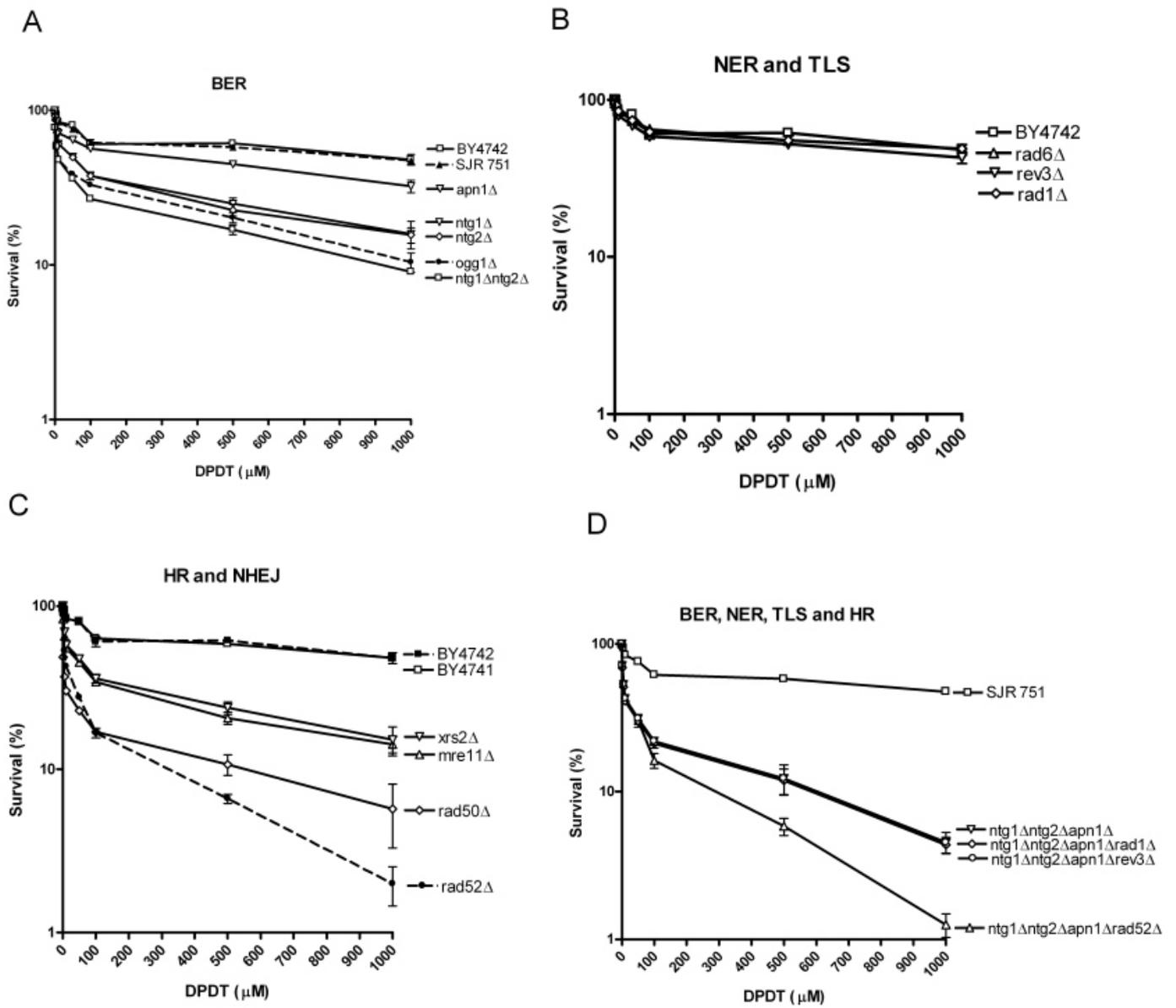
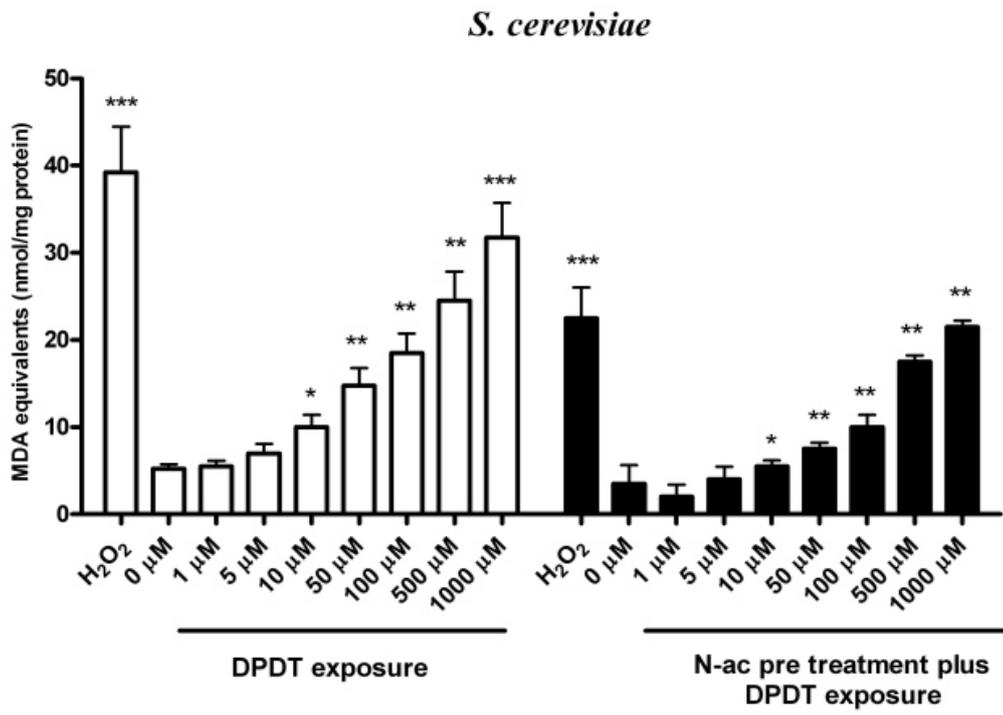


Fig. 2

A



B

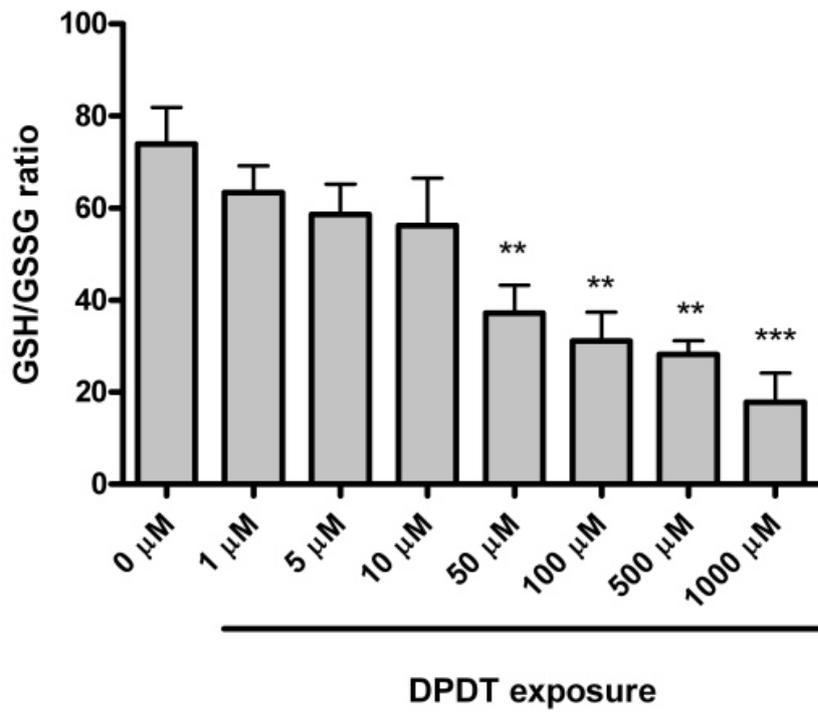
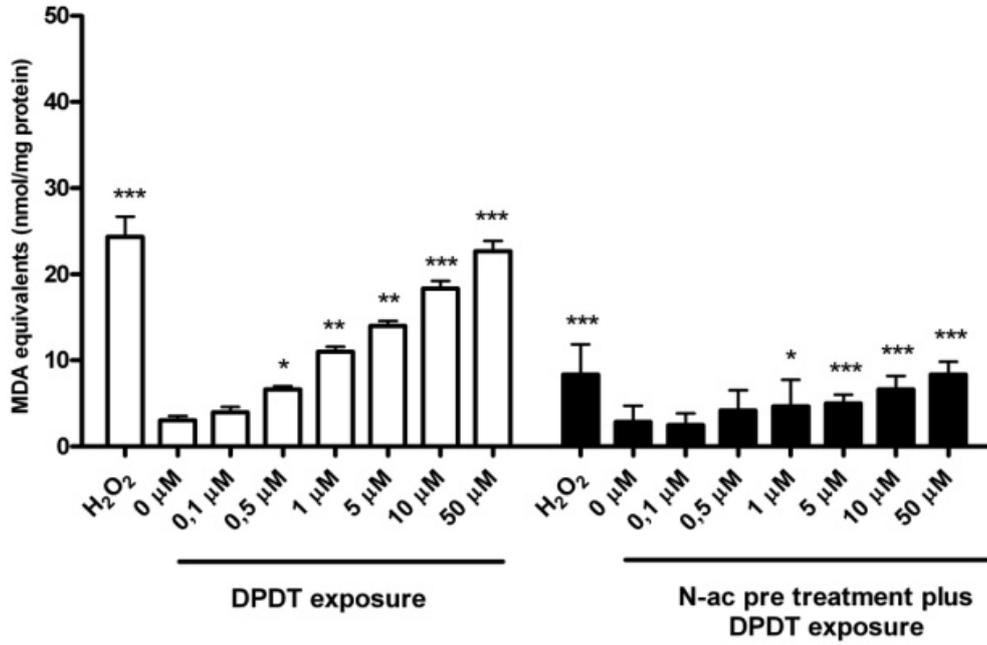


