



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

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DO DITELURETO DE DIFENILA
EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL

ANDRÉ LUIZ MENDES JUCHEM

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre

2016

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DO DITELURETO DE DIFENILA
EM CÉLULAS DE CÂNCER COLO RETAL**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em **Genética e Biologia Molecular**.

ANDRÉ LUIZ MENDES JUCHEM

Orientador: João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre
2016

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reparação de DNA em Eucariotos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e orientado pelo professor João Antonio Pêgas Henriques. O projeto foi subsidiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). A redação fundamentou-se nas recomendações do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular desta universidade.

*When the rain fell
And the flood came
And the wind blew hard like a hammer on these walls
We didn't crack or break or fall
We built this house on a Rock*

- **Klaus Meine**

-

Agradecimentos

Primeiramente devo agradecer as pessoas que são as responsáveis por tornar possível toda minha formação acadêmica e profissional, aos meus pais Eliane Norma Wagner Mendes e Pedro Luiz Juchem. Sem essas pessoas, que foram os primeiros professores doutores nas quais tive contato, me inspirando, educando e orientando ao longo de minha vida. A minha avó Norma Emilia Wagner Mendes, que mesmo após sua partida continuou a me ajudar. Ao meu irmão Luiz Artur Mendes Juchem, que fez parte de toda minha vida. Meu avô José Vicente Juchem. A minha jovem sobrinha Luana que trouxe alegria e vida para a família.

Ao meu orientador, professor João Antonio Pêgas Henriques, por ter me dado privilégio de fazer parte do seu grupo de pesquisa, provido orientação e ensino na minha carreira.

Aos colaboradores do projeto Miriana Machado e Iuri Marques de Oliveira por todo o apoio, amizade e participação no meu trabalho. Ao meu colega Cristiano Trindade que sempre me orientou e participou ativamente de minhas de minhas oportunidades de processo de formação. A Nucha por sempre contribuir, colaborar e orientar. A todos os colegas de profissão do laboratório Genotox, uma parte memorável de minha carreira profissional ter feito parte dessa equipe de ponta: Henriques, Nucha, Miriana, Miriam e Izabel (ex e futuros chefes); Márcia, Valéria, Jaqueline e Cristiano. A todos os meus colegas de laboratório (Lab. 210) Michelle, Victoria, Grehtel, Lyda, José, Larissa, Bruna, Priscila, Samia e Milena pela amizade, festas, cervejadas e coleguismo. Aos colaboradores do trabalho Jaqueline Rocha e Claus Pich. Professor Cláudio, por ter cedido espaço para meu estágio supervisionado. A professora Jennifer Saffi e Jaqueline Moura, que cederam espaço no laboratório para meus experimentos finais.

Fundamental eu agradece aos meus primos/amigos Henry Juchem, Felipe Juchem e Leonardo Juchem que fizeram parte de minha formação pessoal com altas filosofias e momentos memoráveis. Onde passamos e passaremos momentos fáceis e difíceis mas contando com apoio. Digo o mesmo a todos os meus primos Vinícios, Marcus, Paulinha, Erika, Alessandra, Gabriela, Xandico, e Leandro. Aos meus tios Jacob (força), Miguel (sucesso e bom humor) e Vitor (determinação). A toda minha família.

Ao meu amigo/irmão Daniel Siwik, onde é possível encontrar toda amizade e inspiração pessoal; ao meu amigo/irmão Bruno Mendelski que nunca deixa seus amigos - pois sem vocês tudo teria sido bem mais complicado. Ao Guilherme Gattino, amigo ex-parceiro de banda.

A Marina Borges que me acompanhou na fase mais crítica de meu mestrado. Aos meus amigos de banda Mártin Konzen, Maurício Santos e Júlio Silva que tornaram meu segundo ano de mestrado bem menos estressante. Ao *sen sei* Hélio Bandeira, sempre um mentor na vida de seus alunos.

Sumário

| | |
|--|----|
| Índice de Figuras | 9 |
| Índice de Tabelas | 10 |
| Lista de Siglas e Abreviatura | 11 |
| Resumo | 13 |
| Abstract | 15 |
| 1. Introdução | |
| 1.1. Introdução Geral | 16 |
| 1.2. Câncer Colorretal – Aspectos Gerais | 18 |
| 1.3. Tratamento | 21 |
| 1.4. Compostos Organotelurados | 24 |
| 1.5. Ditelureto de Difenila | 27 |
| 1.6. Ciclo Celular e Genotoxicidade | 29 |
| 2. Objetivos | |
| 2.1 Objetivo Geral | 36 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 36 |
| Capítulo I - Antiproliferative, Genotoxic and Cell Cycle Arrest Effects of Diphenyl Ditelluride in Human Colon Cancer Cells | 37 |
| 3. Resultados Complementares | |
| 3.1. Avaliação da inibição de Topoll pelo métodoTARDIS | 62 |
| 3.1.1. Metodologia | 63 |
| 3.1.2. Resultados | 64 |
| 4. Discussão | 68 |
| 5. Conclusões | |
| 5.1. Conclusão Geral | 74 |
| 5.2. Conclusões Específicas | 75 |

| | |
|---|--------|
| 6. Perspectivas | |
| 6.1. Perspectiva | 48 |
| 6.2. Perspectivas Específicas | 48 |
| 7. Referências Bibliográficas | 79 |
| 8. Anexos | |
| Anexo I - Antigenotoxic and antimutagenic effects of diphenyl ditelluride against several known mutagens in Chinese Hamster Lung Fibroblasts | 84 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Taxa de sucesso de desenvolvimento de medicamentos. | 17 |
| Figura 2 - Taxa de sucesso de novas drogas de acordo com o tipo de câncer. | 18 |
| Figura 3 - Estrutura do Ditelureto de Difenila. | 28 |
| Figura 4 - Principais vias de interação de ATM/ATR em resposta ao dano no DNA. | 31 |
| Figura 5 - Uma visão geral da resposta ao dano no DNA. | 32 |
| Figura 6 - Modelo de adaptação de checkpoint. | 34 |
| Figura 7 - Imagem demonstrativa do experimento TARDIS nas células HCT116 | 64 |
| Figura 8 - Imagem demonstrativa do experimento TARDIS nas células MRC5. | 65 |
| Figura 9 - Quantificação do percentual de células apresentando formação dos complexos Topo II-DNA em relação a quantidade de células observadas em cada tratamento. | 66 |
| Figura 10 - Modelo proposto para o mecanismo de ação do DTDF em células MRC5 e HCT116. | 72 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Estágios do Câncer Colorretal | 20 |
| Tabela 2 - Quimioterápicos mais utilizados do tratamento de CCR | 23 |

Lista de Siglas e Abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| 5-FU | 5-fluorouracil |
| AS101 | <i>ammonium trichloro (dioxoethylene-o,o') tellurate</i> |
| ATM: | Cinase serina/treonina ataxia telangiectasia mutada (ataxia telangiectasia mutated serine/trheonine kinase). |
| ATR: | Cinase serina/treonina ataxia telangiectasia e RAD3 relacionada (ATM e RAD3-related serine/trheonine kinase). |
| ATRIP | ATR-interacting protein |
| APC | Adenomatous polyposis coli |
| BER | Reparo por excisão de base (<i>Base Excision Repair</i>) |
| CPT | Camptotecina |
| DSB | Quebras de fita dupla (<i>Double strand break</i>) |
| CCR | Câncer Colorretal |
| Chk1 | Checkpoint de Cinase 1 (<i>Checkpoint kinase 1</i>) |
| Chk2 | Checkpoint de Cinase 2 (<i>Checkpoint kinase 2</i>) |
| Cdk1 | <i>Cyclin-dependent kinase 1</i> |
| Cdk2 | <i>Cyclin-dependent kinase 2</i> |
| DCC | <i>Deleted in Colorectal Carcinoma</i> |
| DTDF | Ditelureto de Difenila |
| ETOP | Etoposídeo |
| FAP | Polipose Adenomatosa Familiar |
| FRC | Fator de Replicação C |
| GPx | Glutationaperoxidase |
| HO-1 | Heme Oxigenase-1 |
| HR | <i>Homologous Recombination</i> |
| LV | Leucoverin |
| MRN | Complexo Mre11-Rad50-Nbs1 |
| OT | Organotelurados |
| OS | Organoselenado |
| SAS | <i>Octa-O-bis-(R,R)-tartarate ditellurane</i> |
| TopoI | Topoisomerase I |
| TopoII | Topoisomerase II |

TopoIII Topoisomerase III
TopoBP1 *Topoisomerase II Binding Protein 1*
PRA Proteína de Replicação A
WNT *Wingless-related integration site*

Resumo

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de neoplasia maligna mais frequente no mundo, o qual apresenta elevadas taxas de mortalidade. Os compostos organotelurados (OT) possuem interessantes efeitos biológicos, como potenciais antioxidantes e ações antiproliferativas. O ditelureto de difenila (DTDF), um composto OT, simples e estável, atualmente é investigado quanto aos seus efeitos biológicos. Em estudos anteriores, o DTDF apresentou ação antígenotóxica e antimutagênica em baixas concentrações. No entanto, em concentrações mais elevadas, o DTDF mostrou-se citotóxico em células de mamífero (V79) pela indução de genotoxicidade, parada do ciclo celular e inibição de topoisomerase I (TopoI). Por conseguinte, a citotoxicidade dos compostos OTs tem sido explorada em diversos estudos, assim como sua ação como agentes antiproliferativos em terapias anticâncer é também investigada. O objetivo deste estudo é avaliar o potencial antiproliferativo, genotóxico e análise de ciclo celular do DPDT em linhagens de células humanas HCT116 (carcinoma) e HT-29 (adenocarcinoma). Os resultados mostraram diminuição da viabilidade celular após exposição ao DTDF por 72 horas em ambas as linhagens celulares, avaliadas por MTT e ensaio clonogênico. Os valores de IC_{50} obtidos foram de 10,74 e 2 μ M para MRC5 e HCT116, respectivamente, no ensaio MTT. No ensaio cometa, o DTDF mostrou capacidade de induzir aumento de índice de dano (ID) no DNA com 10 μ M após 3 e 24 horas de exposição, em MRC5 e HCT116. Para 24 horas de exposição, o aumento no ID ocorre apenas em células HCT116, em concentrações \leq 5 μ M de DTDF. Para uma melhor compreensão, foi avaliado se DTDF foi capaz de causar quebras ou interações diretas com DNA pelas análises de quebra de DNA plasmidial e de dicróismo circular (DC). Não foram detectadas quebras duplas ou simples em concentrações que vão de 0 a 400 μ M de DTDF pela análise de quebra de DNA plasmidial. No experimento de DC, na mesma faixa de concentrações, não foi possível detectar interações diretas de DTDF com o DNA plasmidial. Por citometria de fluxo, foi realizada a análise de ciclo celular, onde foi observado a parada em G2/M após 24, 48 e 72 horas de exposição em 5 e 10 μ M de DTDF. Foi avaliado pelo método TARDIS se o DTDF foi capaz causar a inibição da enzima topoisomerase II (TopoII) em HCT116 e MRC5. Em 3 horas de exposição, em 5 e 10

μM , o DTDF não foi capaz de induzir formação de complexos DNA-TopoII. Os resultados mostraram que a linhagem HCT116 foi mais sensíveis aos efeitos citotóxicos do DTDF do que as células MRC5. Como foi demonstrado que o DTDF não é capaz de interagir diretamente com DNA, essa diferença pode estar relacionada com os efeitos genotóxicos indiretos, como estresse oxidativo ou inibição de TopoI, que levaram a parada em G2/M. Esses resultados fortalecem a hipótese de inibição de TopoI, visto que os mecanismos celulares do DTDF estão relacionados com seu efeito genotóxico e parada no ciclo celular. Assim, os resultados desse trabalho abrem possibilidades de estudos futuros para investigações mais aprofundadas de possíveis mecanismos de ação moleculares do DTDF em células de câncer colorretal.

ABSTRACT

Colorectal cancer is the third more frequent type of cancer worldwide and has high mortality rates. Diphenyl ditelluride (DPDT) is an organotellurium (OT) compound with biological effects, such as potential antioxidant, antigenotoxic and antimutagenic at low concentrations. However, higher concentrations of DPDT showed cytotoxic effects in mammalian V79 cells by inducing oxidative damage, DNA strand breaks, cell cycle arrest and topoisomerase I (TopoI) inhibition. In this sense, the cytotoxicity of OT compounds has been reported, and the observed effects attributed for anticancer therapy application. Thus, the objective of this study is to investigate the antiproliferative, genotoxic and cell cycle arrest potential of DPDT in human colon cancer cells (HCT116) and human fibroblast cells (MRC5). The results showed a decrease in cell viability after DPDT exposition for 72 h in both cell lines, as evaluated by MTT and clonogenic assays. The IC₅₀ values obtained were 10.74 and 2 μ M for MRC5 and HCT116, respectively in MTT assay. In the comet assay, DPDT at concentrations \leq 5 μ M was able to increase DNA strand breaks induction only in HCT116 cells after 24 h of exposure. For a better understanding, we evaluated if DPDT was able to cause strand breaks in direct interaction with plasmidial DNA breakage analysis. No single or double strand breaks were detected in a range of concentrations from 0 to 400 μ M. By circular dichroism analysis, no direct interactions with DNA were found at the same concentrations. Furthermore, cell cycle arrest in G2/M phase detected by flow cytometry was more pronounced in the HCT116 than MRC5 cell lines after 24, 48 and 72 h of exposure. By the TARDIS method, we evaluate if DPDT was able to inhibit topoisomerase II. For 3 h exposure, in 5 and 10 μ M, DPDT does not shows topoisomerase II inhibition. Taken together, HCT116 colon cancer cells were more sensitive to DPDT biological effects than MRC5 cells. This difference may be related to the stronger indirect genotoxic effects induced by DPDT in HCT116 cells, which probably triggered the cell cycle arrest. The action of DPDT apparently occurs in the S phase, taking place to cell cycle arrest in G2/M, reinforcing the hypothesis of TopoI inhibition. Thus, the results of this work open up possibilities for future studies on further investigation of possible mechanisms of molecular action of DTDF in colorectal cancer cells.

1. Introdução Geral

O câncer permanece como a causa mais notável de morte em todos os países do mundo. Recentemente, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) estimou que 7,6 milhões de mortes no mundo por ano se devem a neoplasias malignas, e que 12,7 milhões de novos casos são relatados por ano, dos quais 63% concentram-se em países desenvolvidos (BASKAR *et al.*, 2012a; SIEGEL *et al.*, 2016). Associado a este fato, o câncer possui um forte impacto na sociedade, debilitando indivíduos produtivos, tanto no âmbito social quanto no econômico, além de constituir um sério problema de saúde pública (SIEGEL *et al.*, 2016).

O tumor ou neoplasia maligna (câncer) caracteriza-se pela rápida e descontrolada proliferação de células anormais em um órgão ou tecido. A partir da progressão de múltiplos estágios de uma única célula normal à célula tumoral surge o tumor, que pode se desenvolver no local de origem ou ainda invadir tecidos e órgão distantes (MCGUIRE, 2016).

A etiologia do câncer é multifatorial, como fatores genéticos, carcinógenos físicos (luz ultravioleta e radiações ionizantes), químicos (componentes do cigarro) e biológicos (patógenos) (PARKIN, 2001). Atualmente, o conhecimento da genética do câncer está melhorando o nosso entendimento sobre a biologia da doença, promovendo a capacidade de caracterizar o tipo de câncer e estabelecer tratamentos mais específicos de acordo com as características moleculares da doença. As consequências dessa expansão, e da base do conhecimento, implicam nos aspectos como o gerenciamento do câncer, incluindo prevenção, triagem e tratamento. Existem diversas modalidades para o tratamento de diversos cânceres, tais como a ressecção cirúrgica, o emprego de radiações ionizantes de alta energia (BASKAR *et al.*, 2012b) e abordagens biotecnológicas. No entanto, nenhuma estratégia terapêutica superou até o momento a eficiência e emprego da quimioterapia padrão para os tumores sensíveis a esta modalidade terapêutica (ARGIRIS *et al.*, 2011; HODGE *et al.*, 2012).

A ação antiproliferativa, também conhecida como ação antitumoral, refere-se à erradicação das células malignas em função da inibição no desenvolvimento celular. Esse efeito é desempenhado por vários mecanismos atuantes em processos de sinalização intracelular, na homeostase iônica, alteração na permeabilidade da membrana plasmática e mitocondrial, e geração de lesões ao DNA. Esses

fenômenos são capazes de ativar os mecanismos de morte celular programada, em seus mais diversos tipos (BASKAR *et al.*, 2012b; HODGE *et al.*, 2012).

A genética do câncer, em se tratando de conhecimento sobre a biologia do tumor e a possibilidade de terapias, permanece sendo ainda um desafio nas pesquisas. As novas possibilidades de terapias eficientes se devem fortemente a robustos sistemas de modelos pré-clínicos de pesquisa (BARRETINA *et al.*, 2012). A utilização de linhagens celulares de tumores humanos representa um dos pilares da biologia de tumores e da descoberta de novas drogas com eficácia terapêutica no tratamento do câncer (NEVE *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2008; SOS *et al.*, 2009).