Fig. 3

A

V79 cells



B

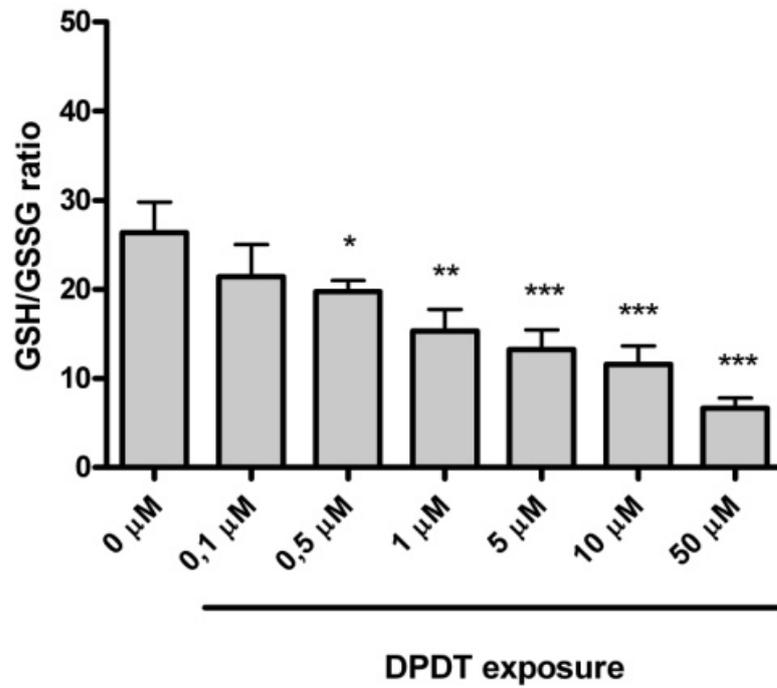


Fig. 4

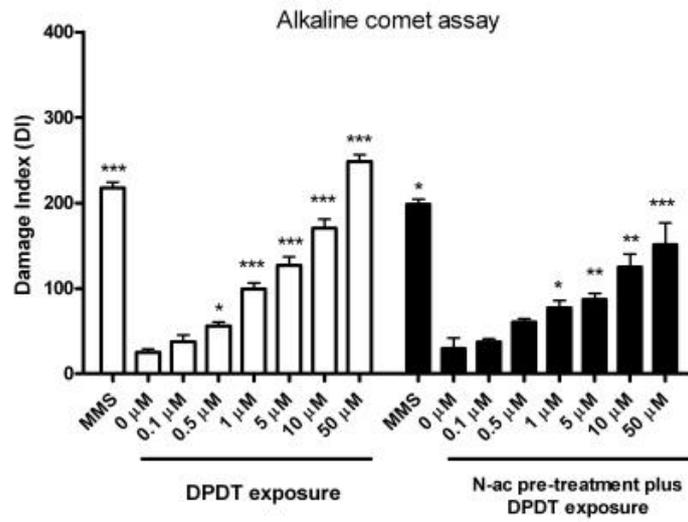
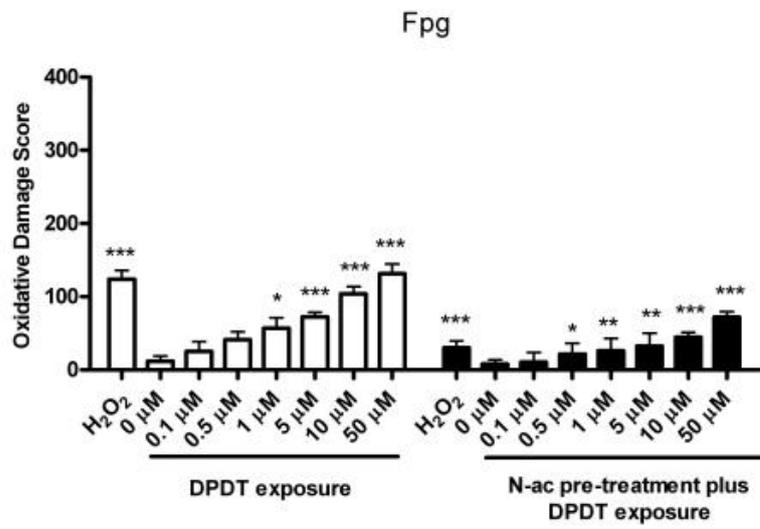
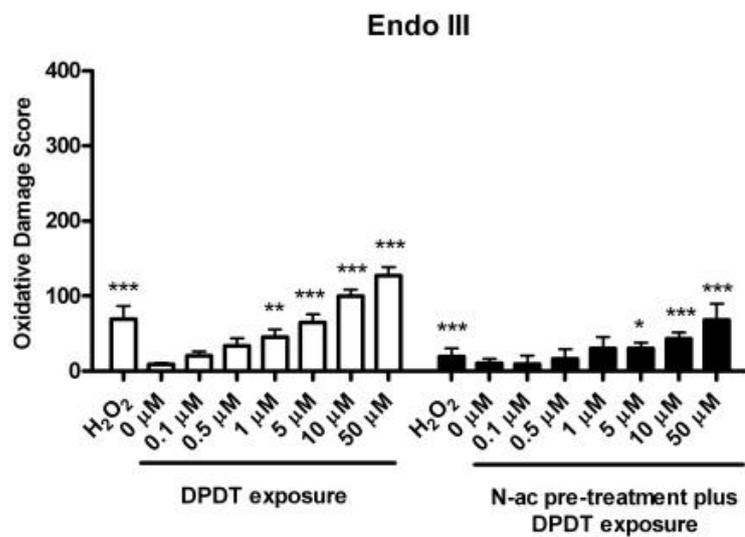
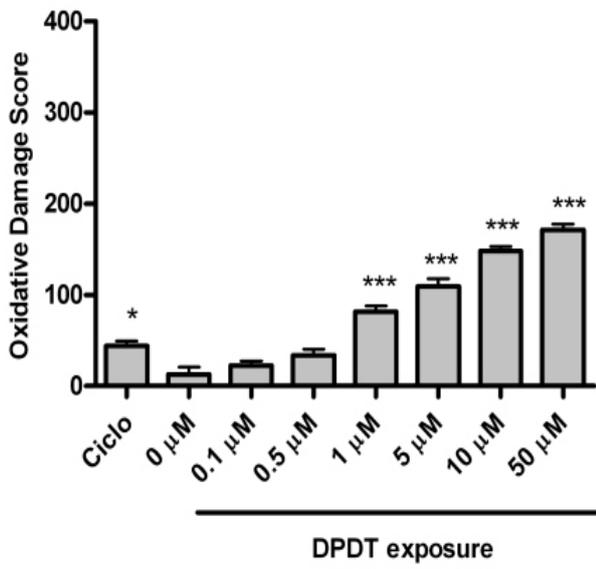
**A****B****C**

Fig. 5

A

FPG - S9 mix



B

Endo III - S9 mix

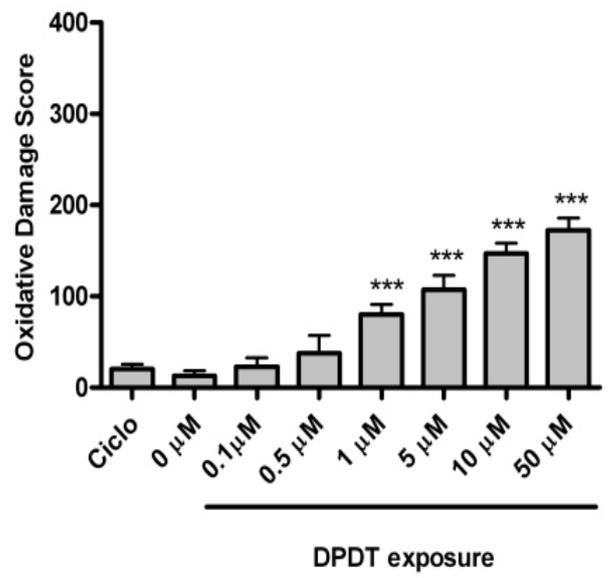


Fig. 6

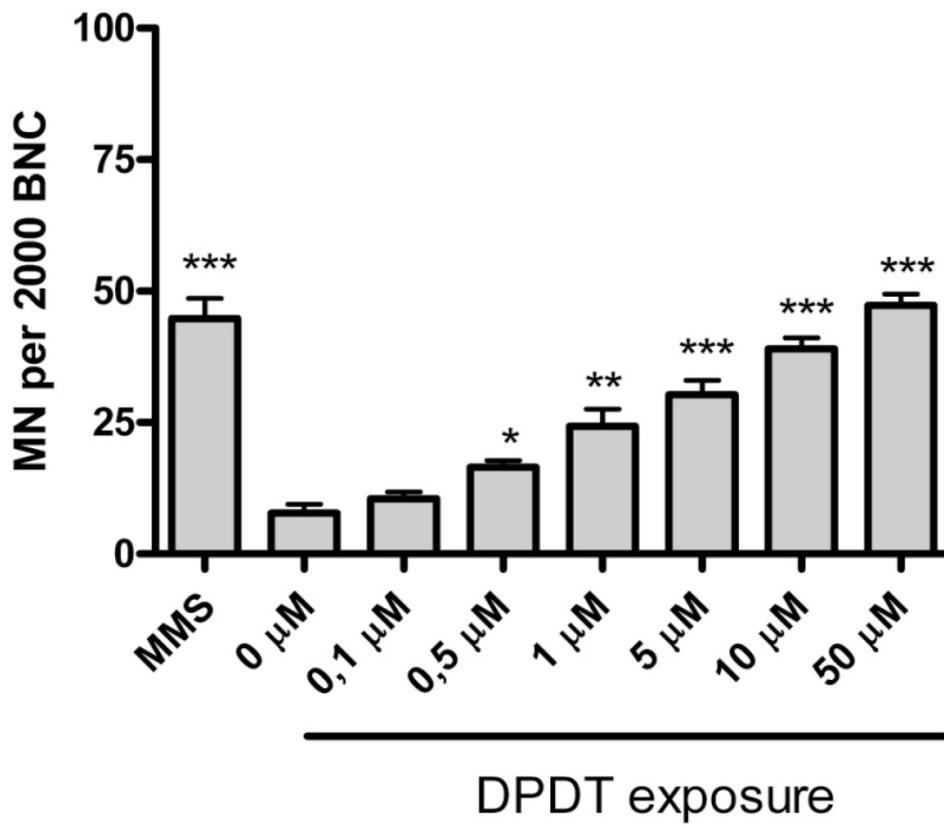


Fig. 7



## Discussão

## DISCUSSÃO

A química dos compostos orgânicos contendo telúrio desenvolveu-se rapidamente após 1840, em razão da descoberta de novas rotas de síntese e mecanismos catalíticos. A partir disso, esses compostos foram amplamente utilizados na indústria metalúrgica e eletrônica (Chasteen *et al.*, 2009). Desta maneira, o aumento no uso industrial deste semi-metal, tanto em suas formas orgânicas quanto inorgânicas, trouxe grande preocupação quanto aos riscos ambientais e ocupacionais (Meotti *et al.*, 2003; Rezanka & Sigler, 2008; Chasteen *et al.*, 2009). Essa é a razão norteadora da investigação dos efeitos toxicológicos de compostos contendo esse elemento químico. Além disso, existe um grande número de relatos na literatura mostrando interessantes atividades biológicas para compostos orgânicos contendo telúrio, tais como ação imunomoduladora, antiinflamatória, antioxidante e antiproliferativa em diferentes tipos celulares (Sailer *et al.*, 2004; Frei *et al.*, 2008; Sredni-Kenigsbuch *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2009). Conseqüentemente, a expectativa de emprego farmacológico dessa classe de moléculas cresceu muito nos últimos anos e uma série de novos compostos organotelurados foram sintetizados. Em resumo, o estudo dos efeitos biológicos do telúrio e seus compostos apresenta, como vergências, a farmacologia e a toxicologia (Nogueira *et al.*, 2004; Rezanka & Sigler, 2008).

O DTDF, estudado nesse trabalho, é um composto organotelurado de natureza simples e quimicamente estável. A necessidade de avaliação toxicológica dessa molécula baseia-se em sua participação como reagente e intermediário em indústria de síntese química (Muñiz *et al.*, 2005). Como dito anteriormente, os estudos com esse composto objetivam elucidar seus efeitos tóxicos, ampliar as possibilidades farmacológicas e o desenvolvimento de derivados. Com intuito de ampliar o conhecimento a respeito dessa molécula, o presente trabalho investigou os seus efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico em três diferentes modelos biológicos: a bactéria *Salmonella typhimurium*, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e células de mamíferos em cultura.

As concentrações citotóxicas do DTDF em cada modelo biológico foram determinadas e, naturalmente, são diferentes entre si. Essa diferença é normal e inerente à natureza dos modelos biológicos comparados, uma vez que representam células com diferentes características de permeabilidade e metabolismo. De fato, enquanto a toxicidade

do telúrio inorgânico em microorganismos é conhecida há mais de um século, os relatos sobre efeitos tóxicos de compostos orgânicos contendo o elemento datam das últimas décadas (Gharieb & Gadd, 1998; Chasteen *et al.*, 2009). Outros diteluretos orgânicos, como o ditelureto de 3,3'-diaminodifenila, ditelureto de 4,4'-diisopropildifenila, 2,2',-dimetoxidifenila e ditelureto de 2,2'-diamino-3,3',5,5'-tetrametildifenila também são tóxicos para linhagens celulares humanas em cultivo, como as células da linhagem HL-60, em concentrações da mesma ordem de grandeza da toxicidade do DTDF em células V79 (Tabela 4 capítulo I) (Sailer *et al.*, 2003; 2004). Neste contexto, Engman *et al.* (2000) observaram que diteluretos de diarila, teluretos de alquila, arila e dialquila eram capazes de inibir o crescimento de células tumorais humanas, MCF-7 e HT 29, em cultura.