Analisando em um parâmetro geral, um grande número de novas drogas promissoras no tratamento do câncer tende a falhar nas últimas fases de pesquisa, principalmente da fase clínica II, com uma taxa mundial de insucesso de 67% (Fig. 1) (ARROWSMITH, 2011). Os estudos apontam que os principais motivos para esses números serem tão elevados e falharem os estudos em humanos são a baixa eficiência e segurança dessas novas drogas (GRODEN *et al.*, 1991; MAYR e FUERST, 2008). Na área da terapêutica, a maior taxa de falhas se encontra na oncologia, com aproximadamente 29% de sucesso em fase clínica II e 34% fase clínica III. Nesse cenário, o câncer colorretal (CCR) obtém o status mais preocupante, com o menor número de aprovação geral de drogas, onde a maioria das quais atuam na síntese de DNA e divisão celular ao invés de atuar em mecanismos moleculares específicos da progressão do CCR (Fig. 2) (GOODWIN e ASMIS, 2009). Assim, a investigação de novas drogas ainda se faz necessária na busca de melhores resultados terapêuticos.

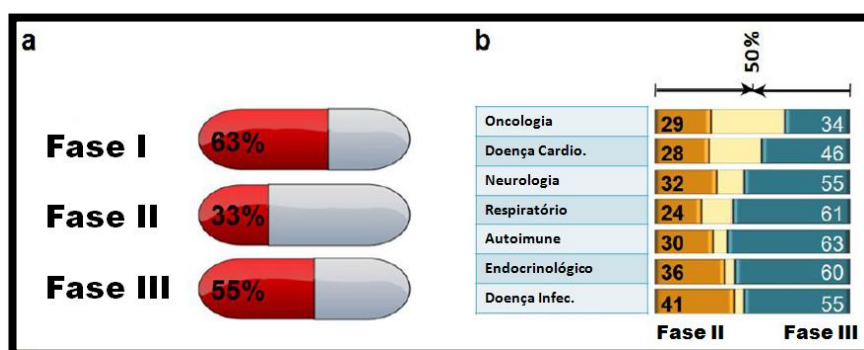


Figura 1 – Taxa de sucesso de desenvolvimento de medicamentos. (a) Taxa de sucesso de ensaios clínicos fase I-III de 2003 a 2010, correspondentes a 4275 drogas; (b) taxa de sucesso para a fase II e III de acordo com a área terapêutica (b). Fonte Hay *et al.* (2011).

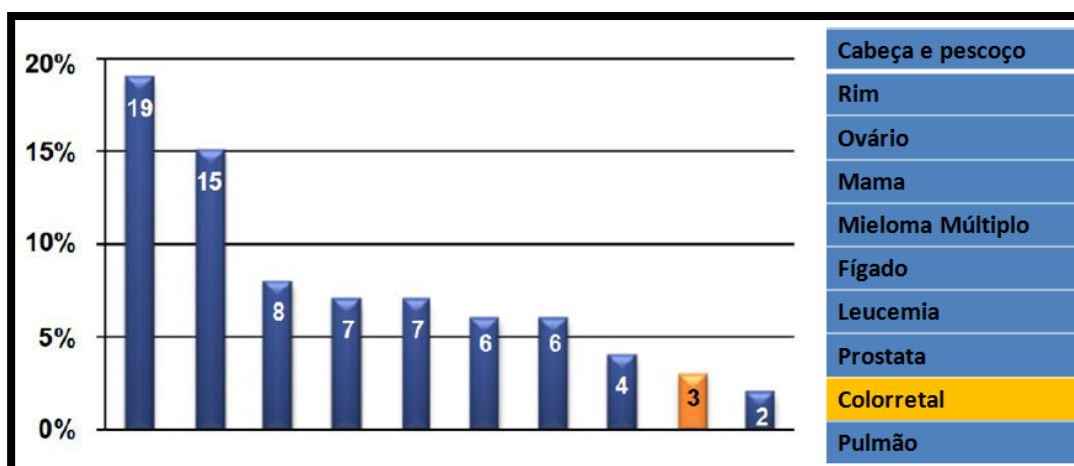


Figura 2 – Taxa de sucesso de novas drogas de acordo com o tipo de câncer. Observa-se que o CCR obtém uma das menores taxas de sucesso quando comparado a outros tipos de cânceres. Fonte: Hay et al. (2011).

A maioria das células tumorais divide-se com maior frequência que as células normais e o processo de divisão celular pode ser alvo para o tratamento de pacientes com câncer. O objetivo de atacar células em proliferação é causar uma parada no ciclo celular e/ou causar a morte das células tumorais usando compostos citotóxicos (quimioterapia) ou radiação ionizante (radioterapia). Muitos dos compostos utilizados em pacientes com câncer causam altos níveis de dano no DNA, o que causa o início da parada do ciclo celular, levando à morte ou parada no ciclo celular (HELLEDAY et al., 2008).

1.2. Câncer Colorretal – Aspectos Gerais

O CCR é a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos e o segundo tipo de câncer mais frequentes nos Estados Unidos e Europa (FERLAY et al., 2013). No Brasil, em 2016, estima-se 16.660 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e de 17.620 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,84 casos novos a cada 100 mil homens e 17,10 para cada 100 mil mulheres. O CCR é o segundo mais frequente na Região Sudeste e terceiro nas Regiões Sul e Centro-Oeste. Nas regiões Nordeste e Norte, ocupa a quarta posição. Para mulheres, é o segundo mais frequente nas Regiões Sudeste e

Sul. Nas Regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte, é o terceiro mais frequente (INCA, 2016).

Como tratamento inicial é indicada a cirurgia, podendo ainda ser utilizados radioterapia e quimioterapia (ZAVORAL *et al.*, 2009; INCA, 2016). O CCR é resultado da acumulação progressiva de alterações genéticas e epigenéticas que conduzem a formação do epitélio de cólon normal para o adenocarcinoma de cólon (ELRASHEID A. H. KHEIRELSEID, 2013). O CCR progride através de uma série de fases clínicas e histopatológicas, que vão desde tumores benignos (pólipos intestinais) até cânceres malignos (carcinoma) (MICHOR *et al.*, 2005). De fato, os estudos em CCR permitiram a compreensão da carcinogênese, e este tipo de câncer é resultado de acúmulos de alterações moleculares, em que o primeiro passo é a inativação de genes supressores de tumores APC (*adenomatous polyposis coli*), DCC (*deleted in colorectal carcinoma*) ou p53 (VOGELSTEIN *et al.*, 1988).

A tumorigênese do CCR inclui diversas modificações genéticas para iniciação e progressão do carcinoma. A perturbação das vias de APC é o evento genético mais antigo reconhecido, e está presente em aproximadamente 95% dos CCRs (FEARON e VOGELSTEIN, 1990; KINZLER *et al.*, 1991; MICHOR *et al.*, 2005). Neste cenário, diversas linhagens de CCR são utilizadas na pesquisa *in vitro* para *screening* de novos compostos ou para investigação de mecanismos e de novos biomarcadores (AHMED *et al.*, 2013).

A perda da função da proteína APC é o evento molecular que dá início à formação de um adenoma. De fato, as mutações no gene APC foram identificadas como a causa da polipose adenomatosa familiar (FAP), a síndrome do cancro intestinal hereditário, em que APC é mutado em mais de 80% dos casos de CCR (GRODEN *et al.*, 1991; POWELL *et al.*, 1992). O APC pertence à via de sinalização WNT (*Wingless-related integration site*), a qual está envolvida em transdução de sinal. A via WNT é feita de proteínas que fazem a sinalização entre células através de receptores da superfície celular e está associada à proliferação. A WNT interage com outras proteínas como AXINA e GSK3 β para formar um complexo que regula β -catenina (RING *et al.*, 2014). Em 10% dos CCR pode ser observada mutação em β -catenina e, quando mutada, ocorre a interação com o núcleo no complexo transcricional LEF/TCF para induzir a expressão de genes promotores de crescimento, como MYC e Ciclina D1. Processos adicionais de alterações genéticas

e epigenéticas (KRAS, P53, etc...) aparecem em seguida a esse conjunto inicial de mudanças moleculares, mantendo a progressão e transformação até os estágios de carcinoma e processos metastáticos (MORIN et al., 1997).

Alterações epigenéticas são amplamente reconhecidas como importantes na tumorigênese do CCR. As mudanças epigenéticas em tecidos de tumor colorretal e em linhagens de CCR têm sido frequentemente relatadas, acumulando uma quantidade substancial de informações (KIM et al., 2010; RAWSON e BAPAT, 2012). Essas alterações incluem metilação de DNA aberrante, mudança em perfil de expressões de microRNA e modificações de histonas (WANG et al., 2014).

O CCR é geralmente classificado em três categorias, baseado no aumento da hereditariedade e risco de câncer (IVANOVICH et al., 1999). O CCR esporádico (60%) é composto por pacientes com notável histórico familiar da doença e, por definição, sem mutação genética identificável herdada, que acelera o desenvolvimento do câncer. O CCR familiar (30%) compreende pacientes que tem pelo menos um familiar de sangue com CCR ou adenoma, mas sem linhagem com mutação específica ou um padrão esclarecido de herança. E a Síndrome de CCR hereditário (10%) é composta por pacientes que possuem mutações de genes herdáveis que são altamente relacionados com ocorrência de CCR (ELRASHEID A. H. KHEIRELSEID, 2013).

Quanto aos seus estágios de desenvolvimento, o CCR pode ser classificado em quatro estágios (Tabela 1). Do ponto de vista histológico, o CCR pode ser classificado como carcinoma, adenocarcinoma ou sarcoma. O carcinoma colorretal é caracterizado por um crescimento anormal e descontrolado das células do cólon e do reto, provocado pelo desequilíbrio do ciclo celular (LENZ, 2007).

Tabela 1. Estágios do Câncer Colorretal

| Estágio | Característica |
|----------------|---|
| A (I) | Tumor invade a mucosa intestinal. |
| B (II) | Tumor ultrapassa a mucosa e infiltra a camada muscular do cólon e ou reto |
| C (III) | Invasão de tumor nos linfonodos |
| D (IV) | Metástase para órgão |

Fonte: Adaptado de Society (2016^a).

1.3. Tratamento

Até o momento, a cirurgia associada à quimioterapia é a principal modalidade de tratamento para o paciente com a doença localizada. Entretanto, um alto número de reincidência da doença é relatado. Observa-se que pacientes que se encontram no mesmo estágio da doença exibem respostas diferentes aos mesmos tratamentos (GALIZIA et al., 2004).

Aproximadamente 20% dos pacientes com CCR apresentam metástases, e desses, 20% apresentam no estágio II e 35% no estágio III de desenvolvimento do câncer. Por isso, devido a altas taxas de recorrência e sobrevida diminuída em paciente com CCR, é de extrema importância o monitoramento dessa neoplasia (GOODWIN e ASMIS, 2009). A intervenção cirúrgica é considerada uma modalidade primária e tratamento curativo em pacientes no estágio I e II. No entanto, a presença de metástase em pacientes no estágio III está relacionada a um alto risco, podendo reduzir as chances de processos cirúrgicos em 50% (VAN CUTSEM et al., 2005). A quimioterapia combinada é a opção mais utilizada após o tratamento cirúrgico, com a finalidade de diminuir a possibilidade de reincidência (GOODWIN e ASMIS, 2009).

A quimioterapia baseada na monoterapia consiste no emprego de medicamentos antineoplásicos como agentes únicos. Entretanto, a monoterapia tem várias limitações, como a quantidade limitada de droga que pode ser administrada ao paciente, uma vez que a maioria dos quimioterápicos não tem especificidade para um tipo celular e não destrói células de forma seletiva e exclusiva, afetando também células normais e podendo levar a uma toxicidade sistêmica. Portanto, o aumento das doses da quimioterapia, com o objetivo de melhorar e prolongar a duração da resposta terapêutica, é frequentemente limitado pela sua toxicidade (MONSUEZ, 2012). Neste sentido, os tratamentos com antineoplásicos empregam combinações de medicamentos com diferentes mecanismos de ação, a fim de se obter respostas mais eficazes quando comparado aos efeitos obtidos em monoterapias. Os protocolos utilizados consistem na associação de dois ou mais agentes antitumorais, como por exemplo, o uso de 5-fluorouracil (5-FU) associado ao irinotecan para tratamentos de CCR, e docetaxel, cisplatina e 5-FU para câncer de esôfago, entre outros (GRIVICICH et al., 2001; EMI et al., 2012).

Novas propostas de terapias como quimioterapia sistemática adjuvante são utilizadas, assim como ainda outras continuam a ser estudadas por pesquisadores,

como novos compostos em combinação com 5-FU (STEVENSON et al., 2011). Os avanços na pesquisa permitiram a inclusão de novos agentes a fim de melhorar a resposta clínica dos pacientes e obter toxicidade sinérgica e indução de apoptose. Além do 5-FU, atualmente já são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) a inclusão de diversos outros quimioterápicos. Esses são utilizados em protocolos de acordo com o seu mecanismo de ação, estágio da doença e indicação (Tabela 1) (GRIVICICH et al., 2005a; GRIVICICH et al., 2005b; GOODWIN e ASMIS, 2009; STEVENSON et al., 2011)

Constantemente, diferentes compostos são investigados a partir de agentes que atuam a nível celular e interferem no processo de crescimento e divisão celular, com o objetivo de desenvolver novas drogas mais eficientes e, conseqüentemente, com melhores resultados terapêuticos. Além disso, novas combinações de agentes antineoplásicos são também investigadas, visando o aumento da eficiência do tratamento quimioterápico pela multiterapia (EMI et al., 2012).

Tabela 1. Quimioterápicos mais utilizados do tratamento de CCR

| Quimioterápico | Mecanismo de Ação | Indicação | Toxicidades mais Frequentes |
|-----------------------|---|--|--|
| 5-FU | Bloqueia a enzima Timidilato sintetase (TS), que é essencial para a síntese de DNA. | Em combinação com outros agentes. | Gastrointestinal (náusea e diarreia), fadiga e mielosupressão. |
| Leucovorin | Aumenta a atividade do 5-FU por estabilização da ligação do metabólito com a enzima TS. | Em combinação sinérgica com 5-FU | Relacionado ao aumento dos efeitos do quimioterápico com o qual está associado. |
| Capecitabina | Bloqueia a enzima TS (pró-fármaco administrado por via oral convertido a 5-FU). | Usos múltiplos em combinação com outros agentes, tanto como adjuvante (pós-operatório) e situação metastática. | Gastrointestinal (náusea e diarreia), fadiga e mielosupressão. Síndrome da mão e do pé. |
| Oxaliplatina | Inibe a replicação do DNA e transcrição por formação de adutos e cross-links. | Usos em combinação com 5-FU e Leucovorin, tanto como adjuvante (pós-operatório) e situação metastática. | Neuropatia periférica e hipersensibilidade. Gastrointestinal (náusea e diarreia), fadiga e mielosupressão. |
| Irinotecan | Inibe Topol. | Utilizado sozinho e em combinação com 5-FU e LV em situações metastáticas. | Colinérgicos (diarréia aguda); Gastrointestinal (náuseas, diarreia tardia); fadiga e mielosupressão. |

| | | | |
|---------------------|---|--|--|
| Bevacizumabe | Anticorpo monoclonal que inibe fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) | Usado em combinação com outros agentes em situação metastática. | Hipertensão; eventos trombóticos arteriais; cicatrização de feridas prejudicada e perfuração gastrointestinal. |
| Cetuximabe | Anticorpo monoclonal antagonista competitivo do fator de crescimento epidérmico (EGFR). | Usado como agente único em situação metastática ou em combinação com irinotecan. | Acne; hipersensibilidade; hipomagnesemia e fadiga. |
| Panitumumab | Anticorpo monoclonal antagonista competitivo do fator de crescimento epidérmico (EGFR). | Usado como agente único em situação metastática. | Hipomagnesemia; fadiga e acne. |

Adaptado de Goodwin e Asmis (2009).

1.4. Compostos Organotelurados

O elemento telúrio foi descoberto em 1782 por Franz Joseph Müller Reichstein e dezesseis anos depois foi isolado e nomeado pelo bioquímico Martin Heinrich Klaproth. Seu nome refere-se à palavra em latim *tellus*, que significa Terra. Seu uso industrial vem aumentando principalmente em eletrônicos, baterias, melhoramento de ligas metálicas e em semicondutores (CHASTEEN *et al.*, 2009b). Geralmente, esse elemento é encontrado na sua forma nativa em minérios de ouro e cobre e também em membros do grupo vegetal da família *Aliaceae*, em que seu representante mais popular é o alho (LARNER, 1995). Alguns estudos detectaram pequenas quantidades de Te em fluidos corporais como urina e sangue (ENGEL e YOUNG, 1978). O telúrio também está presente em proteínas de bactérias e de levedura e outros fungos. Até o momento não existem registros de sua descoberta em nenhuma proteína em células de metazoários. Portanto ainda não é conhecida,

até o momento, nenhuma função fisiológica em mamíferos (TAYLOR, 1996; REZANKA e SIGLER, 2008).