Uma das primeiras evidências de efeito tóxico do DTDF foi a inibição da enzima  $\delta$ -ALA-D em experimentos *in vitro* em vários órgãos de ratos (Maciel *et al.*, 2000). Alguns anos depois, em outros tipos celulares, incluindo eritrócitos humanos, o mesmo efeito foi verificado (Meotti *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2003). Nessa condição, o acúmulo de ácido aminolevulínico propicia a geração de radicais livres e conduz a célula a um estado de estresse oxidativo (Emanuelli *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2009). Assim sendo, a primeira parte a compor a explicação da toxicidade do DTDF é oxidação de grupamentos tiólicos e conseqüente inibição da atividade protéica. A repercussão dessa propriedade, em nível de sistema nervoso central, evidencia-se pela inibição da captação vesicular *in vitro* de [<sup>3</sup>H]glutamato e redução ligação de [<sup>3</sup>H]glutamato ao receptor NMDA *in vitro* e *ex vivo* em preparação de membranas sinápticas (Nogueira *et al.*, 2001; 2002). Isto se deve à presença de grupamentos sulfidrílicos nos transportadores de glutamato e, no receptor NMDA, de um sítio redox dependente da forma reduzida de seus grupos sulfidrílicos para a união com o neurotransmissor, ambos facilmente oxidáveis pelos compostos orgânicos de telúrio (Brito, 2007; Guan, 2008).

Na verdade, em termos de homeostase tiólica, a glutatona intracelular é um alvo molecular potencial. A glutatona é um tripeptídeo com inúmeras funções, representando o composto tiólico de baixa massa molecular mais abundante em células animais (0,5-10 mmol/L). A maioria da glutatona está presente no citosol (85-90%) e o conteúdo remanescente é distribuído entre as organelas. Em termos funcionais, primeiramente, glutatona neutraliza radicais livres e outras espécies reativas de maneira eficaz, diretamente e indiretamente, através de reações enzimáticas, notadamente aquelas

catalisadas pela GPx, deidroascorbato redutase e glutathione-S-transferase. Além disso, reage com vários eletrófilos, como metabólitos fisiológicos (estrogênio, prostaglandinas, melaninas e leucotrienos) e xenobióticos, em uma estratégia de desintoxicação. Entre suas funções, também se encontram um envolvimento na sinalização intracelular mediada por óxido nítrico e por insulina; reserva de nitrogênio e enxofre; participação no metabolismo dos eicosanóides, na via do glioxalato, na modificação pós-traducional conhecida como glutathionilação e no controle da proliferação celular (Penninckx, 2002; Valko *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Estrela *et al.*, 2006). Desempenhando todas essas funções vitais, é esperado que agentes que perturbem a homeostase redox citosólica e causem alteração nos níveis intracelulares de glutathione possuam efeitos deletérios para a célula.

A indicação do efeito citotóxico, a interação de compostos organotelurados com grupamentos tiólicos e os dados a respeito da semelhança existente entre telúrio e selênio (Comasseto *et al.*, 1997), guiaram as investigações a respeito da relação entre os mecanismos de citotoxicidade e a interferência com o estado redox celular controlado por glutathione. Nas concentrações citotóxicas, DTDF é capaz de diminuir o conteúdo intracelular da forma reduzida de da glutathione (GSH) em maneira concentração-dependente, tanto em levedura quanto em células V79 (Fig. 3B e 4B capítulo I). Neste contexto, o aumento da taxa de oxidação de GSH indica um estado de estresse oxidativo, no qual as biomoléculas estão predispostas ao ataque oxidativo de radicais livres produzidos pelo DTDF. Os danos causados por essas espécies, em nível celular, constituem parte da resposta citotóxica dessa molécula organotelurada nos modelos biológicos empregados neste estudo. É importante salientar que GSH é conhecida por proteger os tecidos contra o dano ao DNA induzido por oxidação e intermediários reativos, como alguns carcinógenos, que podem interagir com os ácidos nucleicos (Coles & Ketterer, 1990; Higuchi *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2005). O reconhecido efeito de compostos contendo telúrio e selênio sobre o balanço redox celular (Rosa *et al.*, 2005; Stangherlin *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2007) e a ação do DTDF na redução dos níveis de GSH motivou avaliar o estado redox das células após a exposição a este agente.

Os ácidos graxos poliinsaturados 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 alcóxil, iniciando uma reação em cadeia responsável pela produção de diversos epóxidos, hidroperóxidos e compostos carbonilados, denominada peroxidação lipídica (Valko *et al.*, 2004). Um dos principais produtos desse processo é o malondialdeído (MDA), cujas repercussões biológicas são estudadas há muito tempo. Três hipóteses são propostas para a origem desse aldeído: (i) em condições de estresse, essa molécula poderia ser formada durante biosíntese de prostaglandinas e tromboxanas, como um produto de decomposição lipídica; (ii) as sucessivas gerações de hidroperóxidos e clivagem da cadeia de ácido graxo no carbono  $\beta$  poderiam produzir hidroperoxialdeído, e a posterior  $\beta$ -cisão liberaria MDA; (iii) por reação final entre o radical hidroxil e a acroleína (Marnett, 1999). Além do MDA, o t-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), derivado das reações de peroxidação lipídica, também apresenta potencial de lesar o DNA *in vivo* (Chung *et al.*, 2005).

O potencial carcinogênico do MDA é conhecido desde 1972, quando sua administração tópica em camundongos induziu tumores de pele. Uma vez que os resultados desse estudo apresentaram-se um pouco controversos, somente alguns anos depois a evidência de carcinogênese em ratos foi realmente confirmada. Na verdade, MDA é mutagênico no teste Ames por possuir capacidade de formar adutos no DNA em resíduos de guanina e conseqüentemente causar deleções gênicas e mutações de deslocamento de quadro de leitura. As lesões pré-mutagênicas são consistentes estruturalmente com pontes intercadeias formadas por outros agentes e, da mesma forma, são extremamente tóxicas por bloquear a replicação e transcrição. O reparo desses adutos entre DNA e MDA necessita, obrigatoriamente, de um intermediário com quebra dupla na fita, cuja reparação está canalizada para via de recombinação homóloga (Marnett, 1999; Niedernhofer *et al.*, 2003; VanderVeen *et al.*, 2003; Del Rio *et al.*, 2005). Dessa maneira, a participação do MDA, cuja formação é favorecida pela oxidação de GSH, nos efeitos genotóxicos do DTDF auxilia no entendimento dos seus mecanismos tóxicos.

A maioria dos ensaios de determinação de MDA foram desenvolvidos com base na sua derivatização com ácido tiobarbitúrico, em razão da condensação das duas moléculas produzir uma aduto de alta absorvidade molar, permitindo um ensaio espectrofotométrico. Todavia, a especificidade da reação é baixa, uma vez que o ácido tiobarbitúrico pode reagir com vários compostos derivados de oxidação, além do MDA

(Dotan *et al.*, 2004; Hwang & Kim, 2007). Com objetivo de avaliar a situação do estado redox celular após tratamento com DTDF, realizou-se a medida, em células de levedura e de mamíferos, dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, um marcador polêmico de estresse oxidativo, com objetivo de relacionar a oxidação de GSH e o aumento da ocorrência de reações oxidativas endógenas com potencial lesivo, caracterizando o momento oxidante, como mostrado nos resultados do capítulo I (Fig. 3A e 4A). Evidenciou-se um aumento na peroxidação lipídica após exposição das células ao DTDF sugerindo uma importante participação de EROs na toxicidade deste agente. Corroborando os resultados obtidos, Borges *et al.* (2007) encontraram indução de peroxidação lipídica em fígado e rim de ratos expostos ao DTDF. Também foi verificado que, quando o DTDF era administrado a fêmeas de roedores durante o período de lactação, os ratos jovens apresentavam elevados níveis de peroxidação lipídica em algumas estruturas cerebrais (Stangherlin *et al.*, 2008).

Com o objetivo de aumentar o conhecimento em relação ao mecanismo de toxicidade do DTDF, foi investigado o seu efeito sobre a estabilidade genômica. Em *S.cerevisiae* se pode observar uma indução de mutações pontuais em levedura nos loci *his1* e *lys1* evidenciada pela reversão do fenótipo auxotrófico para histidina e lisina, respectivamente (Tabela 3 capítulo I). Nos ensaios em bactéria e levedura pode-se verificar que DTDF induziu aumento na frequência de indução de mutação *frameshift*-deslocamento de quadro de leitura no DNA- detectada em *S.typhimurium* linhagem TA97a (Tabela 2 capítulo I) e *S.cerevisiae* linhagem XV185-14c no locus *hom3-10* (Tabela 3 capítulo I). Portanto, aqui se pode sugerir um outro efeito desta molécula organotelurada, que seria uma possível capacidade de se intercalar entre as bases do DNA.

A esse respeito deve-se considerar que compostos químicos com topologia planar e dotados de características eletrofílicas são potenciais candidatos à intercalação entre as fitas de DNA, uma vez que a existência de um centro eletrofílico nas proximidades das bases do DNA estabelece uma interação capaz de permitir a formação de ligação covalente e por fim, um aduto de DNA (Wilson *et al.*, 1992). Por essa razão, os agentes intercalantes constituem uma das classes de xenobióticos de maior potencial genotóxico, refletindo essa propriedade biológica por meio da indução característica de mutações *frameshift* em microrganismos e quebras cromossômicas em mamíferos (Pasqual *et al.*, 1993). Baseado nesses postulados, na estrutura planar e no caráter eletrofílico do DTDF bem como nos

resultados mostrados, pode-se sugerir que este composto seja um agente intercalante de cadeias de DNA. Nesse cenário, também é importante mencionar que o tratamento com DTDF causou quebras cromossômicas em células V79 em cultivo, avaliada pela ocorrência de micronúcleos (Fig. 7 capítulo I).

Os resultados mostraram que os simples mutantes no reparo por excisão de bases (BER) *apn1Δ*, *ntg1Δ* e *ntg2Δ* foram sensíveis ao tratamento ao DTDF em relação à linhagem selvagem (Fig. 2A capítulo I). *Apn1* é a principal endonuclease de *S. cerevisiae* responsável pelo processamento de sítiosapurínicos/apirimidínicos (AP) gerados pela remoção de bases danificadas ou errôneas e, na sua ausência, ocorre o acúmulo desses sítios, os quais são altamente tóxicos à célula, pois são convertidos em quebras de DNA (Boiteux & Guillet, 2004). Essas quebras de DNA também foram verificadas em células V79 por meio do ensaio cometa em condições de pH neutro e alcalino (Tabela 5 capítulo I). *Ntg1p* e *Ntg2p* possuem atividades de DNA glicosilase, que remove purinas e pirimidinas danificadas, gerando sítios AP, e de liases, que processam os sítios AP (Gellon *et al.*, 2001; Meadows *et al.*, 2003; Boiteux & Guillet, 2004). O duplo mutante *ntg1Δntg2Δ* e o triplo mutante *apn1Δntg1Δntg2Δ* mostraram sensibilidade ao tratamento com DTDF (Figuras 2A e 2D capítulo I), o que indica que essas proteínas são importantes para o reconhecimento das lesões induzidas por este agente. Além disso, a linhagem mutante *ogg1Δ* apresentou sensibilidade ao DPDT, sugerindo a ocorrência de 8-hidroxiguanina e formamidopirimidinas (Fapy) (Fig. 2A capítulo I). Em suma, os resultados em linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em diferentes vias de reparação de DNA comprovaram que o tratamento com DTDF promove o ataque oxidativo às bases nitrogenadas do DNA, o qual necessita da participação de enzimas da via de reparo por excisão de bases para a remoção dos produtos de oxidação e correção dos sítios abásicos. A ação oxidante e o conseqüente dano oxidativo ao DNA, manifesto sob forma de oxidação de bases, foi confirmada, em células V79, pelo ensaio cometa na versão modificada, empregando as endonucleases de reparação de DNA Fpg e EndoIII (Fig. 5B e 5C capítulo I).