Os compostos organocalcogênicos contendo selênio ou telúrio na sua constituição representam moléculas de grande interesse farmacológico. Um grande número de compostos organosselenados e organotelurados (OT) estão sendo investigados quanto à sua ação antioxidante, antitumoral, anti-infecciosa, anti-hipertensiva, cardiotônica, antiinflamatória, antinociceptiva, neuroprotetora, imunomoduladora, indutora de citocinas e como inibidores enzimáticos (SORIANO-GARCIA, 2004; BROZMANOVA et al., 2010; NAZIROGLU et al., 2012; RAYMAN, 2012; REES et al., 2013). Entre as ações mais investigadas nos últimos anos, a quimioproteção, a modulação do estado redox celular, a ação antiproliferativa direta ou na potencialização da ação de fármacos antineoplásicos tem ocupado lugar de destaque (BROZMANOVA et al., 2010; HURST et al., 2012).

De fato, os compostos contendo selênio ou telúrio são considerados “compostos de Janus” – em alusão ao deus romano das duas faces, do bem e do mal – devido ao seu comportamento contrastante, o qual depende da concentração utilizada. Em doses baixas, essas moléculas têm efeitos benéficos; entretanto, em altas doses, são tóxicos e possivelmente carcinogênicos (BROZMANOVA et al., 2010; NOGUEIRA e ROCHA, 2011). Dessa forma, é importante determinar o intervalo de concentração da molécula em que se manifestam os efeitos tóxicos e a faixa de concentração segura para testes, na qual se buscam atividades farmacodinâmicas interessantes. No caso da terapêutica anticâncer, essas duas faixas são interessantes: no intervalo de concentração segura, investiga-se o potencial quimiopreventivo dos compostos e em concentrações mais elevadas, estuda-se a atividade citotóxica, a qual é importante do ponto de vista de erradicação das células tumorais (LETAVAYOVA et al., 2006; BROZMANOVA et al., 2010).

Nesse cenário, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* estão sendo realizados com os OTs para avaliar os seus efeitos biológicos. Compostos dessa natureza têm se mostrado interessantes quanto às diversas propriedades farmacológicas, como imunomoduladores, atividade mimética à enzima glutationaperoxidase (GPx) e potenciais agentes antitumorais (NOGUEIRA et al., 2004; HASSAN et al., 2009b; SREDNI, 2012). Apesar de ainda serem poucos estudos, compostos OTs estão sendo avaliados quanto à sua toxicologia, seja baseada na inibição de crescimento celular

ou na toxicidade observada em animais, ou quanto à genotoxicidade e mutagenicidade em diferentes modelos biológicos de estudo *in vitro* (SAILER et al., 2004; CUNHA et al., 2005; SCHIAR et al., 2009; DEGRANDI et al., 2010).

Devido à semelhança química entre os elementos telúrio e selênio, é importante salientar que os testes biológicos com compostos OT baseiam-se nos resultados já conhecidos quanto à farmacodinâmica de moléculas contendo selênio (NOGUEIRA *et al.*, 2004; CHASTEEN *et al.*, 2009b). Compostos organosselenados como o disseleneto de difenila, por exemplo, têm se mostrado importantes como um agente antioxidante por terem uma acentuada atividade mimética à enzima GPx e apresentarem baixa toxicidade em roedores. O ebselen, um composto sintético de selênio similar a compostos OTs, tem mostrado resultados promissores como atividade antioxidante, sendo empregado em estudos de fase clínica I e II (MIORELLI et al., 2008; HASSAN et al., 2009a)

Nas pesquisas da terapia anticâncer, observou-se que alguns compostos contendo telúrio foram capazes de reduzir o crescimento tumoral de células em cultura (RIGOBELLO et al., 2009). Nesse contexto, o ditelureto de 3,3'-diaminodifenila e o ditelureto de 4,4'-diisopropildifenila induziram a morte celular por apoptose em células de leucemia promielocítica humana (linhagem HL-60) (SAILER et al., 2003). 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). Nesse mesmo estudo, foi mostrado que outros diteluretos diarílicos são capazes de causar apoptose através de alterações no ciclo celular dessa linhagem celular, mostrando um efeito antiproliferativo. 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 (SAILER et al., 2004; RIGOBELLO et al., 2009). O composto organotelurado *ammonium trichloro (dioxoethylene-o,o') tellurate* (AS101) apresenta propriedades antitumorais em camundongos, possivelmente devido à sua atividade imunomoduladora (FREI et al., 2008). Foi demonstrado também efeito sinérgico de AS101 e taxol na redução de adenocarcinoma pulmonar em modelos murinos (KALECHMAN et al., 1996). Outros estudos observaram que o composto AS101 apresentou atividade antitumoral em camundongos com linfoma cutâneo de células T, por induzir parada no ciclo celular

nas células T em fase G2/M e indução de apoptose, por ativação das caspases 3 e 9. Esses efeitos na parada do ciclo e indução de apoptose foram atribuídos à alta geração de espécies reativas provocadas por esta molécula (XU et al., 1996; HAYUN et al., 2006; NAOR et al., 2013).

1.5. O Ditelureto de Difenila

O telúrio é um semi-metal, calcogênio, localizado no grupo 16 da tabela periódica. Os compostos orgânicos de Se e de Te são estudados quanto às suas propriedades farmacológicas (CHASTEEN *et al.*, 2009b). Os calcogênios são elementos químicos com importantes funções mediadoras de reagentes químicos, muito utilizados em reações de síntese orgânicas (CHASTEEN *et al.*, 2009a). Fischer cita o oxigênio (O), enxofre (S), selênio (Se) e telúrio (Te) como os elementos que fazem parte desse grupo (FISCHER, 2001). Os calcogênios podem apresentar-se na forma orgânica, formando os compostos organocalcogênios, com os quais são estudados seus efeitos tóxicos e propriedades farmacológicas (NOGUEIRA et al., 2004). Os compostos de telúrio possuem importantes aplicações da indústria, tais como produção de vidro, aço, indústria petroquímica, produção de explosivos, lubrificantes sólidos, soluções oxidantes e vulcanização de borracha (TAYLOR, 1996).

O ditelureto de difenila (DTDF) (Figura 3) é um composto orgânico de telúrio, sólido e um importante intermediário em reações de síntese orgânica (CUNHA et al., 2009). Esse composto tem sido estudado devido às suas propriedades toxicológicas e interessantes atividades farmacológicas (CUNHA et al., 2009; HASSAN et al., 2009a). Em concentrações mais elevadas, o DTDF apresenta efeitos tóxicos, como a capacidade de oxidar grupamentos tiólicos em proteínas, afetando uma série de proteínas importantes como as enzimas δ -ALA-D e $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (BORGES et al., 2005; SOUZA et al., 2010).

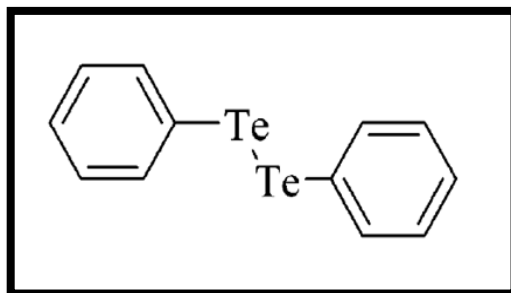


Figura 3 – Estrutura química do Ditelureto de Difenila. É um composto químico, orgânico com a fórmula $(C_6H_5Te)_2$, abreviado Ph_2Te_2 , de massa molar de 409,42 g/mol. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>

Quanto ao potencial de causar danos no DNA, foi mostrado que o DTDF apresenta efeito genotóxico e mutagênico em diferentes modelos biológicos. O DTDF induziu a alteração no quadro de leitura em *Salmonella typhimurium* e na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os mutantes de *S. cerevisiae* deficientes na reparação por excisão de bases (BER) e na reparação por recombinação homologa (HR) mostraram elevada sensibilidade ao DTDF. Este composto também apresentou citotoxicidade em células V79, aumentando os níveis de peroxidação lipídica e diminuíram os níveis de glutathione em levedura e em células V79, indicando efeito pro-oxidante. Além disso, o DTDF induziu a formação de quebras simples e duplas e danos oxidativos no DNA em fibroblasto de hamster e células V79 (DEGRANDI et al., 2010).

Ainda em células V79, foram confirmadas a indução de apoptose pelo DTDF através de análise morfológica e atividade de caspases 3/7. Nesse mesmo estudo, também foi mostrado que o DTDF foi capaz de induzir parada no ciclo celular em fase S. No ensaio de relaxamento de DNA plasmidial, o DTDF foi capaz de inibir atividade de enzima topoisomerase I (TopoI). Complementar a esses resultados, linhagens de leveduras deficientes em TopoI mostraram-se resistentes aos tratamentos com DTDF, enquanto que as linhagens deficientes em topoisomerase III (TopoIII) não mostraram diferença de sensibilidade quando comparadas as linhagens selvagens, evidenciando uma possível ação inibitória do DTDF para a enzima TopoI (JORGE et al., 2015).

O DTDF mostrou-se tóxico em concentrações acima 1 μM para células V79, mas em concentrações que vão até 0,5 μM , não se mostrou citotóxico, genotóxico

ou mutagênico. Além disso, essa molécula apresentou efeitos antimutagênico e antigenotóxico contra diversos mutágenos comumente utilizados, tais como *t*-BOOH, H₂O₂, MMS e luz UVC. O DPDT mostrou efeito protetor a diversos mutágenos. A pré-exposição de células V79 ao DPDT, em baixas concentrações, mostrou diminuir a citotoxicidade e a genotoxicidade quando estas células foram posteriormente expostas a *t*-BOOH, H₂O₂, MMS e radiação ultravioleta UVC. Notavelmente, a concentração 0,1 µM do DTDF foi capaz de reduzir a formação de quebras no DNA e de danos oxidativos induzidas por *t*-BOOH e H₂O₂. Nessa mesma condição de tratamento, o DTDF mostrou-se eficiente na diminuição de quebras no DNA quando as células são expostas à UVC e na redução da frequência de micronúcleos induzidos por MMS (TRINDADE et al., 2015). Em resumo, esses resultados salientam a ação pró-oxidante do DTDF, além de trazer mais uma possível abordagem desse composto na pesquisa pré-clínica.

A literatura já mostra estudos *in vitro* do DPDT em linhagens HT-29 e Caco-2 numa aplicação como agente antiproliferativo. Nesses estudos, foi possível observar um decréscimo significativo da viabilidade celular para ambas as linhagens em uma faixa de concentração de 62,5 até 1000 µM. Além disso, foi observado aumento da atividade de caspases 3/7 e 9 após exposição do DPDT (500-1000 µM) a células HT-29,, decréscimo de GSH/GSSH e apoptose, confirmado através de coloração fluorescente (VIJ e HARDEJ, 2012). Cogitado um possível emprego na terapia antiproliferativa e possível aplicação clínica, o DTDF mostrou ser um forte candidato como agente antiproliferativo em linhagens tumorais (câncer de mama e CCR).

1.6. Ciclo Celular e Genotoxicidade

A preservação da integridade genômica é crucial para o desenvolvimento, homeostase e sobrevivência de organismos uma vez que esta pode agir também como uma barreira contra a tumorigênese (MANIC et al., 2015). No entanto, injúrias no genoma são constantemente causadas nas células por agentes endógenos ou exógenos (direta ou indiretamente), induzindo dano no DNA e/ou perturbando a replicação do DNA (ZEMAN e CIMPRICH, 2014). De maneira geral, células se replicam mais lentamente em resposta ao dano no DNA e, para garantir que cada célula filha receba DNA íntegro, as células dispõem de mecanismos chamados de checkpoints (CICCIA e ELLEDGE, 2010; ZEMAN e CIMPRICH, 2014). Essas paradas são utilizadas

pelas células para detectar e responder ao dano no DNA, pois elas interrompem o ciclo celular, permitindo uma faixa de tempo fundamental para ocorrer a reparação do DNA antes que aconteçam os processos cruciais de replicação de DNA e segregação cromossômica (HARTWELL e WEINERT, 1989).

Diversos checkpoints regulam o ciclo celular na fase G1, S e G2/M, podendo prevenir a progressão do ciclo celular em presença de dano ao DNA (LUKAS et al., 2003). As vias de sinalização que regulam a resposta ao dano no DNA são todas coordenadas por processos como: (1) mecanismos de reparação de DNA, que promovem a remoção de danos específicos; (2) processos de adaptação/tolerância ao dano no DNA, que permite as células superarem danos no DNA sem reparação; (3) morte celular e senescência celular, que elimina ou interrompe a divisão de células com danos irreparáveis; e (4) os próprios mecanismos de checkpoint de ciclo celular, que detém a progressão do ciclo celular (MANIC et al., 2015).

ATM (cinase serina/treonina ataxia telangiectasia mutada) e ATR (cinase serina/treonina ataxia telangiectasia e RAD3 relacionada) são cinases serina/treonina que regulam os checkpoints das fases G1, S e G2 do ciclo celular, fosforilam histonas e também estão envolvidas com reparação de DNA. ATM e ATR estão envolvidas na fosforilação de substratos que regulam a sinalização de paradas, incluindo p53, checkpoint de cinase 1 (Chk1) e checkpoint de cinase 2 (Chk2) (Fig. 4). Ainda, ATM e ATR são considerados os dois eixos principais de sinalização que regulam resposta ao dano no DNA, onde ATM amplifica o sinal gerado por quebras duplas e ATR é ativado por quebras simples no DNA (JAZAYERI et al., 2006; NAM e CORTEZ, 2011; SHILOH e ZIV, 2013; MANIC et al., 2015)

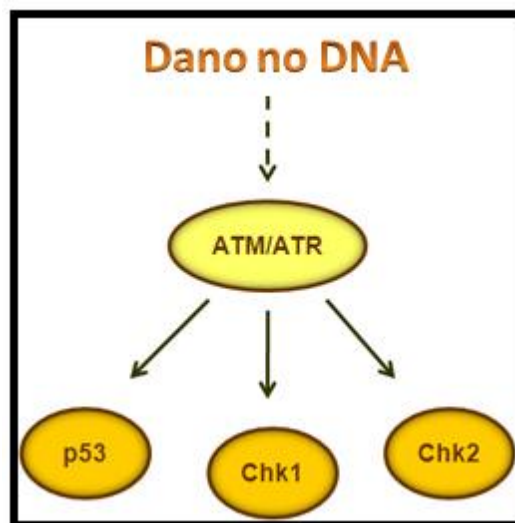


Figura 4 – Principais vias de interação de ATM/ATR em resposta ao dano no DNA. Em resposta ao dano no DNA, as vias ATM/ATR interagem com p53, Chk1 e Chk2. Fonte: <http://tgrbio.com/alphascreen-surefire/surefire-atmatr-signaling/>.

ATM é presente na célula como um homodímero inativo e responde a quebras de fita dupla (DSB) no DNA (BAKKENIST e KASTAN, 2003). Quando detectado o dano no DNA, a ATM torna-se ativa por autofosforilação, o que causa a dissociação dos homodímeros e a formação de monômeros ativos (SMITH et al., 2010). Esses monômeros são recrutados para as DSBs pelo complexo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN), o qual é um regulador para ATM. Dessa maneira, a ATM é envolvida em checkpoints de sinalização, término de processamento de DNA e em recombinação ou reparação de DNA por fosforilação de múltiplos substratos, incluindo a histona variante H2AX e Chk2 (LUKAS et al., 2004; LEE e PAULL, 2005; SWIFT e GOLSTEYN, 2014). Chk2 é ativado pela fosforilação da treonina 68, o qual inicia a parada da fase G1/S pela inibição indireta de cinase ciclina-dependente 2 (Cdk2) (Fig. 5). ATM também ativa p53 em resposta ao dano no DNA e interage com a ATR (CHEN et al., 2005).

ATR é reconhecida com o efetor principal de checkpoints de G2/M e respostas ao dano no DNA como *crosslinks*, formação de adutos e quebras, por ter a capacidade de detectar dano na fita simples do DNA (ssDNA), que está presente na forquilha de replicação quando interrompida ou gerada por DSBs no processo de terminação (ZHOU e ELLEDGE, 2000). O principal substrato de ATR é Chk1, que é

ativado por fosforilação nos resíduos de serina 317 e 345 presentes na região reguladora C-terminal (CHEN et al., 2000; ZHAO e PIWNICA-WORMS, 2001). ATR é ativada por agentes que causam dano no DNA como 5-FU, luz UV, complexos de platina e agentes alquilantes (YOSHIOKA et al., 2006; WILSKER e BUNZ, 2007; WAGNER e KARNITZ, 2009). A ATR encontra-se associada a um complexo *ATR-interacting protein* (ATRIP), na qual interage com a proteína de replicação A (PRA), uma proteína que tem alta afinidade por ssDNA (CORTEZ et al., 2001; KUMAGAI et al., 2006). Quando ATR é recrutado por PRA, adicionalmente, a mesma é ativada por *topoisomerase II binding protein 1* (TopoBP1). TopoBP1 é, por sua vez, recrutado pelo complexo Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1) (KUMAGAI et al., 2006; DELACROIX et al., 2007). O maior substrato de ATR é a Chk1, na qual é ativada pela fosforilação no resíduo de serina 317 e 345, presentes no domínio regulatório C-terminal. Ainda, para que ocorra a fosforilação por ATR, o complexo fator de replicação C (FRC) - Rad17, o complexo 9-1-1 e proteína claspin são necessários para a ativação de Chk1 (LIU et al., 2000; ZHAO e PIWNICA-WORMS, 2001; CHINI e CHEN, 2003). Uma vez ativado o Chk1, este previne a ativação da cinase ciclina-dependente 1 (Cdk1), a qual, juntamente com a ciclina B, é responsável pelo início da mitose. A fosfatase cdc25 remove um grupo inibitório de Cdk1 tornando-a ativa, tornando possível, dessa maneira, a ocorrência da mitose. Na ausência de cdc25, Cdk1 não pode ser ativada (Fig. 5). Em contraste, quando Cdk1 torna-se ativa, a mesma estimula diversas enzimas que participam dos principais passos mitóticos, como quebra de membrana nuclear, reorganização de microtúbulos, condensação de cromatina e mudanças no citoesqueleto de actina, o que confere uma morfologia mais arredondada em células mitóticas (CORTEZ et al., 2001; JIN et al., 2008; SWIFT e GOLSTEYN, 2014).

Em resposta ao dano no DNA, a ativação de paradas de ciclo celular proporciona tempo às células para que ocorra reparação do DNA, permitindo assim que as mesmas progridam com o ciclo celular, entrem em senescência ou morram. Em células não cancerosas, a parada em G1/S é importante, em contraste à maioria das células cancerosas, que possuem mutação em p53, supressor de tumor retinoblastoma ou desbalanço de Cdks e ciclinas. Essas mutações tornam os checkpoints de G1 não eficientes (SWIFT e GOLSTEYN, 2014). Assim, em resposta ao dano no DNA, o checkpoint mais importante de células tumorais ocorre em G2/M

associado às vias de fosfatase ATR-Chk1-Cdc25, em oposição à p53 que inicia apoptose (BUCHER e BRITTEN, 2008).

Recentemente, existe muito interesse na descoberta e caracterização de compostos que tenham como alvo a resposta ao dano no DNA e parada de ciclo celular. No entanto, é importante o entendimento sobre os mecanismos que acontecem pós-parada, e dessa maneira é possível melhorar a eficácia de fármacos genotóxicos que agem por essas vias.

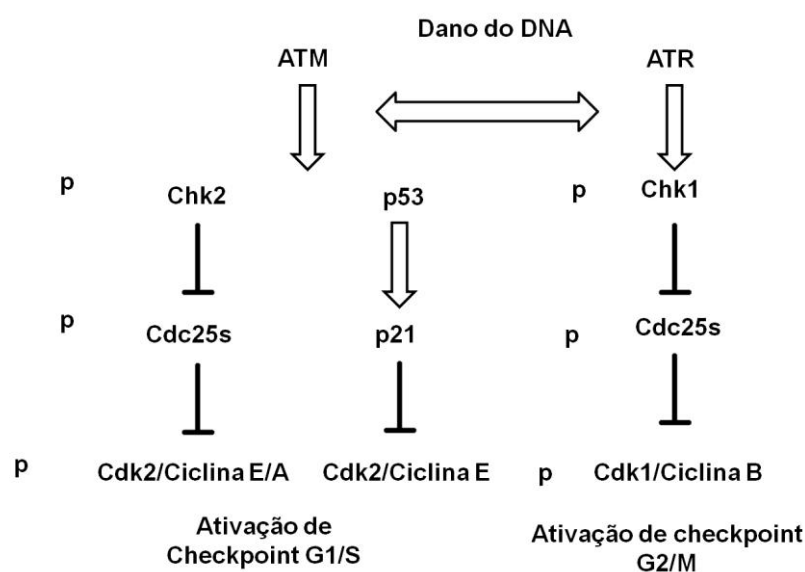


Figura 5 - Uma visão geral da resposta ao dano no DNA. Em resposta ao dano no DNA, ATM e ATR são ativados e fosforilam muitos substratos, incluindo proteínas envolvidas nos checkpoints, replicação do DNA e reparação de DNA. Quando ativados Chk1 e Chk2, essas ativam a fosfatase Cdc25, iniciando checkpoints que evitam as células de progredir através do ciclo celular, mantendo a fosforilação inibitória das Cdk. A ATM também é responsável pela ativação p53, que ativa checkpoint G1/S pela da inibição da Cdk2/ciclina e por p21. Fonte: Swift e Golsteyn (2014).

Para uma célula morrer por mitose após sofrer eventos de dano no DNA, é preciso que ultrapasse os checkpoints de G2/M, e existem dois caminhos possíveis pra que isso ocorra: i) recuperação de parada ou ii) adaptação de parada (Fig. 6) (TOCZYSKI et al., 1997; BARTEK e LUKAS, 2007). A proposta de morte celular no evento de mitose após a exposição a agentes genotóxicos é reconhecida há décadas, apesar do conhecimento sobre como as células ultrapassam as paradas de G2/M para entrar em mitose ainda ser escasso (TANSLEY et al., 1937). Diversos

autores reconhecem que pouco foi estudado sobre esse evento e suportam a ideia de que o mecanismo de adaptação de checkpoint é a razão do início do ciclo mitótico (SWIFT e GOLSTEYN, 2014).

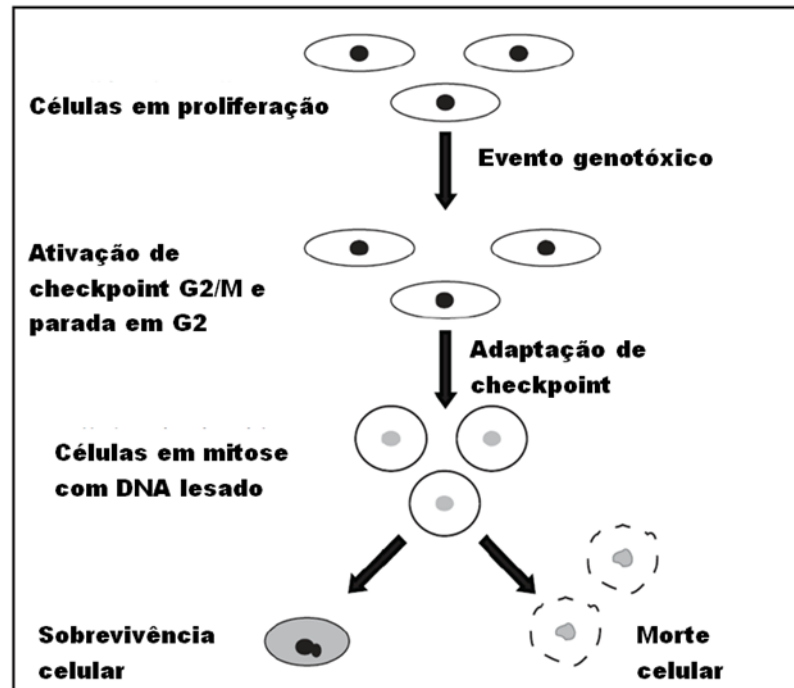


Figura 6 – Modelo de adaptação de checkpoint. Um evento genotóxico ocorre em células proliferativas, levando a ativação de checkpoints de G2/M e parada em G2. Após, células prosseguem para o evento mitótico por adaptação a checkpoints, onde a maioria segue para morte celular, mas algumas sobrevivem, provavelmente por mudanças de seu genoma. Adaptado de: Swift e Golsteyn (2014).

O evento de entrada em mitose e replicação após dano no DNA causado por agentes genotóxicos é mais comum em células de câncer devido ao fato de possuírem deficiências em diferentes aspectos de parada de ciclo celular, como deficiência em p53 em 50% de tumores humanos. (HUANG et al., 1996; CASTEDO et al., 2004; ZHANG e WANG, 2015). De fato, estudos já demonstram que inibindo as cinases Chk1 e Chk2, as células são induzidas a entrar em mitose (CURMAN et al., 2001; HIROSE et al., 2001).

As enzimas topoisomerasas são essenciais para relaxar o DNA super enrolado durante a replicação e transcrição. A TopoI é responsável por quebras simples no DNA enquanto que a TopoII é responsável por quebras duplas. A ação de clivagens dessas enzimas evita alterações no genoma por ligação covalente ao DNA, formando complexos de clivagem enzima-DNA. Inibidores de TopoII causam

DSBs enquanto que inibidores de Topol inicialmente causam SSBs, os quais são depois convertidos a DSBs quando chegam à forquilha de replicação (HSIANG et al., 1989; FROELICH-AMMON e OSHEROFF, 1995).

Foi provado que ATR tem envolvimento direto em resposta a tratamentos com inibidores de Topol e Topoll e que essa resposta parece ser independente das funções de ATM (CLIBY et al., 2002). A camptotecina (CPT), um derivado de topotecan e irinotecan, é um inibidor de Topol utilizado no tratamento de câncer colorretal, ovariano e pulmão. CPT liga-se aos complexos DNA-Topol bloqueando sua religação, acumulando assim SSBs (HSIANG et al., 1985; POMMIER, 2006). A CPTs se dissociam rapidamente dos complexos de clivagem Topol revertendo a sua inibição. Entretanto, se a inibição for mantida, ocorre a resposta aos danos no DNA e as SSBs serão convertidas em DSBs quando chegaram ao encontro da forquilha de replicação (HSIANG et al., 1989). A CPT é diretamente relacionada a parada do ciclo celular em fase S e G2/M, causando DSBs, que simultaneamente serão reparadas por recombinação homóloga (ZHOU et al., 2002; BHONDE et al., 2006). A seletividade e eficiência no tratamento do câncer com a CPT estão diretamente relacionadas às deficiências de checkpoints presentes em células de câncer (ZHOU et al., 2002). As Chk1 e Chk2 possuem funções essenciais na parada no ciclo celular induzido por CPT (SHAO et al., 1997; YU et al., 2001). Um estudo realizado com células de câncer colorretal, HT-29 e HCT116, demonstrou que Chk2 é essencial para a parada em G2/M e Chk1 é presente na reparação por recombinação homóloga quando as células são tratadas com CPT (HUANG et al., 2008).

Quanto aos inibidores de Topoll, existem dois tipos: os inibidores tipo veneno e os inibidores catalíticos. Os mecanismo de ação dos inibidores tipo veneno são semelhantes aos inibidores de Topol, os quais, ligando-se ao complexo de clivagem Topoll, impedem a religação das quebras de DNA (NITISS, 2009). O etoposídeo (ETOP) é um inibidor de Topoll do tipo veneno muito utilizado numa ampla gama de tipos de cânceres, mais comumente câncer de pulmão e testículo (BALDWIN e OSHEROFF, 2005). Estudos em linhagens HT-29 mostram uma pronunciada parada no ciclo celular em G2/M quando as células são expostas ao ETOP em apenas 24 horas de exposição e elevada morte celular após vários dias de exposição (SCHONN et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos antiproliferativos, genotóxicos e de parada do ciclo celular em células de câncer colorretal (HCT-116 e HT-29) e em fibroblasto humano (MRC5) expostas ao ditelureto de difenila (DTDF).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade (IC_{50}) do DTDF em diferentes tempos de exposição (3, 24, 48 e 72 h).
- Verificar genotoxicidade na faixa de concentrações subtóxicas definidas pelos ensaios de citotoxicidade (IC_{50}).
- Determinar o perfil de ciclo celular em exposição ao DTDF.
- Demonstrar uma possível interação do DTDF diretamente com DNA.
- Avaliar se o DTDF pode ser um agente inibidor (*poison*) de Topoll.

Capítulo I

Antiproliferative, Genotoxic and Cell Cycle Arrest Effects of Diphenyl Ditelluride in Human Colon Cancer Cells

Artigo que será submetido a revista Mutation Research – Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesis

Antiproliferative, Genotoxic and Cell Cycle Arrest Effects of Diphenyl Ditoluride in Human Colorectal Cancer Cells

André L. M. Juchem¹, Iuri M. de Oliveira¹, Miriana S. Machado¹, Temenouga N. Guecheva¹, Hernan Terenzi⁴, Claus Tröger Pich⁴, Jenifer Saffi², João A. P. Henriques^{1,3}

1. Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre - RS, Brazil
2. Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre – UFCSPA, Porto Alegre - RS, Brazil
3. Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul – UCS, Caxias do Sul - RS, Brazil.
4. Department of Biochemistry, Center of Structural Molecular Biology, Federal University of Santa Catarina – UFSC, Porto Alegre – RS, Brazil.

*Corresponding author

Dr. 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 33087602

Fax: +55 5133167003

E-mail: pegas.henriques@gmail.com

Antiproliferative, Genotoxic and Cell Cycle Arrest Effects of Diphenyl Ditelluride in Human Colorectal Cancer Cells

Diphenyl ditelluride (DPDT) is an organotellurium (OT) compound with protective biological effects, such as antioxidant, antigenotoxic and antimutagenic activities at low concentrations. However, higher concentrations of DPDT showed cytotoxic action in mammalian V79 cells by inducing oxidative damage, DNA strand breaks, cell cycle arrest and topoisomerase I (TopoI) inhibition. In this sense, the cytotoxicity of OT compounds has been reported, and their application in anticancer therapy has been suggested. Thus, the objective of this study was to investigate the antiproliferative, genotoxic and cell cycle arrest potential of DPDT in human colorectal cancer cells. The results showed cell viability decreasing when HCT116 colon cancer cells or non-tumor MRC5 cells were exposed to DPDT by 72 h, as evaluated by MTT and clonogenic assays. However, MRC5 cells were more resistant to DPDT than HCT116 cells, where IC_{50} values of 10.7 and 2 μ M were obtained for MRC5 and HCT116, respectively, in MTT assay. In the comet assay, DPDT at concentrations ≤ 5 μ M was able to increase DNA strand breaks induction only in HCT116 cells after 24 h of exposure. For a better understanding, we evaluated if DPDT was able to cause strand breaks by direct interaction with DNA. By using plasmidial DNA breakage analysis, no single or double strand breaks were detected in a range of concentrations about 0 to 400 μ M. By circular dichroism analysis, no direct interactions with DNA were also found at the same concentrations. Furthermore, cell cycle arrest in G2/M phase evaluated by flow cytometry was more pronounced in the HCT116 cell line than MRC5 cells after 24, 48 and 72 h of exposure. Taken together, HCT116 cancer colon cells were more sensitive to DPDT biological effects than non-tumor MRC5 cells. This difference may be related to the strong indirect genotoxic effects induced by DPDT in HCT116, which probably triggered cell cycle arrest. Considering the DPDT activity as topo I inhibitor, it may be suggested that the genotoxic effect observed can take place in S phase leading to G2/M arrest. This makes DPDT an interesting molecule for colorectal cancer antiproliferative approach.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) represents the third most frequent worldwide type of cancer and was responsible for about 700,000 deaths by year in last few years [1, 2]. CRC occurs in the large intestine and rectum and affects men and women. Surgery is the initial treatment and may be followed by radiotherapy and chemotherapy [3, 4]. CRC progresses through a series of clinical and histopathological stages, ranging from benign tumors (polyps) to malignant cancers (carcinoma) [5].

Regarding to current chemotherapy options against CRC, 5-FU, leucovorin and oxaliplatin are the most often antineoplastic agents used individually or in an association manner. In the most advanced stage, the combination of chemotherapy agents is associated to target drugs [6]. However, even with the current therapy available, the relative survival outcome rates are still low, about 64% at 5 years following diagnosis and 58% at 10 years [7], reinforcing the need of development of new anticancer agents to improve CRC treatment success.

Several studies are being carried out with organotellurium (OT) compounds using *in vitro* and *in vivo* models, and interesting pharmacological properties as immunomodulation, mimetic activity to glutathione peroxidase enzyme (GPx) and antitumor activities have been observed [8-10]. Regarding to OT toxic potential, studies demonstrated cell growth inhibition, genotoxicity and systemic toxicity in different *in vitro* and *in vivo* biological models [11-14].

In the context of anticancer therapy, some tellurium-containing compounds were able to reduce tumor growth in cell cultures [15]. For example, diphenyl ditelluride, 3,3'-diaminodiphenyl ditelluride and 4,4'-diisopropylidiphenyl ditelluride induced cell death by apoptosis in human promyelocytic leukemia cells (HL-60 cell line) [16]. Similar results were found in the evaluation of cytotoxic effect of 2,2'-dimethoxydiphenyl ditelluride and 2,2'-diamino-3,3',5,5'-tetramethyldiphenyl ditelluride in the same cell line [13]. It was showed that other diaryl ditellurides are able to induce alterations in cell cycle and apoptosis, showing an anti-proliferative effect. Some tellurium containing organic compounds are effective in selectively inhibit the cysteine proteinase activity of cathepsin-B, which makes them candidates for antimetastatic drugs [13, 15]. Regarding to OT anticancer properties, AS101 is the main OT compound studied and it has demonstrated interesting against different

cancer types as cutaneous T-cell lymphoma, myeloma and melanoma in mice [16-19]. Interestingly, it has been demonstrated synergistic effect of AS101 and taxol in reducing lung adenocarcinoma in *murinae* models [20]. AS101 antitumor effects were attributed to immunomodulatory effects, high generation of reactive oxygen species, G2/M phase arrest and apoptosis induction by activation of caspase 3 and 9 [17-19]. Diphenyl ditelluride (DPDT) is an organic tellurium compound, solid, and an important intermediate in organic synthesis reactions [11]. Some studies have been reported with this compound due to its toxicological properties and interesting pharmacological activities [8, 11].