A elevada sensibilidade do mutante *rad52Δ* e a similaridade de resposta entre todos mutantes duplos, triplos e quadruplos contendo a deleção do gene *RAD52* (Fig. 2C capítulo I), deficiente na via recombinogênica, tratados com DTDF, sugere que a ausência da maquinaria de recombinação homóloga causa um bloqueio no reparo das lesões potencialmente letais induzidas e/ou o resgate de forquilhas de replicação colapsadas no

DNA por ação desse composto organotelurado. Além disso, verificou-se a participação do complexo MRX, formado pelas proteínas Mre11, Rad50 e Xrs2, da via de recombinação não-homóloga (Pastwa & Blasiak, 2003), realizando a reparação de quebras duplas no DNA induzidas pelo DTDF (Fig. 2C capítulo I). Essas quebras duplas também foram observadas na resposta ao tratamento com DTDF em células V79 por meio do ensaio cometa alcalino e confirmadas no ensaio em pH neutro (Tabela 5 capítulo I).

Dados referentes à investigação da participação do NER (*rad1Δ*), síntese translesão (TLS) (*rad6Δ* e *rev3Δ*) no reparo das lesões por DTDF não apresentam diferenças significativas de sensibilidade (Fig. 2B capítulo I), o que sugere que estas vias não possuem um papel no reparo de lesões induzidas por este agente.

Em síntese, o mecanismo de toxicidade genética do DTDF apresenta dois componentes fundamentais: os efeitos oxidante e intercalante. Por ação oxidante, as quebras simples provenientes dos sítios abásicos são convertidas em quebras simples e duplas durante o processo de reparação. Nesse cenário, também se deve considerar a ação intercalante como fator de origem de quebras na fita de DNA. Sabe-se que as mutações de deslocamento de quadro de leitura são causadas pela perda ou adição quando a DNA polimerase realiza uma cópia a partir de um molde contendo resíduos intercalados. No entanto, além de mutação *frameshift*, a intercalação também pode resultar em quebras da fita de DNA como consequência da inibição da ação de topoisomerases (Hendry *et al.*, 2007). A presença de uma substância intercalada na cadeia de DNA pode estabilizar o complexo DNA-topoisomerase e inibir o passo de religação do ciclo catalítico da manipulação topológica dos ácidos nucleicos mediada por topoisomerases. É possível então compreender o mecanismo pelo qual os agentes intercalantes capazes de inibir a ação dessas enzimas originam quebras de DNA. Portanto, a inibição da topoisomerase I resulta em quebras simples na fita de DNA, enquanto o bloqueio de ação na topoisomerase II produz quebras duplas (Snyder & Arnone, 2002; Hendry *et al.*, 2007). Essas quebras de DNA representam substratos canalizados para a via de recombinação homóloga (HR) e também para reparação não-homóloga (NHEJ), uma via de reparo sujeita a erro, o que potencializa a ocorrência de uma resposta mutagênica (Boiteux & Guillet, 2004; Seiple *et al.*, 2006).

O perfil genotóxico do DTDF não se altera com presença de ativação metabólica com uso da mistura S9, uma fração microsomal hepática de ratos. Assim sendo, é possível concluir que a metabolização da molécula organotelurada não a inativa (Tabela 5 capítulo I). Até o momento, no entanto, não existem nem dados de mutagênese de compostos orgânicos contendo telúrio, para realizar uma possível correlação estrutura-atividade em relação ao perfil de toxicidade genética, nem trabalhos sobre o metabolismo de compostos orgânicos contendo esse elemento. Em verdade, esse trabalho é pioneiro em termos de toxicidade genética de compostos orgânicos contendo telúrio.

O pré-tratamento com N-acetilcisteína (N-ac), um conhecido precursor da biosíntese de GSH, reduziu de maneira significativa a peroxidação lipídica provocada pela exposição ao DTDF tanto em levedura quanto nas células de mamíferos (Fig. 3A e 4A capítulo I). A N-acetilcisteína é uma molécula antioxidante, rapidamente desacetilada em meio celular, com função de prover cisteína para biosíntese de GSH, e dessa forma, dotada da propriedade de reverter eficientemente as intoxicações com uma série de xenobióticos causadores de distúrbios no equilíbrio redox ou produtores de metabólitos altamente reativos (Sheikh-Hamad *et al.*, 1997; Zafarullah *et al.*, 2003; Blanusa *et al.*, 2005). Dessa forma, o pré-tratamento com N-acetilcisteína foi capaz de proteger contra as lesões ao DNA em todos modelos estudados, confirmando a participação do dano oxidativo nos mecanismos de toxicidade do DTDF (Fig. 5; Tabela 3 capítulo I).

O teste de micronúcleos mostra que as lesões geradas pelo DTDF em células V79 não são eficientemente reparadas e fixam-se no genoma na forma de quebras cromossômicas, originando o aumento na frequência de micronúcleos observada (Fig. 7 capítulo I). Telurito de sódio, um composto inorgânico contendo telúrio, pode causar aumento na frequência de micronúcleos em células humanas (Migliore *et al.*, 1999). Existe uma correlação positiva entre os agentes clastogênicos e o potencial teratogênico dessas moléculas, pois o aumento da instabilidade genética está ligado à ocorrência de malformações em diversos níveis biológicos (Vannier, 1989; Mirkes, 1998). Neste trabalho, mostrou-se que o DTDF é mutagenico em células V79 em cultura. Isso pode explicar os efeitos teratogênicos desse composto orgânico contendo telúrio, previamente publicados na literatura (Stangherlin *et al.*, 2005; Roman *et al.*, 2007).

Os efeitos celulares do DTDF parecem ser complexos e dependentes da concentração. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a citotoxicidade do

DTDF em bactéria, levedura e células de mamíferos deve-se à habilidade deste agente de reduzir a razão GSH/GSSG, conduzindo a uma condição pro-oxidante. Estes eventos contribuem para genotoxicidade e mutagenicidade induzida por esta molécula. O fato do DTDF induzir mutação do tipo *frameshift* em *S. typhimurium* e *S. cerevisiae* sugere que esta molécula pode se intercalar no DNA e gerar quebras duplas na fita. Dessa forma, DTDF é um mutágeno que provavelmente gera quebras no DNA por combinar a capacidade de intercalação e a ação pro-oxidante (Fig. 8). Além disso, por aumentar o conteúdo de GSH, o pré-tratamento com N-acetilcisteína pode prevenir os efeitos genotóxicos e mutagênicos deste composto organotelurado.

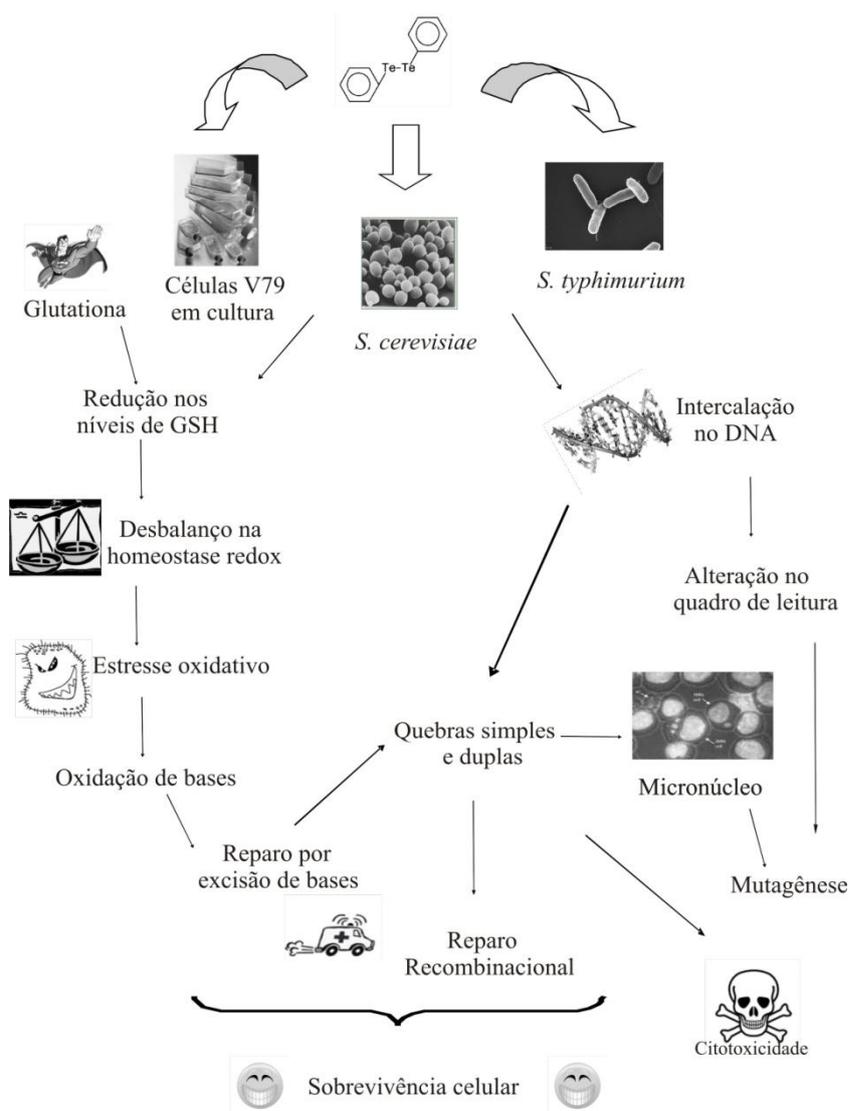


Figura 8: Modelo esquemático representando o mecanismo de ação do DTDF



## **Conclusões**

## CONCLUSÃO GERAL

Esse trabalho é pioneiro em relação aos efeitos biológicos do ditelureto de difenila e é um dos poucos relatos agregando informação a respeito dos mecanismos de toxicidade genética de moléculas organoteluradas. Os resultados mostram que a citotoxicidade do DTDF em bactéria, levedura e células V79 em cultivo seja consequência de sua propriedade de perturbar a homeostase redox intracelular. Este evento contribui para a oxidação das bases e formação de quebras na fita de DNA. Além disso, os dados a respeito da avaliação do potencial genotóxico e mutagênico dessa molécula indicam a potencial ocorrência de intercalação entre as fitas do DNA, fato que acarreta a produção de quebras duplas. A resposta de linhagens de *S.cerevisiae* deficientes em vias de reparação de DNA salientou a necessidade do reparo por excisão de bases e do recombinacional para manutenção da integridade informacional genômica em células tratadas com essa molécula organotelurada. Neste sentido, por aumentar o conteúdo de GSH, o pré-tratamento com N-acetilcisteína pode prevenir os efeitos genotóxicos e mutagênicos deste composto.

## CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

1. O DTDF apresentou efeito citotóxico em bactérias, leveduras e células V79 em cultivo.
2. Os efeitos tóxicos do DTDF devem-se à redução dos níveis intracelulares de GSH visto em *S. cerevisiae* e nas células V79. Como consequência, um estado pró-oxidante desenvolve-se, confirmado pela determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nesses organismos.
3. DTDF induziu mutação *frameshift*, tanto em *S. typhimurium* nas linhagens TA97a e TA98 quanto em *S. cerevisiae* linhagem haplóide XV185-14c no locus *hom3-10*.
4. Linhagens mutantes de *S. cerevisiae* defectivos na reparação por excisão de bases e principalmente no reparo recombinacional homólogo e não-homólogo apresentaram elevada sensibilidade ao DTDF, permitindo concluir que esses

processos de reparação são fundamentais para corrigir as lesões induzidas pelo DTDF ao DNA.

5. O ensaio cometa em células V79 em cultivo nas versões alcalina e neutra mostrou a ocorrência de quebras simples e duplas de DNA após o tratamento com DTDF. A presença de purinas e pirimidinas oxidadas no DNA de células V79 tratadas com DTDF foi confirmada pelo ensaio cometa modificado empregando endonucleases específicas (Fpg e Endo III).
6. DTDF é genotóxico e mutagênico por dois mecanismos fundamentais: as lesões oxidativas às bases nitrogenadas e um possível efeito intercalante entre as cadeias do DNA, o qual induz quebras duplas por possível inibição da ação de topoisomerasas.
7. DTDF induziu o aumento na frequência de micronúcleos, evidenciando a ocorrências de quebras cromossômicas em células V79 expostas a esse composto organotelurado.
8. O pré-tratamento com N-acetilcisteína impede os efeitos citotóxicos, genotóxicos em células V79 e mutagênicos em *S. cerevisiae*.