DPDT was able to induce genotoxic and mutagenic effects in different biological models. Using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae* strains, our research group demonstrated that DPDT is able to induce frameshift mutation and pro-oxidant effects. In addition, base excision repair (BER) and recombination repair (RR) deficient *S. cerevisiae* strains showed high sensitivity to this compound [12]. In mammalian cell lines, DPDT showed cytotoxicity, genotoxicity and pro-oxidant activity [11] that were related to activation of caspases 3/7 and 9 and also topoisomerase I (TopoI) inhibition, evaluated in supercoiled plasmid DNA [21]. On the other hand, antigenotoxic and antimutagenic effects were observed when V79 cell line was exposed to DPDT in low concentrations (less than 1 μ M) [22].

Regarding the potential DPDT antitumor activity in CCR, few studies have been carried out until now [23,24]. DPDT was able to induce a significant cell viability decrease in HT-29 and Caco-2 human colorectal cancer cells. Furthermore, when HT-29 cells were exposed to high concentrations of DPDT, it was observed a decrease of GSH/GSSH and induction of apoptosis via caspase 3/7 and 9 activation [23, 24].

Therefore, the aim of the present study was to investigate the mechanism of action related to DPDT cytotoxic effects on human colorectal cells by evaluation of antiproliferative, genotoxic and cell cycle arrest potential in HCT116 and HT-29 cell lines.

Methods

Chemicals and cell lines

DPDT (CAS registry number 32294-60-3), cytochalasin-B (Cyt-B) and methylmethanesulfonate (MMS) were purchased from Sigma-Aldrich. 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). Low-melting point agarose and normal agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All other reagents were of analytical grade. The tissue culture flasks (bottles and dishes) were supplied by TPP (Trasadingen, Switzerland). Propidium Iodet (PI) was purchased from Thermo Fisher. HEPES buffer (piperazine-N,N0-bis[ethanesulfonic acid) and HEPES buffer [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N0-(2-ethanesulfonic-acid)] were purchased from Sigma Aldrich MRC5 and HT-29 were purchased from ATCC®. HCT116, HCT116, HCT116 p21^{-/-}, HCT116 p53^{-/-} and HCT116 BAX^{-/-} cells were gently provided by Annette K. Larsen (Université Pierre et Marie Curie - INSERM, Paris).

Cell culture and treatments

MRC5, HT29 and HCT116, HCT116 p21^{-/-}, HCT116 p53^{-/-} and HCT116 BAX^{-/-} cells were cultivated in standard conditions with high glucose DMEM medium supplemented with heat-inactivated 10 % FBS and antibiotics. Cells were maintained in 25 cm² culture bottles at 37 °C and humid atmosphere with 5% CO₂. For harvesting and culture establishment, PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4) and 0.25 % trypsin-EDTA were used. For the experiments, DPDT was diluted in DMSO and further diluted in DMEM culture medium, obtaining different concentrations. The final concentration of DMSO used in the cultures was 0.5 % to prevent DMSO cytotoxicity.

MTT Assay

To evaluate cell viability, it was used the MTT reduction assay described by Mosmann (1983) [25] with minor modifications. Basically, this method uses the tetrazolium salt, in which is metabolized by the mitochondria of viable cells forming formazan. Then, this purple insoluble colored product is diluted in DMSO and

quantified by spectrophotometry at 540 nm [25]. Cells were cultured in triplicate in 24-well plates. After 24 h, cells were exposed to DPDT concentrations from 0.1 to 20 μM for 3, 24, 48 or 72h. The absorbance results were used to estimate the cell viability and IC_{50} values using a nonlinear regression.

Clonogenic Assay

The clonogenic assay is frequently used in cancer research laboratories to determine the drug effects on cell survival and proliferation [26] and in this study it was used as a second method to evaluate cell viability. Cultures were established in triplicate in 6 well plates (200 cells per well). After 24 h, cells were exposed to DPDT concentrations from 0.1 to 5 μM for 72 h. After exposure to DPDT, cultures were washed with PBS and incubated in drug-free DMEM culture medium for 7 to 10 days. After, the medium was removed, cells were fixed in methanol and then colonies were stained with crystal violet. To estimate cell viability, colonies with more than 50 cells were counted in each well and IC_{50} values were calculated by using a nonlinear regression.

Comet assay

To evaluate the genotoxic potential of DPDT, the comet assay or single cell gel electrophoresis was used [27]. This technique can be described as an electrophoresis in suspended cells on a pre-coated slide in agarose and lysed by detergent and high salt concentrations, leaving only the nucleoid. All the fragments that come from DNA damage when subjected to an electric potential difference during electrophoresis, migrate to the positive pole (anode), forming a tail like that of a comet, where comes the name of the test. Thus, damage classes are set out in the DNA according to the size of this tail ranging from zero to "0" to four "4", in which they are analyzed and made statistics as to the frequency and damage class [27]. One hundred nucleoids of each culture are assessed visually and categorized into five classes damage: (i) damage 0: no damage, no tail is observed; (ii) damage 1: the tail length is smaller than the diameter of the head; (iii) damage 2: the length of the tail is 1-2 times the diameter of the head; (iv) damage 3: the tail is greater than twice the diameter of the head; (v) damage 4: comets without a clear head. Visual analysis of the comet assay is an internationally accepted method and has a significant

correlation with computerized analysis [28, 29]. Results were expressed in damage index.

Flow cytometry

Flow cytometry is a method for quick individual analysis of a large number of cells using light scattering, fluorescence and absorbance [30]. Cells were cultured in triplicate in 24-well plates. After 24 h, cells were exposed to 5 and 10 μ M DPDT for 3, 24, 48 and 72 h. Cells were then fixed in 70 % ethanol and stained with propidium iodide for 30 min at 37 °C. Then, ten thousand cells (ten thousand events) were analyzed by Guava® easyCyte Cytometer (EMD Millipore, Germany) to determinate the cell cycle profile and arrest.

DNA cleavage assays

Plasmid DNA was used to assay cleavage activity of DPDT as previously described, [32] with minor modifications. Different concentrations of DPDT (0, 25, 50, 100, 200 and 400 μ M) were incubated with 0.6 μ g of pBSK II plasmid DNA, at pH 7.5 in 10 mM HEPES buffer (piperazine-N,N0-bis[ethanesulfonic acid] and 8.0 in 25 mM HEPES buffer [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N0-(2-ethanesulfonic-acid)], at 50 °C for 16 h. All incubations were performed in triplicates. Samples were submitted to agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. The resulting gels were digitalized with a photodocumentation system (UVP, CA, USA) and DNA bands were quantified using Lab-Works™ Software version 4.0 (UVP, Inc.).

Circular Dichroism DNA Interaction Assay

Circular Dichroism (CD) is a method that detects alterations in optical activity of chiral molecules using its interaction with circularly polarized electromagnetic rays [28]. The B-form conformation of CT- DNA shows two CD bands in the UV region, a positive band at 278 nm due to base stacking and a negative band at 246 nm due to polynucleotide helicity. The experiments were carried out as described in the literature with small modifications [31]. One sample of CT-DNA in 10mM of HEPES buffer was titrated with DPDT in molar ratios of 0, 25, 50, 100, 200 and 400 μ M. The screenings were performed ranging from 220 to 600 nm at 37 °C immediately after the addition of the complexes. Results were plotted on tables and graphics

presenting the regions of major interest were produced. Spectra containing only the complexes and DNA with growing concentrations of solvent (acetonitrile) were analyzed as control reactions. All incubations were performed in triplicates.

Statistical analysis

The data were obtained from at least three independent experiments, and the results are expressed as mean \pm SD. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by test of Tukey or Dunnet with $p < 0.05$ considered as statistically significant.

Results

Colorectal tumor cell lines are more sensitive to diphenyl ditelluride cytotoxic effects than non-tumor cell line.

To evaluate the influence of DPDT on cell viability in human cell lines, non-tumor MRC5 and colorectal tumor HCT116 and HT-29 cell lines were exposed to DPDT for 72 h and analyzed by MTT assay. As illustrated in figures 1A and 1C, DPDT was able to induce a decrease in cell viability in dose-response manner in non-tumor or tumor cell lines. In addition, a clear difference in sensitivity to DPDT exposure was observed for HCT116 and HT-29 in comparison to MRC5 cell line. In this assay, DPDT concentrations of 10.74, 1.99 and 2.47 μM were estimated as IC_{50} values for MRC5, HCT116 and HT-29 respectively. To further investigate the activity of DPDT on cell survival, cells were also exposed to DPDT and the colony formation capacity was analyzed. In this assay, cytotoxic effects were also observed in non-tumor or tumor colorectal cells after exposure to DPDT for 72 h (Fig. 1C). However, the difference among the cell types was less pronounced than those detected by MTT assay. DPDT concentrations of 6.42, 2.53 and 3.04 μM were obtained in the clonogenic assay as IC_{50} values for MRC5, HCT116 and HT-29, respectively.

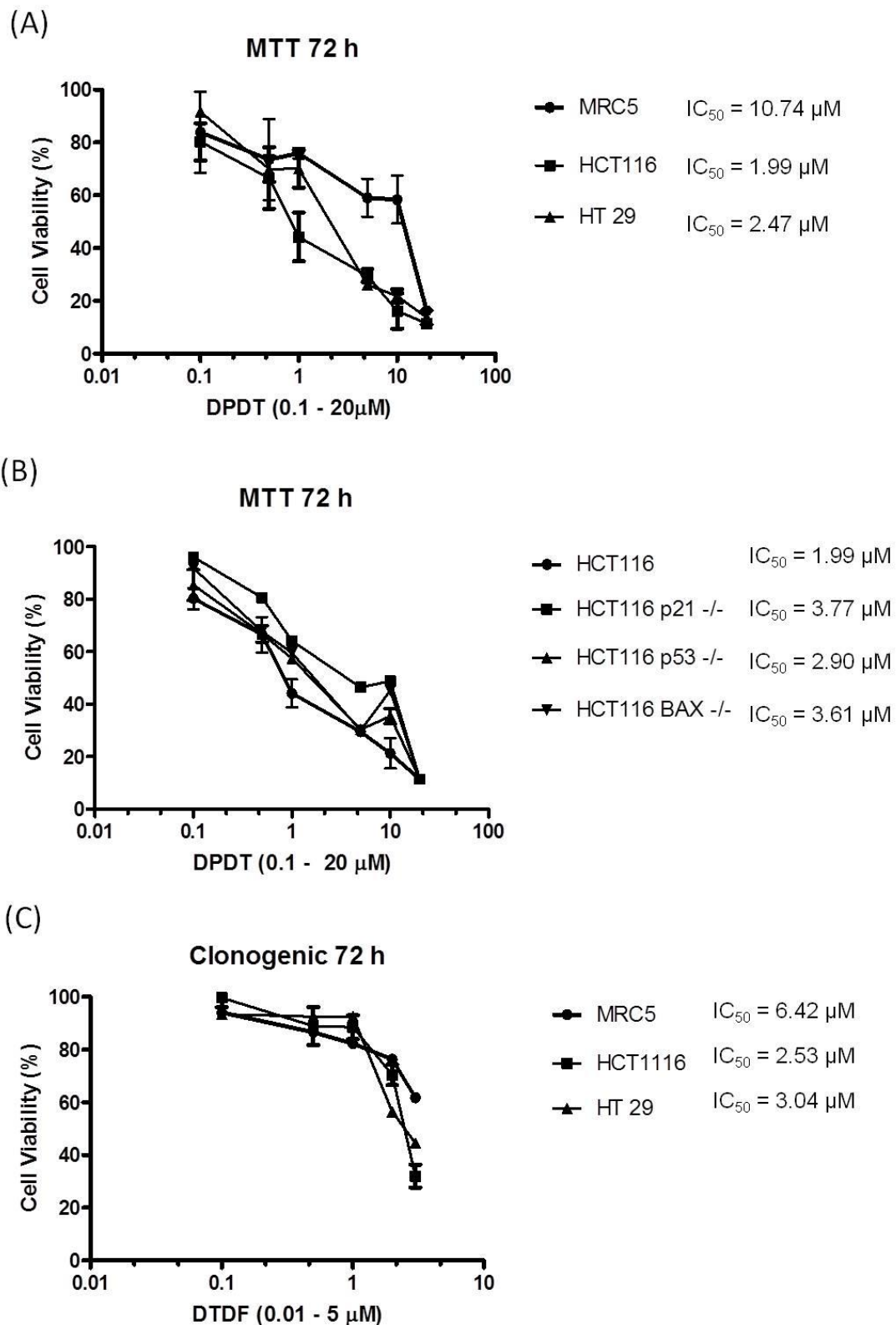


Figure 1: Cell Viability of DPDT 72 h of exposure. (A) MTT with MRC5, HCT116 and HT-29; (B) MTT with HCT116, HCT116 p21^{-/-}, HCT116 p53^{-/-} and HCT116 BAX^{-/-} and (C) Clonogenic assay with MRC5, HCT116 and HT-29. All graphs indicate the IC₅₀ values for each cell lines.

Table 1 - IC₅₀ Values for MTT Assay – DPDT exposure in μ M

| Cell Line | 24h^a | 48h | 72h |
|---------------------------|------------------------|------------|--------------|
| MRC5 | 11.90 ^b | 7.48 | 10.74 |
| HCT116 | 5.37 | 3.70 | 1.99 |
| HCT116 p21 ^{-/-} | 17.82 | 12.72 | 3.77 |
| HCT116 p53 ^{-/-} | 13.54 | 13.20 | 2.90 |
| HCT116 BAX ^{-/-} | 14.77 | 9.82 | 3.61 |

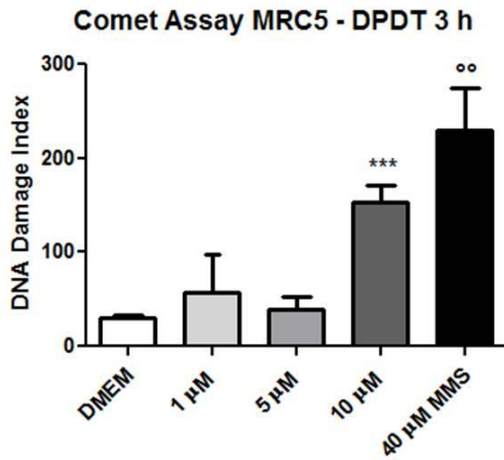
^a DPDT exposure in hours (h).

^b IC₅₀ (μ M) values for MTT assay.

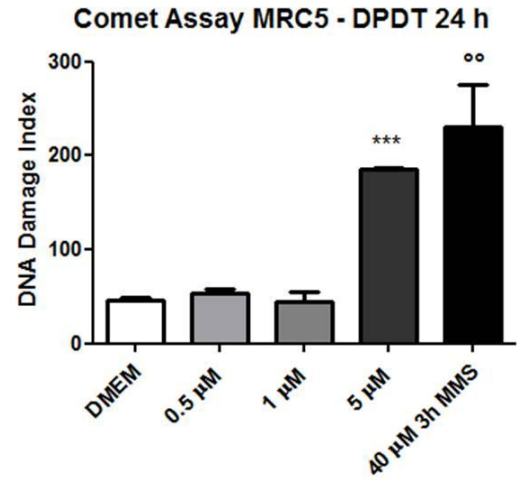
Colorectal tumor cells are more sensitive to diphenyl ditelluride genotoxic effects than non-tumor cells.

To evaluate the DPDT genotoxic potential in non-tumor and tumor cell lines the alkaline comet assay was performed. For the 3 h comet assay, concentrations were chosen based on the cytotoxic profile obtained after 3 h of cell exposure to DPDT and further evaluated by MTT assay in a previous experiment (data not showed), where 10 and 5 μM represents the IC_{50} values for MRC5 and HCT116 respectively. As demonstrated in Figure 2A, DPDT was able to induce DNA strand breaks in MRC5 and HCT116 cell lines after 3 h of cell exposure. MRC5 cells demonstrated DNA damage only when cells were exposed to the highest DPDT concentration (Fig. 2A). However, HCT116 was more sensitive to DPDT genotoxic effects, where significant DNA breaks increase was detected in lower DPDT concentrations when compared to MRC5 cells (Figs. 2A and 2C). Also using exposure-related IC_{50} concentrations, similar genotoxic effects were detected when cells were exposed to DPDT for 24 h. As illustrated in figures 2B and 2D, DPDT was able to induce DNA breaks in lower concentrations in HCT116 than in MRC5 cell lines.

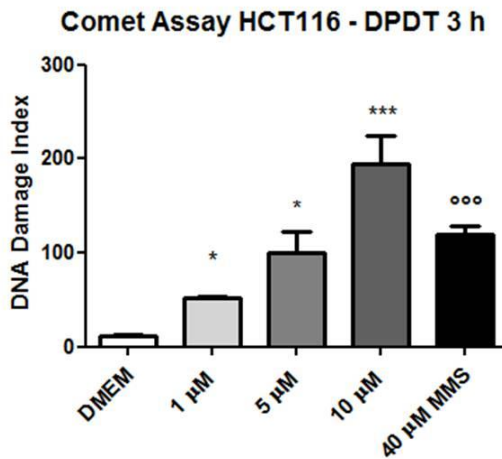
(A)



(B)



(C)



(D)

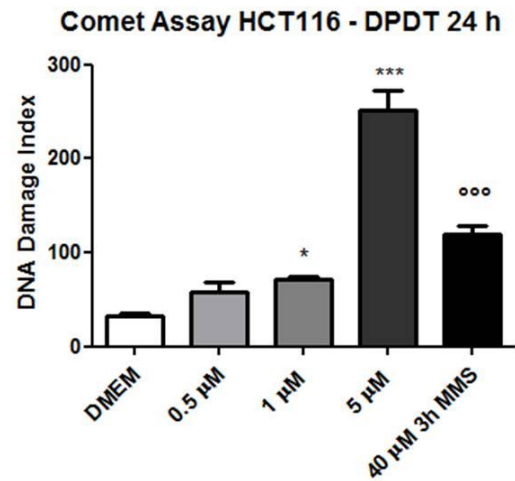


Figure 2: Comet assay with DPDT in MRC5 and HCT116 cells. (A) 3 h exposures for MRC5 1, 5 and 10 μ M and (B) 24 h exposures for MRC5 0,5, 1 and 5 μ M. (C) 3 h exposures for HCT116 in 1, 5 and 10 μ M and (D) 24 h exposures for HCT116 in 0,5, 1 and 5 μ M. Data were analyzed followed by One Way ANOVA Dunnet: * $p < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $p < 0.001$. Results are expressed in DNA damage index by the mean \pm standard deviation.

Diphenyl ditelluride is not able to directly interact with DNA molecule.

To evaluate the mechanism of DPDT genotoxicity, two cell-free *in vitro* methods were performed using plasmid DNA. No alterations as single strand breaks or double strand breaks were detected, in plasmidial DNA, for all DPDT concentrations tested (0 to 400 μM) when compared to the negative control. (Figs. 3A and 3B). In plasmidial DNA, DPDT was not able to induce differences in circularly polarized electromagnetic rays reading evaluated by the dichroism circular DNA interaction assay (Fig. 4). These results may suggest that DPDT is not able to directly interact with DNA.

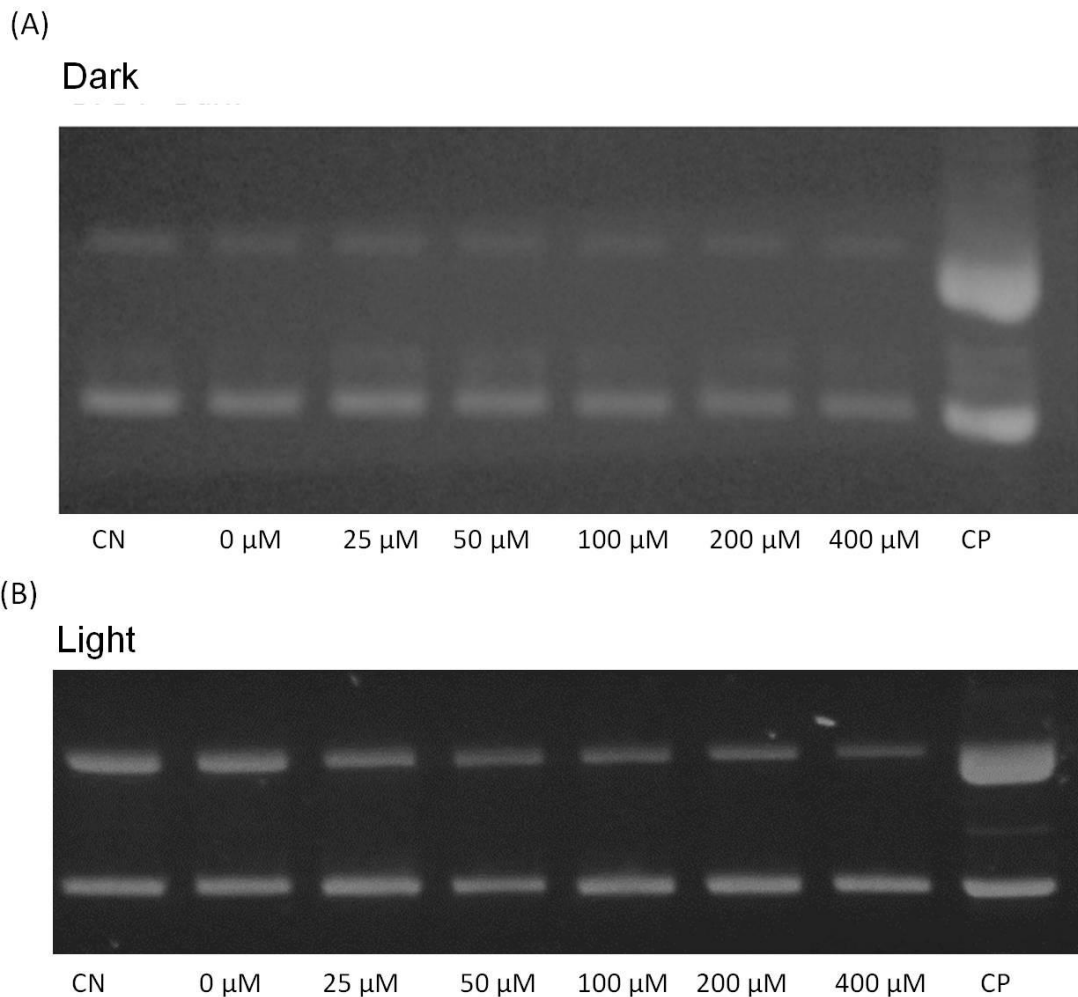


Figure 3: DNA cleavage assay. (A) DPDT analyses in dark condition and (B) analyses in light condition in 0, 25, 50, 100, 200 and 400 μM doses. Samples were submitted to agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide.

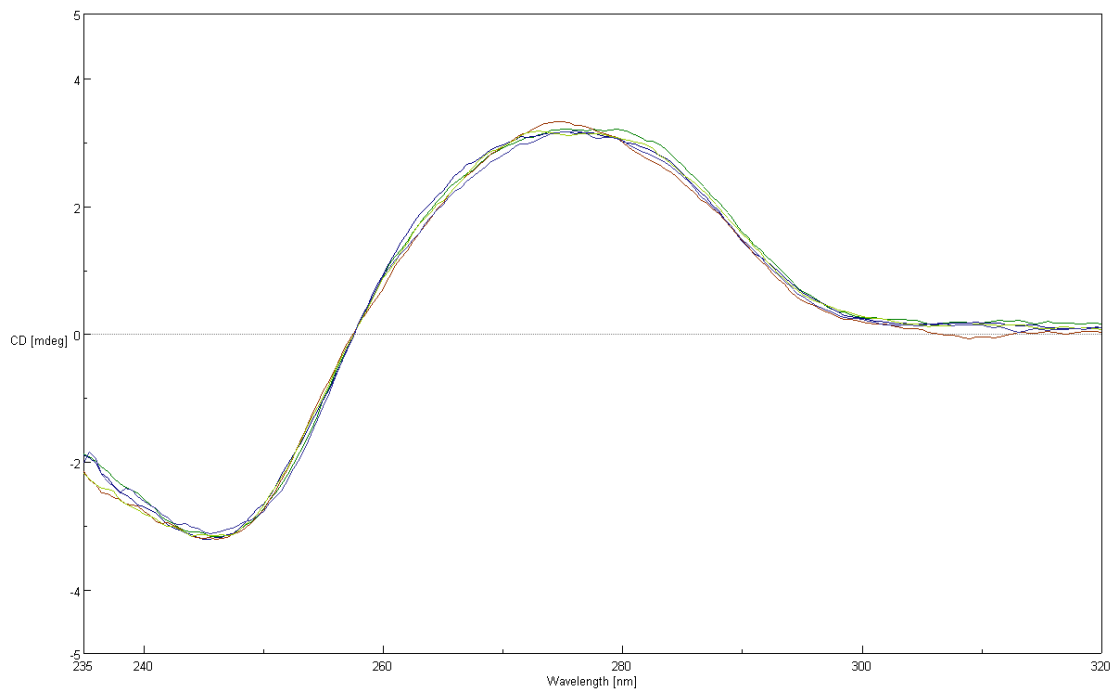


Figure 4: Circular Dichroism Assay. The CD spectra of different DPDT concentrations are represented in the graph by wavelength absorption of polarized light. Lines represent the 0, 25, 50, 100, 200 and 400 μM doses of DPDT.

Diphenyl ditelluride genotoxic concentrations induced cell accumulation in G2/M phase in non-tumor or colorectal tumor cell lines.

To investigate the cellular response to DPDT genotoxic effects, cell cycle analyses were performed after 3, 24, 48 and 72 h of cell exposure to DPDT. No difference was detected when cells were exposed to DPDT for 3 h for MRC5 but in HCT116 occurs accumulation in G2/M phase in 5 and 10 μM DPDT (Figs. 5A and 5E). After 24 h, DPDT genotoxic concentrations ($\geq 5 \mu\text{M}$ DPDT) were able to induce significant and strong accumulation of HCT116 cells in G2/M phase, while MRC5 showed significant G2/M arrest when exposed to 10 μM DPDT, the related DPDT genotoxic concentration for this exposure time (Figs. 5B and 5F). G2/M cell accumulation was also detected in both cell lines exposed to $\geq 5 \mu\text{M}$ DPDT for 48 h (Figs. 5C and 5G). In 72 h of exposure, similar G2/M accumulation results were obtained in both cell lines (Figs. 5D and 5H), however it was also observed an increase of cell percentage in S phase when MRC5 or HCT116 cells were exposed to 5 μM DPDT (Figs. 5D and 5H), For all exposure times, 1 μM DPDT did not affect the percentage of cells in any phase.

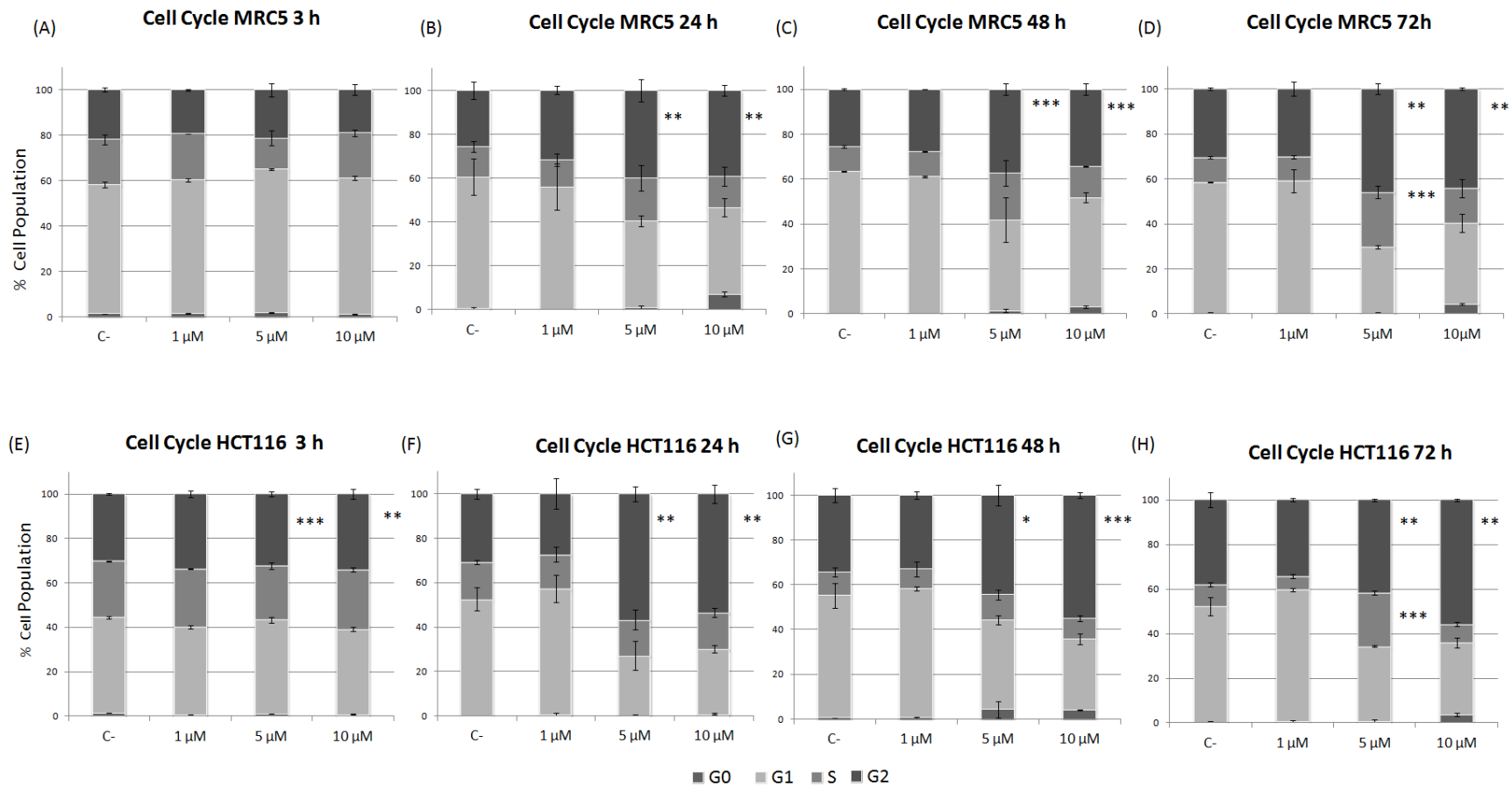


Figure 5: Cell cycle analysis graphs of DPDT exposures. (A) MRC5 3 h; (B) MRC5 24 h; (C) MRC5 48 h; (D) MRC5 72 h; (E) HCT116 3 h; (F) HCT116 24 h; (G) HCT116 48 h and (H) HCT116 72 h of exposures for in 1, 5 and 10 μM. Data were analyzed by One Way ANOVA Dunnet: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Results are expressed in by the mean \pm standard deviation.

p53, p21 and BAX genes may influence colorectal cells response to diphenyl ditelluride antiproliferative effects.

To further investigate the DPDT mechanism of action, the influence of p53, p21 and BAX genes was also studied. For this, the viability of p53, p21 and BAX deficient HCT116 cell lines was evaluated by MTT assay after 24 h, 48 h and 72 h of DPDT exposure. As demonstrated in the Table 1, HCT116 p53^{-/-}, HCT116 p21^{-/-} and HCT116 BAX^{-/-} showed less sensitivity to DPDT cytotoxic effects than HCT116 wild type in all exposure periods used. Regarding to IC₅₀ values, it can be observed a 2,5 – 3,6 times increase of resistance of HCT116 p53^{-/-}, HCT116 p21^{-/-} and HCT116 BAX^{-/-} to DPDT in comparison to HCT116 wild type cell line in 24 h and 48 h and this difference decreased after 72 h of exposure (Fig. 6). These results suggest that the absence of p53, p21 and BAX active genes influenced the cell response to DPDT cytotoxic effects, rendering a resistance profile-like to HCT116 cells.

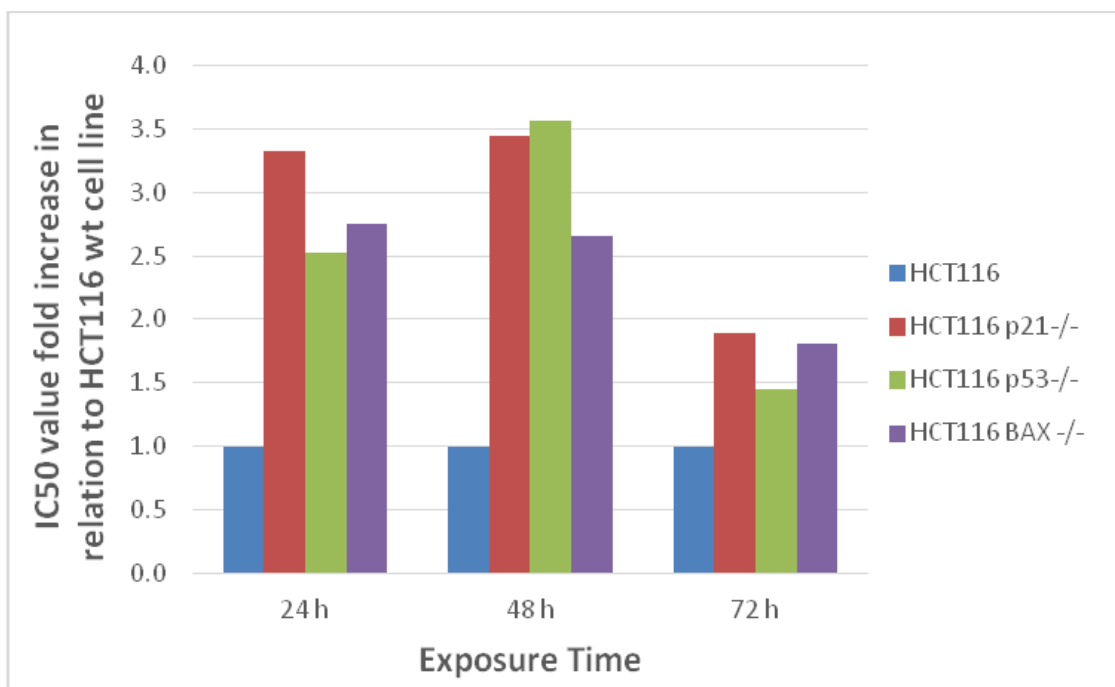


Figure 6: HCT116 wt, p53, p21 and BAX cell lines progression IC₅₀ values progression during times of exposures to DPDT.