## Perspectivas

## PERSPECTIVAS

Seria de importância para o seguimento do trabalho, complementação dos resultados e progresso do conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares das atividades biológicas de moléculas organoteluradas, em especial o DTDF, as seguintes abordagens experimentais:

1. Promover investigações mais detalhadas a respeito da habilidade de intercalação e inibição de atividade de topoisomerases do DTDF. Para tanto, sugere-se estudar a resposta genotóxica do DTDF frente a linhagens de levedura deficientes em topoisomerases, *top1Δ*, *top2Δ/TOP2* e *top3Δ* e em células V79 em cultivo, utilizando inibidores específicos.
2. Investigar o papel 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 e adenocarcinoma de cólon humano HT-29) pelas seguintes técnicas: (i) análise da fragmentação do DNA internucleossomal por citometria de fluxo; (ii) avaliação das alterações no potencial da membrana mitocondrial com uso de rodamina 123 em citômetro de fluxo; (iii) alterações na morfologia celular por coloração com hematoxilina/eosina em microscópio ótico, DAPI em microscópio de fluorescência e microscopia eletrônica; realizar medida da atividade da caspase 3/7.
3. Realizar a avaliação pelo ensaio cometa do potencial genotóxico desse ditelureto em camundongos, determinando os órgãos-alvo.
4. Avaliar a ação antioxidante e antimutagênica desse composto organotelurado, discriminando as concentrações tóxicas e de interesse farmacológico, o mecanismo envolvido na ação antioxidante e sua participação na modulação da genotoxicidade de mutágenos que lesam os ácidos nucléicos com envolvimento da ação de radicais livres em células V79 em cultura.

5. Avaliar o efeito modulador do DTDF na sensibilidade de linhagens tumorais resistentes a agentes quimioterápicos por super-expressão de glutathione, a agentes anticâncer por meio de ensaios de viabilidade celular, sobrevivência clonogênica e análise de interação



## Referências

## Referências

- Abdelwahed A, Skandrani I, Kilani S, Neffati A, Sghaier MB, Bouhleb I, Boubaker J, Ammar RB, Mahmoud A, Ghedira K & Chekir-Ghedira L (2008) Mutagenic, antimutagenic, cytotoxic, and apoptotic activities of extracts from *Pituranthos tortuosus*. *Drug Chem Toxicol* 31: 37-60
- Abe H, Takaoka Y, Chiba Y, Sato N, Ohgiya S, Itadani A, Hirashima M, Shimoda C, Jigami Y & Nakayama KI (2009) Development of valuable yeast strains using a novel mutagenesis technique for the effective production of therapeutic glycoproteins. *Glycobiology In Press*
- Abondanza TS, Oliveira CR, Barbosa CM, Pereira FE, Cunha RL, Caires AC, Comasseto JV, Queiroz ML, Valadares MC & Bincoletto C (2008) Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium (IV) compound RT-04. *Food Chem Toxicol* 46: 2540-2545
- Acevedo-Torres K, Fonseca-Williams S, Ayala-Torres S & Torres-Ramos CA (2009) Requirement of the *Saccharomyces cerevisiae* APN1 gene for the repair of mitochondrial DNA alkylation damage. *Environ Mol Mutagen In Press*
- Adris P, Lopez-Estrano C & Chung KT (2007) The metabolic activation of 2-aminofluorene, 4-aminobiphenyl, and benzidine by cytochrome P-450-107S1 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicol In Vitro* 21: 1663-1671
- Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D, Sredni B & Albeck M (1989) Effect of the new immunoregulator AS-101 on *in vitro* functions of mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 77: 319-323
- Altmann M & Trachsel H (1994) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* system: a powerful tool to study the mechanism of protein synthesis initiation in eukaryotes. *Biochimie* 76: 853-861
- Ansari MI & Malik A (2009) Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. *Mutat Res In press*
- Asare GA, Kew MC, Mossanda KS, Paterson AC, Siziba K & Kahler-Venter CP (2009) Effects of exogenous antioxidants on dietary iron overload. *J Clin Biochem Nutr* 44: 85-94
- Avila DS, Gubert P, Palma A, Colle D, Alves D, Nogueira CW, Rocha JB & Soares FA (2008) An organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats. *Brain Res Bull* 76: 114-123
- Babynin EV (2004) SOS-inducible DNA polymerases and adaptive mutagenesis. *Genetika* 40: 581-591

- Back TG, Kuzma D & Parvez M (2005) Aromatic derivatives and tellurium analogues of cyclic seleninate esters and spirodioxyselenuranes that act as glutathione peroxidase mimetics. *J Org Chem* 70: 9230-9236
- Bandyopadhyay A, Ghoshal S & Mukherjee A (2008) Genotoxicity testing of low-calorie sweeteners: aspartame, acesulfame-K, and saccharin. *Drug Chem Toxicol* 31: 447-457
- Barbosa NB, Rocha JB, Zeni G, Emanuelli T, Beque MC & Braga AL (1998) Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 149: 243-253
- Bartek J & Lukas J (2007) DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 19: 238-245
- Baum M, Loeppky RN, Thielen S & Eisenbrand G (2008) Genotoxicity of glycidamide in comparison to 3-N-nitroso-oxazolidin-2-one. *J Agric Food Chem* 56: 5989-5993
- Baute J & Depicker A (2008) A Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43: 239-276
- Bergan T, Dowdall M & Selnaes OG (2008) On the occurrence of radioactive fallout over Norway as a result of the Windscale accident, October 1957. *J Environ Radioact* 99: 50-61
- Blackadder ES & Manderson WG (1975) Occupational absorption of tellurium: a report of two cases *British Journal of Industrial Medicine* 32: 59-61
- Blank M, Sredni B, Albeck M, Mozes E & Shoenfeld Y (1990) The effect of the immunomodulator agent AS101 on interleukin-2 production in systemic lupus erythematosus (SLE) induced in mice by a pathogenic anti-DNA antibody. *Clin Exp Immunol* 79: 443-447
- Blanusa M, Varnai VM, Piasek M & Kostial K (2005) Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. *Curr Med Chem* 12: 2771-2794
- Bock KW, Lipp HP & Bock-Hennig BS (1990) Induction of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics. *Xenobiotica* 20: 1101-1111
- Boiteux S & Guillet M (2004) Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 3: 1-12
- Boles JO, Lebioda L, Dunlap RB & Odum JD (1995) Telluromethionine in structural biochemistry. *Biochem Biotech* 8:29-34
- Borges VC, Nogueira CW, Zeni G & Rocha JB (2004) Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. *Neurochem Res* 29: 1505-1509

- 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
- Borges VC, Rocha JB, Savegnago L & Nogueira CW (2007) Repeated administration of diphenyl ditelluride induces hematological disorders in rats. *Food Chem Toxicol* 45: 1453-1458.
- Borges VC, Savegnago L, Pinton S, Jesse CR, Alves D & Nogueira CW (2008) Vinylic telluride derivatives as promising pharmacological compounds with low toxicity. *J Appl Toxicol* 28: 839-848
- Bradley MO, Bhuyan B, Francis MC, Langenbach R, Peterson A & Huberman E (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res* 87: 81-142
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S & Speit G (2005) The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20: 245-254
- Brito VB (2007) Os efeitos de organocalcogênios e de 2,3-dimercaptopropanol sobre convulsão química e letalidade induzidas por pentilenotetrazol e 4-aminopiridina em camundongos. Santa Maria, Departamento de Química, UFSM 100p (Dissertação de Bioquímica Toxicológica)
- Brodsky M, Yosef S, Galit R, Albeck M, Longo DL, Albeck A & Sredni B (2007) The synthetic tellurium compound, AS101, is a novel inhibitor of IL-1beta converting enzyme. *J Interferon Cytokine Res* 27: 453-462
- Bryant PE, Mozdarani H & Marr C (2008) G2-phase chromatid break kinetics in irradiated DNA repair mutant hamster cell lines using calyculin-induced PCC and colcemid-block. *Mutat Res* 657: 8-12
- Budzowska M & Kanaar R (2009) Mechanisms of dealing with DNA damage-induced replication problems. *Cell Biochem Biophys* 53: 17-31
- Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M & Hartmann A (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutat Res* 627: 31-35
- Butala M, Zgur-Bertok D & Busby SJ (2009) The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell Mol Life Sci* 66: 82-93
- Campa A, Esposito G, Belli M, Simone G & Tabocchini MA (2004) DNA fragmentation in V79 cells irradiated with light ions as measured by pulsed-field gel electrophoresis. II. Simulation with a generalized broken stick model. *Int J Radiat Biol* 80: 229-238

- Castro ME, Molina RC, Díaz WA, Pradenas GA & Vásquez CC (2009) Expression of *Aeromonas caviae* ST pyruvate dehydrogenase complex components mediate tellurite resistance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun. In press*
- Cavalcanti BC, Júnior HV, Selegim MH, Berlinck RG, Cunha GM, Moraes MO & Pessoa C (2008) Cytotoxic and genotoxic effects of tambjamine D, an alkaloid isolated from the nudibranch *Tambja eliora*, on Chinese hamster lung fibroblasts. *Chem Biol Interact* 174: 155-162
- Chasteen TG, Fuentes DE, Tantaleán JC & Vásquez CC (2009) Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol Rev* 1-13
- Chung FL, Komninou D, Zhang L, Nath R, Pan J, Amin S & Richie J (2005) Glutathione depletion enhances the formation of endogenous cyclic DNA adducts derived from t-4-hydroxy-2-nonenal in rat liver. *Chem Res Toxicol* 18: 24-27
- Clarke PR & Allan LA (2009) Cell-cycle control in the face of damage - a matter of life or death. *Trends Cell Biol In press*
- Coles B & Ketterer B (1990) The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 25: 47-70
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26: 249-261
- Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC & Stetina R (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23: 143-151
- Comasseto JV, Ling LW, Petraghani N & Stefani HA (1997) Vinylic selenides and tellurides-preparation, reactivity and synthetic applications. *Synthesis* 4: 373-403
- Cunha RL, Urano ME, Chagas JR, Almeida PC, Bincoletto C, Tersariol IL & Comasseto JV (2005) Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium (IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 755-760
- de Avila DS, Beque MC, Folmer V, Braga AL, Zeni G, Nogueira CW, Soares FA, Rocha JB (2006) Diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate: an organotellurium compound with low toxicity. *Toxicology* 224: 100-107
- de Bruin RA & Wittenberg C (2009) All eukaryotes: before turning off G(1)-S transcription, please check your DNA. *Cell Cycle. 2009 In press*
- Del Rio D, Stewart AJ & Pellegrini N (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15: 316-328

- Deuticke B, Klonek S & Haest CW (1992) Erythrocyte membrane barrier function: role of bilayer polarity and skeletal proteins. *Biochem Soc Trans* 20: 769-773
- Dong Z, Liu J, Mao S, Huang X, Yang B, Ren X, Luo G & Shen J (2004) Aryl thiol substrate 3-carboxy-4-nitrobenzenethiol strongly stimulating thiol peroxidase activity of glutathione peroxidase mimic 2, 2'-ditellurobis(2-deoxy-beta-cyclodextrin). *J Am Chem Soc* 126: 16395-16404
- Dotan Y, Lichtenberg D & Pinchuk I (2004) Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 43: 200-227
- Duckett S (1972) Teratogenesis caused by tellurium. *Ann N Y Acad Sci* 192: 220-226
- Dusinska M & Collins AR (2008) The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23: 191-205
- Ejsing CS, Sampaio JL, Surendranath V, Duchoslav E, Ekroos K, Klemm RW, Simons K & Shevchenko A (2009) Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. *In Press*
- Emanuelli T, Pagel FW, Alves LB, Regner A & Souza DO (2001) 5-Aminolevulinic acid inhibits [<sup>3</sup>H]muscimol binding to human and rat brain synaptic membranes. *Neurochem Res* 26: 101-105
- Engman L, Persson J, Vessman K, Ekström M, Berglund M & Andersson CM (1995) Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. *Free Radic Biol Med* 19: 441-452
- 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
- Engman L, Al-Maharik N, McNaughton M, Birmingham A & Powis G (2003) Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells. *Bioorg Med Chem* 11: 5091-5100
- Estrela JM, Ortega A & Obrador E (2006) Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 43: 143-181
- Fairhill LT (1969) Tellurium. In: *Industrial Toxicology*. Hafner Publishing Co, New York
- Fenech M (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* 455: 81-95
- Fenech M (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600: 58-66
- Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2: 1084-1104