Discussion

Colorectal cancer is the most commonly treated malignancy in the gastrointestinal tract worldwide, and also one of the most cancer-related cause of death [32], accounting for more than 600 thousand deaths throughout the year [33]. The high recurrence of tumors and the side effects of chemotherapy reduce the efficacy of a wide variety of anticancer agents that are currently used in the clinic [34]. In these sense, the organotellurium compounds have been studied for their potential antiproliferative activity in cancer cells [35, 36].

Diphenyl ditelluride (DPDT) is an OT compound that showed interesting cytotoxic properties in yeast and non-tumor rodent cell lines, leading to DNA breaks and apoptosis [12, 21]. In the present work, we aimed to evaluate if DPDT was also able to induce antiproliferative effects in human colorectal tumor cells and also to investigate the possible implicated mechanisms.

By using two different methods to estimate cell viability, it was observed that DPDT is able to induce antiproliferative effects in non-tumor or colorectal cancer cell lines (Figs. 1A, 1B and 1C). These results are similar to those found in V79 cells [11], however V79 cells were more sensitivity to DPDT than human cell lines and this difference may be related to biology among cell line types and also due to p53 deficient status of V79 cells [41]. However, a clear sensitivity difference between MRC5 and colorectal cancer cells was observed in our study. In the MTT assay, HT29 and HCT116 were about 4 – 5 x more sensitive to DPDT than MRC5 (Fig. 1). This difference range was less pronounced when cell survival was evaluated by clonogenic assay, but colorectal cells were also more sensitive (about 2 x) to DPDT than non-tumor cells (Figs 1A and 1C). The differences detected between MTT and clonogenic assays may be related to the endpoint analyzed, since these methods estimate cell viability by mitochondrial and colony formation capacity, respectively. Besides these differences, our findings corroborate with previous works from Vij and Hardei [23,24]. In both works, a clear sensitivity of HT-29 cells to DPDT was demonstrated, besides differences among the range of concentrations used in relation to the present study [23, 24].

To investigate if DPDT is able to induce genotoxic effects in human cell lines, alkaline comet assay was performed with 3 h and 24 h of cell exposure to DPDT. In non-tumor or colorectal tumor cell lines, DPDT was able to induce DNA damage after

3 h or 24 h of exposure. However, HCT116 showed a higher sensitivity to DPDT genotoxic effects than MRC5 cells, as verified by higher damage index detected in both exposure times (Figs 2A to 2D). In addition, HCT116 cells showed significant DNA breaks increase in all DPDT concentrations used in the 3 h test, and in the majority of DPDT concentrations in 24 h exposure time (Figure 2 C and 2 D).

Since DNA replication is an essential phase of the cell cycle, several genotoxic antitumor agents commonly used in cancer therapy also interfere with cell cycle progression. After DNA damage induction, cells detect the genotoxic insult and cell cycle checkpoints are triggered, leading to cell cycle arrest and/or cell death [37]. To verify if the DPDT genotoxic effects detected in MRC5 and HCT116 cell lines may activate cell cycle checkpoint, cells were exposed to DPDT for different periods and cell cycle analysis were performed by flow cytometry. As illustrated in Figures 5A to 5H, DPDT was able to induce cell accumulation in G2/M phase in both cell lines. This effect detected in 3 h for HCT116 and after 24 h of cell exposure to DPDT continued until 72 h, where S phase accumulation was also observed. When MRC5 and HCT116 responses were compared in DPDT equicytotoxic concentrations (5 and 10 μ M DPDT, for HCT116 and MRC5, respectively), it can be observed that both cell lines showed G2/M cell cycle arrest. However, HCT116 demonstrated a more pronounced response, as detected by the higher percentage relative cell populations in G2/M in comparison to MRC5 cell line in nearly all DPDT concentrations and exposure periods tested (Figs. 5A to 5H).

Moreover, cell cycle perturbation induced by DPDT might be related to a viability difference observed among HCT116 wild type and p53, p21 and BAX-deficient HCT116 cell lines to DPDT. When cells were exposed to DPDT for 24 and 48 h, a clear resistance was verified in the three deficient HCT116 in comparison to wild type cell line, where HCT116 demonstrated about 3 x more sensitive to DPDT in relation to deficient cells (Fig. 6). This difference decreased when cells were exposed to DPDT for 72 h (Table 1). However, these results may suggest that the presence of functional cell cycle checkpoint and apoptosis pathways influence the early cell damage response to DPDT.

Cell cycle arrest or cell death caused by genotoxic agents can occurs by direct interaction with DNA or indirectly genotoxic effects, such as topoisomerase inhibition that leads to single strand breaks or double strand breaks [38]. In previous studies of

our group, DPDT showed the capacity of inducing frameshift mutation in *S. typhimurium* and *S. cerevisiae* yeast and mutants deficient in BER and RR DNA repair pathways showed high sensitivity to DPDT [12]. Furthermore, DPDT was able to induce Topo I inhibition [21]. These findings may suggest that DPDT interacts with DNA, but no evidence of a direct interaction mechanism was observed until now.

For a better understanding of the genotoxicity results, we investigate if DPDT is able to generate direct DNA interactions and possible modifications like single DNA breaks, double DNA strand breaks, intercalations and adducts formation by using two different methods. For the DNA cleavage assay, DPDT showed no single or double strand breaks induction in plasmid DNA (Figs. 3A and 3B). Furthermore, by circular dichroism analysis, it was observed no influence of DPDT on the wavelength in all DPDT concentrations tested, indicating that DPDT is not able to induce alterations in optical activity of plasmid DNA. These results suggest that DPDT is not able to directly interact to DNA in its native molecular form.

The production of reactive oxidative species (ROS) are one of the reasons of genotoxic activity and cell cycle dysfunction of many anticancer agents and ROS are highly reactive and damaging to biological molecules, including DNA [39]. GSH is among the most remarkable antioxidant system in organisms due its potent antioxidant capacity, close envelopment in many cellular functions, and abundance in tissues and cells [40, 41]. Previous works demonstrated that DPDT is able to induce GSH/GSSG ratio decrease in *S. cerevisiae* and in V79 and HT-29 cell lines [12]. Regarding these results observed in different eukaryotic models, we can suggest that the DPDT genotoxic effects observed in MRC5 and HCT116 cell lines may be related to oxidative stress induction by DPDT.

Nevertheless, it is remarkable that DNA damage induced by widely used cancer drugs and their effect upon proliferating cancer cells are related on its checkpoints elements involvement [38]. It was reported that Topotecan, and inhibitor of TopoI, induces both G2 and S phase arrest in GM847/kdATR cells and its cell cycle arrest are dependent of ATR kinase function [42]. As previously reported, the DPDT showed TopoI inhibition by DNA relaxation assay and the yeast strain *topoI* Δ showed resistance to DPDT [21]. Since we proved that DPDT has no direct interaction with DNA, the Topo interactions become also a strong possibility to explain genotoxic and G2/M arrest effects of this OT compound.

In summary, DPDT demonstrated cytotoxic, genotoxic and cell cycle perturbation effects in human cell lines. However, colorectal tumor cell lines were more sensitive to DPDT than non-tumor cells in all endpoints analysed. Furthermore, viability results from p53, p21 and BAX deficient HCT116 cell lines suggest that cell cycle checkpoint and apoptosis pathways play a role in the early DPDT cytotoxic effects. Taken together, our findings show for the first time that DPDT induces genotoxicity in colorectal cells by an indirect mechanism and this toxic activity lead to cell cycle arrest and cell death.

References

1. World Health, O., *Global status report on noncommunicable diseases 2014*. 2014.
2. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016*. CA Cancer J Clin, 2016. **66**(1): p. 7-30.
3. Zavoral, M., et al., [*Population screening of colorectal carcinoma in the Czech Republic*]. Rozhl Chir, 2009. **88**(6): p. 292-4.
4. Zavoral, M., et al., *Colorectal cancer screening in Europe*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(47): p. 5907-15.
5. Michor, F., et al., *Dynamics of colorectal cancer*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(6): p. 484-93.
6. Society, A.C., *Treatment of colon cancer, by stage*. 2016.
7. Society, A.C., *Colorectal Cancer Facts & Figures: 2014 - 2016*. 2014.
8. Hassan, W., et al., *Influence of pH on the reactivity of diphenyl ditelluride with thiols and anti-oxidant potential in rat brain*. Chem Biol Interact, 2009. **180**(1): p. 47-53.
9. Nogueira, C.W., G. Zeni, and J.B. Rocha, *Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology*. Chem Rev, 2004. **104**(12): p. 6255-85.
10. Sredni, B., *Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents*. Semin Cancer Biol, 2012. **22**(1): p. 60-9.
11. Cunha, R.L., I.E. Gouvea, and L. Juliano, *A glimpse on biological activities of tellurium compounds*. An Acad Bras Cienc, 2009. **81**(3): p. 393-407.
12. Degrandi, T.H., et al., *Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models*. Mutagenesis, 2010. **25**(3): p. 257-69.
13. Sailer, B.L., et al., *Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog*. Toxicol In Vitro, 2004. **18**(4): p. 475-82.
14. Schiar, V.P., et al., *Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: a possible involvement of reactive oxygen species*. Chem Biol Interact, 2009. **177**(1): p. 28-33.
15. Rigobello, M.P., et al., *Treatment of human cancer cells with selenite or tellurite in combination with auranofin enhances cell death due to redox shift*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(6): p. 710-21.
16. Sailer, B.L., et al., *Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line*. Arch Toxicol, 2003. **77**(1): p. 30-6.
17. Hayun, M., et al., *The immunomodulator AS101 induces growth arrest and apoptosis in multiple myeloma: association with the Akt/survivin pathway*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1423-31.
18. Naor, Y., et al., *Multiple signal transduction pathways are involved in G2/M growth arrest and apoptosis induced by the immunomodulator AS101 in multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 2013. **54**(1): p. 160-6.
19. Xu, R., et al., *Inhibition of B16 melanoma metastasis by the immunomodulator AS101*. Int J Oncol, 1996. **9**(2): p. 319-25.
20. Kalechman, Y., et al., *The antitumoral effect of the immunomodulator AS101 and paclitaxel (Taxol) in a murine model of lung adenocarcinoma*. J Immunol, 1996. **156**(3): p. 1101-9.

21. Jorge, P.M., et al., *Diphenyl ditelluride-induced cell cycle arrest and apoptosis: a relation with topoisomerase I inhibition*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2015. **116**(3): p. 273-80.
22. Trindade, C., et al., *Antigenotoxic and antimutagenic effects of diphenyl ditelluride against several known mutagens in Chinese hamster lung fibroblasts*. Mutagenesis, 2015. **30**(6): p. 799-809.
23. Vij, P. and D. Hardej, *Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non-transformed human colon cells*. Environ Toxicol Pharmacol, 2012. **34**(3): p. 768-82.
24. Vij, P. and D. Hardej, *Alterations in antioxidant/oxidant gene expression and proteins following treatment of transformed and normal colon cells with tellurium compounds*. Environ Toxicol Pharmacol, 2016. **43**: p. 216-24.
25. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
26. Franken, N.A., et al., *Clonogenic assay of cells in vitro*. Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2315-9.
27. Singh, N.P., et al., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp Cell Res, 1988. **175**(1): p. 184-91.
28. Burlinson, B., et al., *Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup*. Mutat Res, 2007. **627**(1): p. 31-5.
29. Collins, A.R., *The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations*. Mol Biotechnol, 2004. **26**(3): p. 249-61.
30. Rieseberg, M., et al., *Flow cytometry in biotechnology*. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **56**(3-4): p. 350-60.
31. Bortolotto, T., et al., *Photoinduced DNA cleavage promoted by two copper(II) complexes of tetracyclines and 1,10-phenanthroline*. Inorg Chem, 2011. **50**(21): p. 10519-21.
32. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
33. Ahlquist, D.A., et al., *Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas*. Gastroenterology, 2012. **142**(2): p. 248-56; quiz e25-6.
34. Ali, R., et al., *New anticancer agents: recent developments in tumor therapy*. Anticancer Res, 2012. **32**(7): p. 2999-3005.
35. Engman, L., et al., *Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells*. Bioorg Med Chem, 2003. **11**(23): p. 5091-100.
36. Engman, L., et al., *Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells*. Anticancer Drug Des, 2000. **15**(5): p. 323-30.
37. Helleday, T., et al., *DNA repair pathways as targets for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(3): p. 193-204.
38. Swift, L.H. and R.M. Golsteyn, *Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(3): p. 3403-31.
39. Shackelford, R.E., W.K. Kaufmann, and R.S. Paules, *Oxidative stress and cell cycle checkpoint function*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(9): p. 1387-404.

40. Meister, A., *Glutathione, ascorbate, and cellular protection*. *Cancer Res*, 1994. **54**(7 Suppl): p. 1969s-1975s.
41. Meister, A. and M.E. Anderson, *Glutathione*. *Annu Rev Biochem*, 1983. **52**: p. 711-60.
42. Cliby, W.A., et al., *S phase and G2 arrests induced by topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(2): p. 1599-60

3. Resultados Complementares

3.1. Avaliação da inibição de Topoll pelo método TARDIS

A Topoll é uma enzima nuclear que controla a topologia do DNA, modificando sua estrutura pela inserção de DSB temporárias no DNA, permitindo o relaxamento da sua supertorção e facilitando os processos celulares como a transcrição e replicação do DNA. Existem duas isoformas da Topoll que são a Topoll α e a Topoll β , sendo que ambas são homólogas na sequência de aminoácidos, porém codificadas por genes diferentes. Devido a sua importância para a manutenção do ciclo celular, a Topo II tem sido alvo de diversos agentes anticâncer (AUSTIN et al., 1993; BURDEN e OSHEROFF, 1998; KELLNER et al., 2002; NITISS, 2009).

Os inibidores de Topoll são drogas citostáticas que são utilizadas na clínica há décadas (HANDE, 1998). De acordo com o mecanismo de ação, os inibidores de Topoll podem ser divididos em duas categorias principais: os inibidores catalíticos da Topoll, que atuam inibindo o ciclo catalítico da enzima; e os inibidores do tipo venenos (*poisons*), que agem através da estabilização dos complexos cliváveis Topoll-DNA. Na categoria dos venenos, podemos destacar duas classes, em que a primeira inclui os intercalantes de DNA, que além da formação dos complexos Topoll-DNA, também podem intercalar-se entre as bases do DNA, gerando lesões que podem levar a morte celular. Essa categoria inclui drogas citotóxicas de antibióticos como as antraciclinas, a doxorrubicina, epirubicina e mitoxantrona (BAILLY, 2000). A segunda categoria inclui substâncias que não atuam por mecanismos de intercalação, agindo principalmente pela formação dos complexos Topoll-DNA. Epidofilotoxinas, como o etoposido, e algumas isoflavonas, como a genisteína, pertencem a essa categoria (BARNES et al., 1995).

O DTDF mostrou ser um agente genotóxico e ser capaz de induzir a parada em G2/M nas linhagens MRC5 e HCT116 (Fig. 2, Capítulo 1). Para investigar a possibilidade de o DPDT ser um inibidor de Topoll do tipo veneno, decidiu-se realizar o experimento TARDIS, o qual é capaz de detectar formações de complexos Topoll-DNA.