- Forsburg SL (2001) The art and design of genetic screens: yeast. *Nat Rev Genet* 2: 659-668
- Foury F (1997) Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* 195: 1-10
- Frei GM, Kremer M, Hanschmann KM, Krause S, Albeck M, Sredni B & Schnierle BS (2008) Antitumour effects in mycosis fungoides of the immunomodulatory, tellurium-based compound, AS101. *Br J Dermatol* 158: 578-586
- 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: 403-408
- Funchal C, Moretto MB, Vivian L, Zeni G, Rocha JB & Pessoa-Pureur R (2006) Diphenyl ditelluride- and methylmercury-induced hyperphosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit is prevented by organoselenium compounds in cerebral cortex of young rats. *Toxicology* 222: 143-153
- Gajkowska B, Smialek M, Ostrowski RP, Piotrowski P & Frontczak-Baniewicz M (1999) The experimental squalene encephaloneuropathy in the rat. *Exp Toxicol Pathol* 51: 75-80
- Gajski G, Garaj-Vrhovac V & Orescanin V (2008) Cytogenetic status and oxidative DNA-damage induced by atorvastatin in human peripheral blood lymphocytes: standard and Fpg-modified comet assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 231: 85-93
- Garcia O, Romero I, Gonzalez JE & Mandina T (2007) Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutat Res* 627: 186-190
- Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, Melcion C, Nohmi T, Ohta T & Venitt S (1994) Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat Res* 312: 217-233
- Geering K (2008) Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17: 526-532
- Gee P, Maron DM & Ames BN (1994) Detection and classification of mutagens: a set of base-specific *Salmonella* tester strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11606-11610
- Gellon L, Barbey PA, van der Kemp, Thomas D & Boiteux S (2001) Synergism between base excision repair, mediated by the DNA glycosylases Ntg1 and Ntg2, and the nucleotide excision repair in the removal of oxidatively damaged DNA bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 265: 1087-1096
- Gharieb MM & Gadd GM (1998) Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal(loid) tolerance: vacuolar-lacking and -defective mutants of *Saccharomyces*

- cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite. *Biometals* 2: 101-106
- Gibson TA & Goldberg DS (2009) Reverse engineering the evolution of protein interaction networks. *Pac Symp Biocomput* 2009: 190-202
- Gonçalves TL, Benvegnú DM, Bonfanti G, Frediani AV, Pereira DV & Rocha JB (2009) Oxidative stress and delta-ALA-D activity in different conditioning regimens in allogeneic bone marrow transplantation patients. *Clin Biochem In press*
- Goodrum JF (1998) Role of organotellurium species in tellurium neuropathy. *Neurochem Res* 23: 1313-1319
- Green M, Harwood H, Barrowman C, Rahman P, Eggeman A & Fetry F (2007) A facile route to CdTe nanoparticles and their use in bio-labelling. *J Mater Chem* 17:1989–1994
- Guan ZZ (2008) Cross-talk between oxidative stress and modifications of cholinergic and glutaminergic receptors in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol Sin* 29: 773-780
- Guecheva T, Henriques JA & Erdtmann B (2001) Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian *in vivo*, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutat Res* 497: 19-27
- Guillamet E, Creus A, Farina M, Sabbioni E, Fortaner S & Marcos R (2008) DNA-damage induction by eight metal compounds in TK6 human lymphoblastoid cells: results obtained with the alkaline Comet assay. *Mutat Res* 654: 22-28
- Hakura A, Shimada H, Nakajima M, Sui H, Kitamoto S, Suzuki S & Satoh T (2005) *Salmonella*/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. *Mutagenesis* 20: 217-228
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
- Hanawalt PC & Spivak G (2008) Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 958-970
- Hannan MA & Nasim A (1978) Mutagenicity and recombinogenicity of daunomycin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Lett* 5: 319-324
- Hartmann A, Elhajouji A, Kiskinis E, Poetter F, Martus H, Fjallman A, Frieauff W & Suter W (2001) Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 39: 843-858
- Hassan W, Ibrahim M, Nogueira CW, Braga AL, Deobald AM, Mohammadzai IU & Rocha JB (2008) Influence of pH on the reactivity of diphenyl ditelluride with thiols and anti-oxidant potential in rat brain. *Chem Biol Interact In press*

- Hendry LB, Mahesh VB, Bransome ED Jr & Ewing DE (2007) Small molecule intercalation with double stranded DNA: implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. *Mutat Res* 623: 53-71
- Herrero E, Ros J, Bellí G & Cabisco E (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1780: 1217-1235
- Higuchi Y, McTiernan CF, Frye CB, McGowan BS, Chan TO & Feldman AM (2004) Tumor necrosis factor receptors 1 and 2 differentially regulate survival, cardiac dysfunction, and remodeling in transgenic mice with tumor necrosis factor-alpha-induced cardiomyopathy. *Circulation* 109: 1892-1897
- Hoang BX, Levine SA, Pham P & Shaw DG (2007) Hypothesis of the cause and development of neoplasms. *Eur J Cancer Prev* 16: 55-61
- Houtgraaf JH, Versmissen J & van der Giessen WJ (2006) A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med* 7: 165-172
- Huang X, Liu Y, Liang K, Tang Y & Liu J (2008) Construction of the active site of glutathione peroxidase on polymer-based nanoparticles. *Biomacromolecules* 9: 1467-1473
- Hwang ES & Kim GH (2007) Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxicology* 229: 1-10
- Irons DJ (2009) Logical analysis of the budding yeast cell cycle. *J Theor Biol In Press*
- Iwase K, Tatsuishi T, Nishimura Y, Yamaguchi JY, Oyama Y, Miyoshi N & Wada M (2004) Cytometric analysis of adverse action of diphenyl ditelluride on rat thymocytes: cell shrinkage as a cytotoxic parameter. *Environ Toxicol* 19: 614-619
- Jacob C, Arteel GE, Kanda T, Engman L & Sies H (2000) Water-soluble organotellurium compounds: catalytic protection against peroxynitrite and release of zinc from metallothionein. *Chem Res Toxicol* 13: 3-9
- Jagetia A, Jagetia GC & Jha S (2007) Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival. *J Appl Toxicol* 27: 122-132
- Janion C (2008) Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci* 4: 338-344
- Jeggo PA & Lobrich M (2006) Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair* 5: 1192-1198
- Juchimiuk J, Gnys A & Maluszynska J (2006) DNA damage induced by mutagens in plant and human cell nuclei in acellular comet assay. *Folia Histochem Cytobiol* 44: 127-131

- Kalechman Y & Sredni B (1996) Differential effect of the immunomodulator AS101 on B7-1 and B7-2 costimulatory molecules: role in the antitumoral effects of AS101. *J Immunol* 157: 589-597
- 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: 24724-24732
- Kanski J, Drake J, Aksenova M, Engman L & Butterfield DA (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
- Karpinets TV & Foy BD (2005) Tumorigenesis: the adaptation of mammalian cells to sustained stress environment by epigenetic alterations and succeeding matched mutations. *Carcinogenesis* 26: 1323-1334
- Kaur P, Yousuf S, Ansari MA, Ahmad AS & Islam F (2003) Dose- and duration-dependent alterations by tellurium on lipid levels: differential effects in cerebrum, cerebellum, and brain stem of mice. *Biol Trace Elem Res* 94: 259-271
- Kalweit S, Utesch D, von der Hude W & Madle S (1999) Chemically induced micronucleus formation in V79 cells--comparison of three different test approaches. *Mutat Res* 439: 183-190
- Keenan PO, Knight AW, Billinton N, Cahill PA, Dalrymple IM, Hawkyard CJ, Stratton-Campbell D & Walmsley RM (2007) Clear and present danger? The use of a yeast biosensor to monitor changes in the toxicity of industrial effluents subjected to oxidative colour removal treatments. *J Environ Monit* 9: 1394-1401
- Kilbey BJ (1975) Mutagenesis in yeast. *Methods Cell Biol* 12: 209-231
- Kim E, Giese A & Deppert W (2009) Wild-type p53 in cancer cells: when a guardian turns into a blackguard. *Biochem Pharmacol* 77: 11-20
- Kim KT, Yoo KM, Lee JW, Eom SH, Hwang IK & Lee CY (2007) Protective effect of steamed American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on V79-4 cells induced by oxidative stress. *J Ethnopharmacol* 111: 443-450
- Kirpnick Z, Homiski M, Rubitski E, Repnevskaya M, Howlett N, Aubrecht J & Schiestl RH (2005) Yeast DEL assay detects clastogens. *Mutat Res* 582: 116-134
- Klinner U & Schafer B (2004) Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 28: 201-223

- Knight AW, Billinton N, Cahill PA, Scott A, Harvey JS, Roberts KJ, Tweats DJ, Keenan PO & Walmsley RM (2007) An analysis of results from 305 compounds tested with the yeast RAD54-GFP genotoxicity assay (GreenScreen GC)-including relative predictivity of regulatory tests and rodent carcinogenesis and performance with autofluorescent and coloured compounds. *Mutagenesis* 22: 409-416
- Kormutakova R, Klucar L & Turna J (2000). DNA sequence analysis of the tellurite-resistance determinant from clinical strain of *Escherichia coli* and identification of essential genes. *BioMetals* 13: 135–139
- Kovalev GK (1969) Determination of drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* by means of potassium tellurite *Antibiotiki* 14: 323-325
- Kron T, Hansen C & Werner E (1991) Renal excretion of tellurium after peroral administration of tellurium in different forms to healthy human volunteers. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 5: 239-244
- Ku WW, Bigger A, Brambilla G, Glatt H, Gocke E, Guzzie PJ, Hakura A, Honma M, Martus HJ, Obach RS, Roberts S & Strategy Expert Group, IWGT (2007) Strategy for genotoxicity testing--metabolic considerations. *Mutat Res* 627: 59-77
- Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP & Jha AN (2007) Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* 25: 53-64
- Laden BP, Tang Y, Porter TD (2000) Cloning, heterologous expression, and enzymological characterization of human squalene monooxygenase. *Arch Biochem Biophys* 374: 381-388
- Laden BP & Porter TD (2001) Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J Lipid Res* 42: 235-40
- Lafon A, Chang CS, Scott EM, Jacobson SJ & Pillus L (2007) MYST opportunities for growth control: yeast genes illuminate human cancer gene functions. *Oncogene* 26: 5373-5384
- Larner AJ (1995) Biological effects of tellurium: a review. *Trace Elem Electrolytes* 12: 26–31
- Lee RF & Steinert S (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res* 544: 43-64
- Le Meur N & Gentleman R (2008) Modeling synthetic lethality. *Genome Biol* 9: R135
- Leonetti C & Zupi G (2007) Targeting different signaling pathways with antisense oligonucleotides combination for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 13: 463-470

- Levin DE, Hollstein M, Christman MF, Schwiers EA & Ames BN (1982) A new Salmonella tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79: 7445-7449
- Levin DE, Yamasaki E & Ames BN (1982b) A new Salmonella tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutat Res* 94: 315-330
- Lichten M (2008) Genomics: Thoroughly modern meiosis. *Nature* 454: 421-422
- Liu X, Kramer JA, Swaffield JC, Hu Y, Chai G & Wilson AG (2008) Development of a highthroughput yeast-based assay for detection of metabolically activated genotoxins. *Mutat Res* 653: 63-69
- Lorenz DR, Cantor CR & Collins JJ (2009) A network biology approach to aging in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1145-1150
- Luch A (2005) Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 5: 113-125
- Maciel EN, Bolzan RC, Braga AL & Rocha JB (2000) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* 14: 310-319
- Malmström J, Jonsson M, Cotgreave IA, Hammarström L, Sjödin M, Engman L (2001) The antioxidant profile of 2,3-dihydrobenzo[b]furan-5-ol and its 1-thio, 1-seleno, and 1-telluro analogues. *J Am Chem Soc* 123: 3434-3440
- Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424: 83-95
- Marnett LJ & Plastaras JP (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet* 17: 214-221
- Maron DM & Ames BN (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215
- McCue PP & Phang JM (2008) Identification of Human Intracellular Targets of the Medicinal Herb St. John's Wort by Chemical-Genetic Profiling in Yeast. *J Agric Food Chem In Press*
- McLain VC (2008) Final report of the addendum to the safety assessment of n-butyl alcohol as used in cosmetics. *Int J Toxicol* 27 Suppl 2: 53-69
- Meadows KL, Song B & Doetsch PW (2003) Characterization of AP lyase activities of *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: implications for biological function. *Nucleic Acids Res* 31: 5560-5567

- Menacho-Marquez M & Murguia JR (2007) Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol* 9: 221-228
- Menotta M, Pierleoni R, Amicucci A, Sisti D, Cerasi A, Millo E, Chiarantini L & Stocchi V (2006) Characterization and complementation of a Fus3/Kss1 type MAPK from *Tuber borchii*, TBMK. *Mol Genet Genomics* 276: 126-134
- Meotti FC, Borges VC, Zeni G, Rocha JB & Nogueira CW (2003) Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett* 143: 9-16
- Migliore L, Cocchi L, Nesti C & Sabbioni E (1999) Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. *Environ Mol Mutagen* 34: 279–284
- Miller-Fleming L, Giorgini F & Outeiro TF (2008) Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnol J* 3: 325-338
- Mirkes PE (1998) Cyclophosphamide teratogenesis: a review. *Teratog Carcinog Mutagen* 5: 75-88
- Miyagoshi M & Fujikawa-Yamamoto K (2006) The reversion to diploid cells from established triploid V79 cells. *Cell Prolif* 39: 421-428
- Mizuno R (1969) Electron microscopic study on the cerebral cortex of rabbits intoxicated with tellurium. *Yokohama Med J* 20: 101-121
- Morgan DL, Shines CJ, Jeter SP, Blazka ME, Elwell MR, Wilson RE, Ward SM, Price HC & Moskowitz PD (1997) Comparative pulmonary absorption, distribution, and toxicity of copper gallium diselenide, copper indium diselenide, and cadmium telluride in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 147: 399-410
- Moretto MB, Funchal C, Zeni G, Rocha JB & 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
- Moretto MB, Boff B, Franco J, Posser T, Roessler TM, Souza DO, Nogueira CW, Wofchuk S & Rocha JB (2007)  $(45)\text{Ca}(2+)$  influx in rat brain: effect of diorganylchalcogenides compounds. *Toxicol Sci* 99: 566-571
- Mortelmans K & Zeiger E (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 455: 29-60
- Mortelmans K (2006) Isolation of plasmid pKM101 in the Stocker laboratory. *Mutat Res* 612: 151-164
- Müller P (2006) Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res* 612: 84-104

- Müller P (2006b) The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98: 336-345
- Mustacchi R, Hohmann S & Nielsen J (2006) Yeast systems biology to unravel the network of life. *Yeast* 23: 227-238
- Muñiz Alvarez JL, García Calzón JA & López Fonseca JM (2005) Electrochemistry of diphenylditelluride at the hanging mercury drop electrode in a protic medium. *J Colloid Interface Sci* 287: 592-596
- Nakagawa K, Hidaka T, Kitano M, Asakura M, Kamigaito T, Noguchi T & Hosoe K (2008) Genotoxicity studies on licorice flavonoid oil (LFO). *Food Chem Toxicol* 46: 2525-2532
- Natarajan AT & Palitti F (2008) DNA repair and chromosomal alterations. *Mutat Res* 657: 3-7
- Newman RA, Osborn S & Siddik ZH. (1989) Determination of tellurium in biological fluids by means of electrothermal vapourization-inductively coupled to plasma mass spectrometry (ETV-ICP-MS). *Clin Chim Acta* 179:191–196
- Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE & Marnett LJ (2003) Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem* 278: 31426-31433
- Nishiyama H, Watanabe J & Ogawa O (2008) p53 and chemosensitivity in bladder cancer. *Int J Clin Oncol* 13: 282-286
- 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
- Nogueira CW, Rotta LN, Zeni G, Souza DO & Rocha JB (2002) Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* 27: 283-288
- Nogueira CW, Borges VC, Zeni G & Rocha JB (2003) Organochalcogens effects on delta-aminolevulinatase activity from human erythrocytic cells *in vitro*. *Toxicology* 191: 169-178
- Nogueira CW, Zeni G & Rocha JB (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104: 6255-6285
- Nyska A, Waner T, Pirak M, Albeck M & Sredni B (1989) Toxicity study in rats of a tellurium based immunomodulating drug, AS-101: a potential drug for AIDS and cancer patients. *Arch Toxicol* 63: 386-393

- Oda T (2006) Effects of 2'-demethoxy-2'-propoxygriseofulvin on microtubule distribution in Chinese hamster V79 cells. *J Antibiot (Tokyo)* 59: 114-116
- Ogra Y, Kitaguchi T, Suzuki N & Suzuki KT (2008a) *In vitro* translation with [34S]-labeled methionine, selenomethionine, and telluromethionine. *Anal Bioanal Chem* 390:45-51
- Ogra Y, Kobayashi R, Ishiwata K & Suzuki KT (2008b) Comparison of distribution and metabolism between tellurium and selenium in rats. *J Inorg Biochem* 102:1507-1513
- Okun E, Dikshtein Y, Carmely A, Saida H, Frei G, Sela BA, Varshavsky L, Ofir A, Levy E, Albeck M & Sredni B (2007) The organotellurium compound ammonium trichloro(dioxoethylene-0,0') tellurate enhances neuronal survival and improves functional outcome in an ischemic stroke model in mice. *J Neurochem* 102: 1232-1241
- Okun E, Dikshtein Y, Carmely A, Saida H, Frei G, Sela BA, Varshavsky L, Ofir A, Levy E, Albeck M & Sredni B (2007b) The organotellurium compound ammonium trichloro(dioxoethylene-o,o')tellurate reacts with homocysteine to form homocystine and decreases homocysteine levels in hyperhomocysteinemic mice. *FEBS J* 274: 3159-3170
- Olive PL & Banáth JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1: 23-29
- Osada Y, Kumagai T, Masuda K, Suzuki T & Kanazawa T (2005) Mutagenicity evaluation of *Schistosoma* spp. extracts by the umu-test and V79/HGPRT gene mutation assay. *Parasitol Int* 54: 29-34
- Osborn MJ & Miller JR (2007) Rescuing yeast mutants with human genes. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6: 104-111
- Ouyang Y, Xu Q, Mitsui K, Motizuki M & Xu Z (2009) Human trehalase is a stress responsive protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 621-625
- Pages V & Fuchs RP (2002) How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene* 21: 8957-8966
- Parrella E & Longo VD (2008) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* to study mitochondrial dysfunction and disease. *Methods* 46: 256-262
- Parsons AB, Geyer R, Hughes TR & Boone C (2003) Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation. *Prog Cell Cycle Res* 5: 159-166
- Pasqual M, Lauer C, Moyna P & Henriques JA (1993) Genotoxicity of the isoquinoline alkaloid berberine in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Mut Res* 286: 243-252.

- Pastwa E & Blasiak J (2003) Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Polonica* 50: 891-908
- Pathak R, Dey SK, Sarma A & Khuda-Bukhsh AR (2007) Genotoxic effects in M5 cells and Chinese hamster V79 cells after exposure to <sup>7</sup>Li-beam (LET=60 keV/microm) and correlation of their survival dynamics to nuclear damages and cell death. *Mutat Res* 628: 56-66
- Pena-Castillo L & Hughes TR (2007) Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? *Genetics* 176: 7-14
- Pennacchia C, Blaiotta G, Pepe O & Villani F (2008) Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. *Appl Microbiol* 105: 1919-1928
- Penninckx MJ (2002) An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res* 2: 295-305
- Perocchi F, Mancera E & Steinmetz LM (2008) Systematic screens for human disease genes, from yeast to human and back. *Mol Biosyst* 4: 18-29
- Persike DS, Cunha RL, Juliano L, Silva IR, Rosim FE, Vignoli T, Dona F, Cavaleiro EA & Fernandes MJ (2008) Protective effect of the organotelluroxetane RF-07 in pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis* 3: 120-126
- Petragani N *Comprehensive Organometallic ChemistryII*. Mckillop A. (ed). Pergamon Press, Exeter, UK 1995
- Podgórska B, Pazdro K & Wegrzyn G (2007) The use of the *Vibrio harveyi* luminescence mutagenicity assay as a rapid test for preliminary assessment of mutagenic pollution of marine sediments. *J Appl Genet* 48: 409-412
- Ramadan SE, Razak AA, Ragab AM & el-Meleigy M (1989) Incorporation of tellurium into amino acids and proteins in a tellurium-tolerant fungi. *Biol Trace Elem Res* 20:225-232
- Remondo C, Cereda V, Mostböck S, Sabzevari H, Franzusoff A, Schlom J & Tsang KY (2009) Human dendritic cell maturation and activation by a heat-killed recombinant yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) vector encoding carcinoembryonic antigen. *Vaccine* 27: 987-994
- Ren X, Xue Y, Liu J, Zhang K, Zheng J, Luo G, Guo C, Mu Y, Shen J (2002) A novel cyclodextrin-derived tellurium compound with glutathione peroxidase activity. *Chembiochem* 3: 356-363
- Rezanka T & Sigler K (2008) Biologically active compounds of semi-metals. *Phytochemistry* 69:585-606

- Roman SS, Nava A, Favero AM, Weis SN, Zeni G, Rocha JB & Nogueira CW (2007) Diphenyl ditelluride effect on embryo/fetal development in mice: interspecies differences. *Toxicology* 231:243-249
- Rooseboom M, Vermeulen NP, Durgut F & Commandeur JN (2002) Comparative study on the bioactivation mechanisms and cytotoxicity of Te-phenyl-L-tellurocysteine, Se-phenyl-L-selenocysteine, and S-phenyl-L-cysteine. *Chem Res Toxicol* 15: 1610-1618
- Roos WP & Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12: 440-450
- Rosa RM, Sulzbacher K, Picada JN, Roesler R, Saffi J, Brendel M & Henriques JA (2004) Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. *Mutat Res* 563: 107-115
- Rosa RM, de Oliveira RB, Saffi J, Braga AL, Roesler R, Dal-Pizzol F, Moreira JC, Brendel M & Henriques JA (2005) Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. *Life Sci* 77: 2398-2411.
- Rosa RM, Picada JD, Saffi J & Henriques JA (2007) Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutat Res* 628: 87-98
- Rossato JI, Ketzer LA, Centurião FB, Silva SJ, Lüdtke DS, Zeni G, Braga AL, Rubin MA & Rocha JB (2002) Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res* 27: 297-303
- Roy M, Sinha D, Mukherjee S, Paul S & Bhattacharya RK (2008) Protective effect of dietary phytochemicals against arsenite induced genotoxicity in mammalian V79 cells. *Indian J Exp Biol* 46: 690-697
- Sailer BL, Liles N, Dickerson S & Chasteen TG (2003) Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Arch Toxicol* 77: 30-36
- Sailer BL, Liles N, Dickerson S, Sumners S & Chasteen TG (2004) Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicol In Vitro* 18: 475-482
- Sakai A, Iwase Y, Nakamura Y, Sasaki K, Tanaka N & Umeda M (2002) Use of a cell transformation assay with established cell lines, and a metabolic cooperation assay with V79 cells for the detection of tumour promoters: a review. *Altern Lab Anim* 30: 33-59
- Savegnago L, Borges VC, Alves D, Jesse CR, Rocha JB & Nogueira CW (2006) Evaluation of antioxidant activity and potential toxicity of 1-buthyltelurenyl-2-methylthioheptene. *Life Sci* 79:1546-1552

- Scansetti G (1992) Exposure to metals that have recently come into use. *Science Total Environ* 120: 85-91
- Schiar VP, Dos Santos DB, Paixão MW, Nogueira CW, Rocha JB & 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
- Schneider K, Kromer JO, Wittmann C, Alves-Rodriguez I, Meyerhans A, Diez J & Heinzle E (2009) Metabolite profiling studies in *Saccharomyces cerevisiae*: an assisting tool to prioritize host targets for antiviral drug screening. *Microb Cell Fact* 8: 12
- Schöner D, Kalisch M, Leisner C, Meier L, Sohrmann M, Faty M, Barral Y, Peter M, Gruissem W & Bühlmann P (2008) Annotating novel genes by integrating synthetic lethals and genomic information. *BMC Syst Biol* 2: 3
- Seiple L, Jaruga P, Dizdaroglu M & Stivers JT (2006) Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast. *Nucleic Acids Res* 34: 140-151
- Shaposhnikov SA, Salenko VB, Brunborg G, Nygren J & Collins AR (2008) Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments? *Electrophoresis* 29: 3005-3012
- Sheikh-Hamad D, Timmins K & Jalali Z (1997) Cisplatin-induced renal toxicity: possible reversal by N-acetylcysteine treatment. *J Am Soc Nephrol* 8: 1640-1644
- Shelby MD, Zeiger E & Tennant RW (1988) Commentary on the status of short-term tests for chemical carcinogens. *Environ Mol Mutagen* 11: 437-441
- Shibasaki S, Maeda H & Ueda M (2009) Molecular display technology using yeast--arming technology. *Anal Sci* 25: 41-49
- Shin JS, Kang KA, Kim ES, Zhang R, Piao MJ, Ko DO, Wang ZH, Maeng YH, Eun SY, Chae S, Chung HS & Hyun JW (2008) Cytoprotective activity of anaphenone against oxidative stress-induced apoptosis in V79-4 lung fibroblast cells. *Cell Biol Int* 32: 1099-1107
- Shohat B, Kozenitzki L, David M, Albeck M & Sredni B (1993) Effect of UVB and AS101 on interleukin-2 production and helper activity in psoriatic patients. *Nat Immun* 12: 50-55
- Siddik ZH & Newman RA (1988) Use of platinum as a modifier in the sensitive detection of tellurium in biological samples. *Anal Biochem* 172:190-196
- Siliprandi D & Storey DT (1973) Interaction of tellurite with the respiratory chain in rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 29: 101-114

- Slamenova D, Horvathova E, Sramkova M & Marsalkova L (2007) DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. *Neoplasma* 54: 108-112
- Smart DJ, Halicka HD, Schmuck G, Traganos F, Darzynkiewicz Z & Williams GM (2008) Assessment of DNA double-strand breaks and gammaH2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. *Mutat Res* 641: 43-47
- Snyder RD & Arnone MR (2002) Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using the V79 in vitro micronucleus assay. *Mutat Res* 503: 21-35
- Soares DG, Poletto NP, Bonatto D, Salvador M, Schwartzmann G & Henriques JA (2005) Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways. *Biochem Pharmacol* 70: 59-69
- Speit G, Schütz P, Bonzheim I, Trenz & Hoffmann H (2004) Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett* 146: 151- 158
- Speit G, Schütz P & Hoffmann H (2007) Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible. *Mutat Res* 626: 42-47
- Sredni B, Caspi RR, Lustig S, Klein A, Kalechman Y, Danziger Y, Ben Ya'akov M, Tamari T, Shalit F & Albeck M (1988) The biological activity and immunotherapeutic properties of AS-101, a synthetic organotellurium compound. *Nat Immun Cell Growth Regul* 7: 163-168
- Sredni B, Kalechman Y, Albeck M, Gross O, Aurbach D, Sharon P, Sehgal SN, Gurwith MJ & Michlin H (1990) Cytokine secretion effected by synergism of the immunomodulator AS101 and the protein kinase C inducer bryostatin. *Immunology* 70: 473-477
- Sredni B, Gal R, Cohen IJ, Dazard JE, Givol D, Gafter U, Motro B, Eliyahu S, Albeck M, Lander HM & Kalechman Y (2004) Hair growth induction by the Tellurium immunomodulator AS101: association with delayed terminal differentiation of follicular keratinocytes and ras-dependent up-regulation of KGF expression. *FASEB J* 18: 400-402
- Sredni-Kenigsbuch D, Shohat M, Shohat B, Ben-Amitai D, Chan CC & David M (2008) The novel tellurium immunomodulator AS101 inhibits interleukin-10 production and p38 MAPK expression in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 50: 232-235
- Srivastava RC, Srivastava R, Srivastava TN & Jain SP (1983) Effect of organo-tellurium compounds on the enzymatic alterations in rats. *Toxicol Lett* 16: 311-316

- Stangherlin EC, Favero AM, Zeni G, Rocha JB & Nogueira CW (2005) Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. *Toxicology* 207: 231-239
- Stangherlin EC, Favero AM, Zeni G, Rocha JB & Nogueira CW (2006) Exposure of mothers to diphenyl ditelluride during the suckling period changes behavioral tendencies in their offspring. *Brain Res Bull* 69: 311-317
- Stangherlin EC, Ardais AP, Rocha JB & Nogueira CW (2008) Exposure to diphenyl ditelluride, via maternal milk, causes oxidative stress in cerebral cortex, hippocampus and striatum of young rats. *Arch Toxicol*
- Stangherlin EC, Rocha JB & Nogueira CW (2009) Diphenyl ditelluride impairs short term memory and alters neurochemical parameters in young rats. *Pharmacol Biochem Behav* 91: 430-435
- Sturgeon CM, Kemmer D, Anderson HJ & Roberge M (2006) Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnol J* 1: 289-298
- Sun X, Wong JR, Song K & Chen LB (1996) Anticarcinoma activity of a novel drug, 3-ethyl-3'-methyl-thiatelluracarboxyanine iodide (Te), a tellurium-containing cyanine targeted at mitochondria. *Clin Cancer Res* 2: 1335-1340
- Swartz CD, Parks N, Umbach DM, Ward WO, Schaaper RM & DeMarini DM (2007) Enhanced mutagenesis of *Salmonella* tester strains due to deletion of genes other than *uvrB*. *Environ Mol Mutagen* 48: 694-705
- Szeto YT, Benzie IF, Collins AR, Choi SW, Cheng CY, Yow CM & Tse MM (2005) A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutat Res* 578: 371-381
- Taylor A (1996) Biochemistry of tellurium. *Biol Trace Elem Res* 55: 231-239
- Tiano L, Fedeli D, Santroni AM, Villarini M, Engman L & Falcioni G (2000) Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress *in vitro*. *Mutat Res* 464: 269-277
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC & Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221
- Tice RR & Strauss GH (1995) The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13: 207-214
- Toews AD, Roe EB, Goodrum JF, Bouldin TW, Weaver J, Goines ND & Morell P (1997) Tellurium causes dose-dependent coordinate down-regulation of myelin gene expression. *Brain Res Mol Brain Res* 49: 113-119

- Toptchieva A, Sisson G, Bryden LJ, Taylor DE & Hoffman PS (2003) An inducible tellurite-resistance operon in *Proteus mirabilis*. *Microbiology* 149:1285-95
- Toussaint M & Conconi A (2006) High-throughput and sensitive assay to measure yeast cell growth: a bench protocol for testing genotoxic agents. *Nat Protoc* 1: 1922-1928
- Toussaint M, Levasseur G, Gervais-Bird J, Wellinger RJ, Elela SA & Conconi A (2006) A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures. *Mutat Res* 606: 92-105
- Valente AX, Roberts SB, Buck GA & Gao Y (2009) Functional organization of the yeast proteome by a yeast interactome map. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 1490-1495
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ & Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266: 37-56
- VanderVeen LA, Hashim MF, Shyr Y & Marnett LJ (2003) Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14247-14252
- Vannier B (1989) Relation of mutagenicity and teratogenicity. *J Toxicol Clin Exp* 9: 27-40
- Vasconcellos MC, Rosa RM, Machado MS, Villela IV, Crotti AE, Lopes JL, Pessoa C, de Moraes MO, Lopes NP, Costa-Lotufo LV, Saffi J & Henriques JA (2007) Genotoxicity of 15-deoxygogoyazensolide in bacteria and yeast. *Mutat Res* 631: 16-25
- Villela IV, de Oliveira IM, Silveira JC, Dias JF, Henriques JA & da Silva J (2007) Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutat Res* 628:76-86
- von der Hude W, Kalweit S, Engelhardt G, McKiernan S, Kasper P, Slacik-Erben R, Miltenburger HG, Honarvar N, Fahrig R, Görlitz B, Albertini S, Kirchner S, Utesch D, Pötter-Locher F, Stopper H & Madle S (2000) *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. *Mutat Res* 468: 137-163
- Vyskocil F (1979) The regulatory role of membrane Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in non-quantal release of transmitter at the neuromuscular junction. *Prog Brain Res* 49: 183-189
- Wakeford R (2007) The Windscale reactor accident--50 years on. *J Radiol Prot* 27:211-215
- Wang C, Ma Q & Su X (2008) Synthesis of CdTe nanocrystals with mercaptosuccinic acid as stabilizer. *J Nanosci Nanotechnol*. 8: 4408-4414
- Wang L, Roy SK & Eastmond DA (2007) Differential cell cycle-specificity for chromosomal damage induced by merbarone and etoposide in V79 cells. *Mutat Res* 616: 70-82

- Wee KB, Surana U & Aguda BD (2009) Oscillations of the p53-Akt network: implications on cell survival and death. *PLoS ONE In press*
- Wieslander E, Engman L, Svensjö E, Erlansson M, Johansson U, Linden M, Andersson CM & Brattsand R (1998) Antioxidative properties of organotellurium compounds in cell systems. *Biochem Pharmacol* 55: 573-584
- Wils D, Scheuplein RJ, Deremaux L & Looten PH (2008) Safety profile of a food dextrin: acute oral, 90-day rat feeding and mutagenicity studies. *Food Chem Toxicol* 46: 3254-32561
- Wilson A, Thompson H, Schedin P, Gibson N & Ganther H (1992) Effect of methylated forms of selenium on cell viability and the induction of DNA strand breakage. *Biochem Pharmacol* 43:1137-1141
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH & Loeb LA (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 14: 473-486
- Wu CY, Bird AJ, Chung LM, Newton MA, Winge DR & Eide DJ (2008) Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 9: 370
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR & Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492
- Yamada T, Jung DY, Sawada R, Matsuoka A, Nakaoka R & Tsuchiya T (2008) Effects intracerebral microinjection and intraperitoneal injection of fullerene on brain functions differ in rats. *J Nanosci Nanotechnol* 8: 3973-80
- Yarema MC & Curry SC (2005) Acute tellurium toxicity from ingestion of metal-oxidizing solutions. *Pediatrics* 116: 319-321
- Yoshida R, Kitamura D & Maenosono S (2009) Mutagenicity of water-soluble ZnO nanoparticles in Ames test. *J Toxicol Sci* 34: 119-122
- Yu L, He K, Chai D, Yang C & Zheng O (1993) Evidence for telluroamino acid in biological materials and some rules for assimilation of inorganic tellurium by yeast. *Anal Biochem* 209:318-322
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J & Ahmad M (2003) Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60: 6-20
- Zeni G, Braga AL & Stefani HA (2003) Palladium-catalyzed coupling of sp<sup>2</sup>-hybridized tellurides. *Accounts Chem Res* 10: 731-738
- Zhang H & Swihart MT (2007) Synthesis of tellurium dioxide nanoparticles by spray pyrolysis. *Chem Mater* 19:1290-1301

Zhang R, Kang KA, Piao MJ, Ko DO, Wang ZH, Lee IK, Kim BJ, Jeong IY, Shin T, Park JW, Lee NH & Hyun JW (2008) Eckol protects V79-4 lung fibroblast cells against gamma-ray radiation-induced apoptosis via the scavenging of reactive oxygen species and inhibiting of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway. *Eur J Pharmacol* 591(1-3): 114-123

Zimmermann FK (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 31: 71-86

Zimmermann FK & Vig BK (1975) Mutagen specificity in the induction of mitotic crossing-over in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 139: 255-268

Zimmermann FK, von Borstel RC, von Halle ES, Parry JM, Siebert D, Zetterberg G, Barale R & Loprieno N (1984) Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 133: 199-244

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)