3.1.1. Metodologia

O experimento TARDIS foi realizado como descrito por Willmore et al. com pequenas modificações (WILLMORE et al., 1998). Foram estabelecidas culturas de MRC5 e HCT116 em placas de 24 poços com $6,10^4$ células por poço. Após a aderência das células, as mesmas foram expostas a 5 e 10 μM de DPDT e 0,2 $\mu\text{g/mL}$ de mitoxantrona como controle positivo. No grupo controle negativo, as linhagens permaneceram com DMEM. Após a exposição, as células foram tripsinizadas e homogeneizadas em agarose *low melting point* 2 % e aplicadas em lâminas de microscopia pré-cobertas em agarose *low melting point* 0,5 %. As lâminas foram submetidas à solução de lise (SDS 1 %, tampão fosfato 80 mM pH 6,8, EDTA 10 mM) contendo inibidor de protease (Complete Mini EDTA-free, Roche) por 15 min a 20 °C. Após esta etapa, as lâminas podem ser conservadas e guardadas em PBS contendo 10 % de glicerol a - 20 °C. Após a solução de lise, as lâminas são imersas em solução de NaCl 1M contendo inibidor de protease, por 30 min a 20°C e lavadas três vezes por imersão (5 min cada imersão) em PBS. As lâminas foram expostas ao anticorpo primário anti-TopoII α (Sigma Aldrich), diluído em PBS contendo 0,1 % Tween 20 e 1 % de albumina sérica bovina, por 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida, e então lavadas três vezes em PBS contendo 0,1 % Tween 20 (PBST). As lâminas foram incubadas de maneira similar com o anticorpo secundário Alexa-Fluor 555 (Cell Signalling) e lavadas por duas vezes com PBST, seguidas de uma lavagem final em PBS contendo inibidor de protease por 30 min. Após isso, as lâminas foram finalizadas com aplicação de VECTASHIELD® (*Antifade Mounting Medium with DAPI for Fluorescence*) para coloração do DNA e fixação das lamínulas, que foram por fim seladas com esmalte.

O experimento foi realizado com culturas em duplicatas por grupo, sendo que cada cultura gerou uma lâmina. As imagens das fluorescências azul (relativa ao DAPI) e vermelha (relativa à TopoII) foram capturadas em microscópio de fluorescência Olympus DP71 (Olympus Corporation, Tokyo, Japão), sendo analisadas aproximadamente 50 células por tratamento. Para cálculo do percentual de células positivas, foram contadas as áreas apresentando a marcação da fluorescência vermelha e as áreas apresentando fluorescência azul, fazendo a relação entre as mesmas.

3.1.2. Resultados

Para avaliar se o DTDF pode estar agindo como inibidor de Topoll, foi realizado o experimento TARDIS em um tempo de exposição de 3 horas, como descrito. Para a linhagem HCT116, foi possível observar a formação de complexos Topoll-DNA no controle positivo, 0,2 µg/mL MXT, pela visualização em microscópio de fluorescência do fluoróforo Alexa-Fluor 555 e confirmadno a presença de núcleos pelo corante DAPI (Fig. 7). Para as exposições de 5 e 10 µM não foi observada a formação de complexos. Quantificado o percentual de células que apresentam formação dos complexos Topoll-DNA, foi possível observar complexos somente nos controles positivos. Os resultados indicam que, nessas doses e tempo de exposição, o DTDF não atua como inibidor do tipo veneno em células HCT116 (Fig. 9).

Para a linhagem MRC5, da mesma maneira, não foi possível observar a formação de complexos Topoll-DNA nas exposições de 5 e 10 µM de DTDF em 3 horas (Figura 8). A formação de complexos Topoll-DNA no controle positivo, 0,2 µg/mL MXT, e confirmação por DAPI, confirma o controle positivo em MRC5 (Fig. 8).

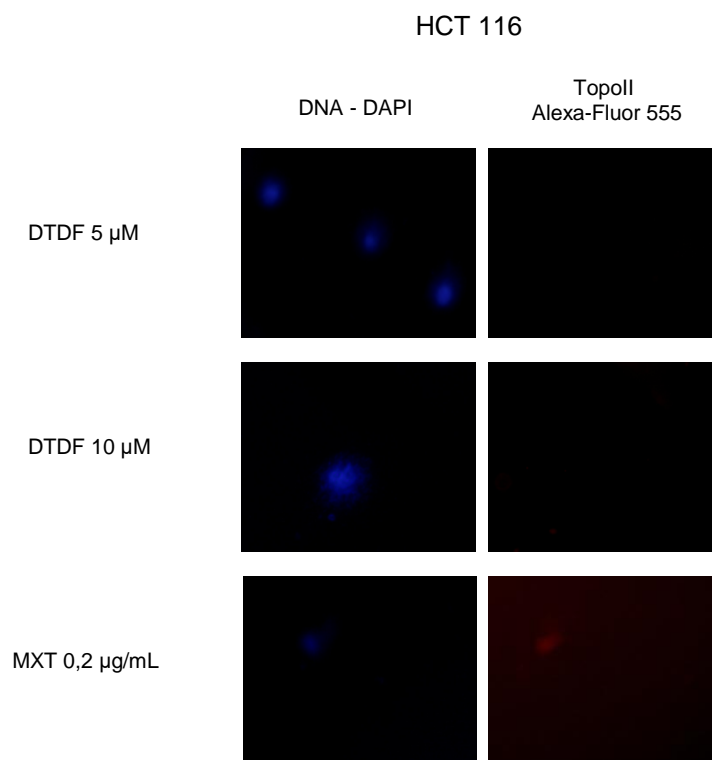


Figura 7 - Imagem demonstrativa do experimento TARDIS nas células HCT116. As células foram tratadas com os compostos por 3 horas e submetidas ao ensaio TARDIS. Imagem das fluorescências azul (correspondente ao DAPI – núcleo celular) e vermelha (correspondente à enzima topoisomerase II α – complexo TOPOII-DNA)

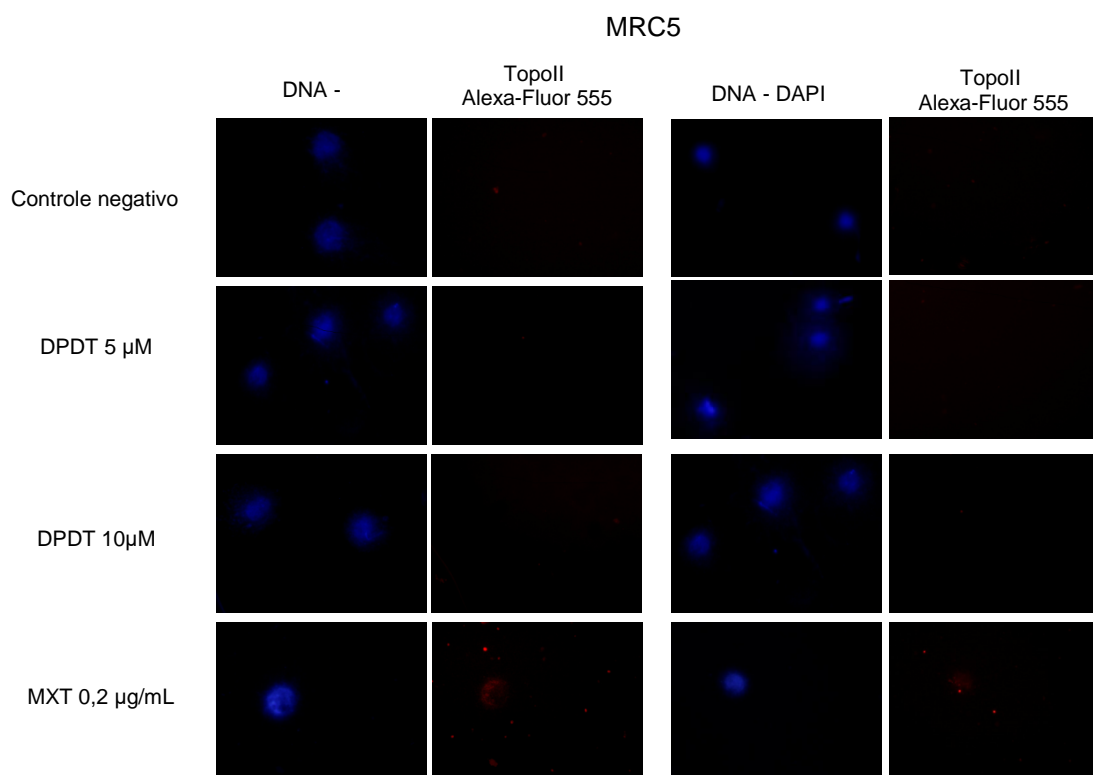


Figura 8 - Imagem demonstrativa do experimento TARDIS nas células MRC5. As células foram tratadas por 3 horas e submetidas ao ensaio TARDIS. Imagem das fluorescências azul (correspondente ao DAPI – núcleo celular) e vermelha (correspondente à enzima topoisomerase II α – complexo TOPOII-DNA)

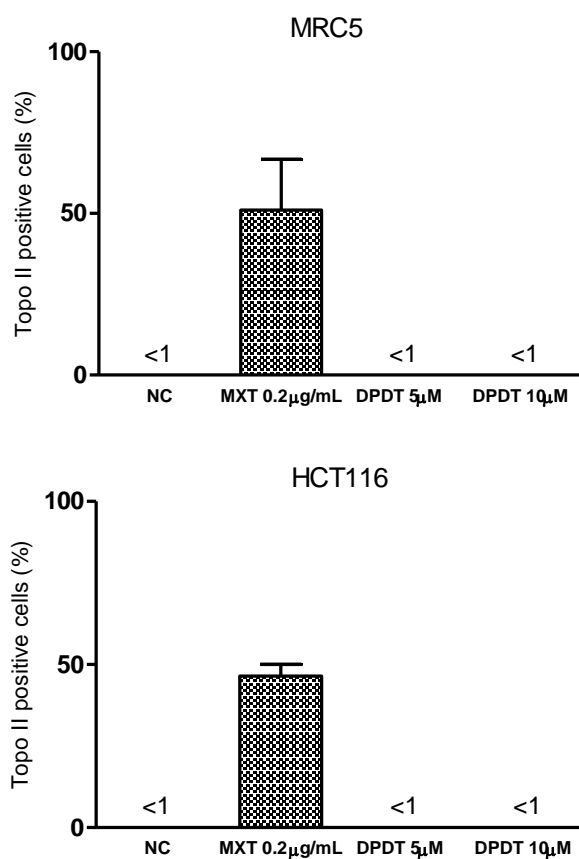


Figura 9 - Quantificação do percentual de células apresentando formação dos complexos TopoII-DNA em relação a quantidade de células observadas em cada tratamento. O composto DPDT não induz formação de complexos TopoII-DNA nas doses e tempo de tratamento utilizados. As células foram tratadas por 3 horas e submetidas ao ensaio TARDIS. Quantificação do percentual de células apresentando formação dos complexos TopoII-DNA em relação a quantidade de células observadas em cada tratamento.

4. Discussão

O câncer colorretal é a malignidade mais tratada no trato gastrointestinal em todo o mundo, e também uma das principais causas de morte relacionadas a câncer (JEMAL et al., 2011), contando mais de 600.000 mil mortes todo o ano (AHLQUIST et al., 2012). As opções de tratamento incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Na doença localizada, a cirurgia é o tratamento de preferência inicialmente. Dependendo do estágio da doença, para alguns pacientes é necessário o uso da quimioterapia adjuvante, que reduz o risco de morte em paciente com CCR, aumentando significativamente o tempo de vida dos pacientes (SARGENT et al., 2009). Ainda, o sucesso do tratamento do CCR é um desafio na pesquisa e, além da precaução com prognósticos e marcadores preditivos eficientes, existe a preocupação com a eficácia dos fármacos nos diferentes estágios de desenvolvimento do CCR (GOODWIN e ASMIS, 2009).

A alta reincidência de tumores e os efeitos colaterais de quimioterápicos reduz a eficácia de uma vasta variedade de agentes anticâncer que atualmente são utilizados na clínica. Assim, é notável a constante necessidade de estudar novas drogas como alternativa, ou mesmo para efeitos sinérgicos, com menores efeitos colaterais (ALI et al., 2012).

Linhagens celulares de cânceres humanos têm sido amplamente utilizadas na pesquisa e provaram ser uma ferramenta útil e robusta na abordagem genética do câncer, além de ser um excelente modelo de estudo para o entendimento da biologia e mecanismos moleculares do câncer (NIU e WANG, 2015). Não menos importante, a pesquisa *in vitro* utilizando linhagens humanas de câncer mostrou ser um valioso sistema teste para triagem de novas drogas com potenciais antineoplásicos, e para entendimentos de mecanismos de ação dessas novas moléculas (SOS et al., 2009; NIU e WANG, 2015).

Para muitos antineoplásicos, o alvo de ação inicial é a toxicidade genômica, geralmente por mecanismos que lesam DNA e/ou perturbam fenômenos básicos como replicação e transcrição (SCHWARTZ e KMIEC, 2007; SCHROTEROVA et al., 2009; STEVENSON et al., 2011). A indução de morte celular é um evento que é mediado por diversas reações, que podem conduzir a necrose, apoptose, catástrofe mitótica, entre outras (GARNER e RAJ, 2008). Após o estresse genotóxico, as vias de sinalização que percebem o dano reduzem a velocidade da progressão do ciclo

celular, no intuito de dar tempo para que ocorra a reparação (BARTEK e LUKAS, 2007).

Dentre as suas diversas aplicações, os compostos metálicos têm sido utilizados há décadas como agentes anticâncer e ainda são estudados com este propósito (LAINE e PASSIRANI, 2012; IBRAHIM et al., 2016). No meio das classes de compostos metálicos mais proeminentes estão os compostos de platina, como a cisplatina. Esses são eficientes contra câncer de ovário, testículo, pescoço e cabeça, além de serem utilizado no tratamento de CCR e de permanecerem em foco na pesquisa pré-clínica (KALUDEROVIC e PASCHKE, 2011; SOCIETY, 2016). Essas considerações têm estimulado um esforço considerável para a geração de novas drogas metálicas, incluindo novos compostos organometálicos (GASSER et al., 2011). Motivado pelo conhecimento das funções biológicas do selênio, possíveis ações quimiopreventivas e antitumorais, o composto de telúrio tem sido potencialmente utilizado contra diversas doenças, incluindo como atividade antitumoral. Estudos recentes já utilizaram compostos de telúrio como agente antitumoral em CCR, por indução de apoptose em células HCT116 (SREDNI, 2012; DU et al., 2014). Até o presente, dois compostos OT encontram-se em fase clínica de estudo, o AS101 e o *Octa-O-bis-(R,R)-tartarate ditellurane* (SAS) (SREDNI, 2012; LAYANI-BAZAR et al., 2014).

No Capítulo I, foi demonstrado que o DTDF diminui a viabilidade celular em células HCT116 e MRC5, com uma toxicidade mais pronunciada na linhagem de câncer. Para todas as linhagens utilizadas, o DTDF mostrou potentes efeitos citotóxicos, apresentando valores de IC_{50} na ordem de micromolar (Fig.1). Considerando que o DTDF apresenta acentuada citotoxicidade, em doses menores em linhagens de CCR, quando comparadas à MRC5, buscou-se investigar se esse composto causa lesões no DNA. Em outros estudos do nosso grupo com V79, o DTDF mostrou-se genotóxico em doses menores que os valores de IC_{50} observado nesse estudo (DEGRANDI et al., 2010; TRINDADE et al., 2015). Ainda no Capítulo 1, foi notável a resistência das linhagens HCT116 nulas para os genes p21, p53 e BAX inicialmente às exposições ao DTDF em 24 e 48 h. Esses resultados sugerem à participação das vias p21, p53 e BAX na resposta a toxicidade gerada pelo DTDF nessas linhagens.

Utilizando o ensaio cometa, demonstrou-se que o DTDF tem a capacidade de elevar os índices de dano em MRC5 e HCT116, tanto para 3 e 24 horas de exposição a este composto, sendo que em 24 horas as doses genotóxicas são a metade ou cinco vezes menores à 3 horas. Quando comparada a genotoxicidade entre linhagens, o DTDF apresentou maior índice em doses mais baixas para HCT116 (Fig. 2, Capítulo 1).

Em outro trabalho do nosso grupo, mostrou-se que o DTDF foi capaz de induzir parada no ciclo celular em fase S na linhagem V79 (JORGE et al., 2015). A inibição da proliferação celular por genotoxicidade pode estar associada a agentes que se intercalam no DNA ou que interferem em processos de replicação de maneira indireta (SWIFT e GOLSTEYN, 2014). De maneira interessante, observou-se uma diferença significativa de resposta citotóxica e genotóxica entre MRC5 e HCT116 (Fig. 1 e 2 Capítulo 1). Em 24, 48 e 72 horas de exposição, o DTDF levou à parada no ciclo celular em G2/M das células MRC5 e HCT116, mas não em 3 horas, com pequenas diferenças quando comparado entre linhagens e tempos de exposição (Fig. 3, Capítulo 1). Outro estudo conduzido por Sailer et al. (2003), também foi observado em linhagem HL-60 que o DTDF induz parada ciclo celular em G2/M. Esses resultados mostram que a toxicidade do DTDF, além dos seus efeitos genotóxicos, está consequentemente relacionada à parada no ciclo celular em G2/M para ambas as linhagens MRC5 e HCT116.

De forma complementar, buscou-se determinar se o DTDF tem a capacidade de interagir diretamente com o DNA em sua forma nativa. Demonstrou-se pelo ensaio de interação com DNA plasmidial, que o DTDF não foi capaz de induzir quebras simples ou duplas. Pelo ensaio de DC, as doses de DTDF não produziram nenhum tipo de modificações estruturais no DNA (Fig. 4 e 5, Capítulo 1). A genotoxicidade do DTDF em ambas as linhagens ocorre para doses que apresentam 50 % de viabilidade (IC_{50}), caracterizando esse composto como agente genotóxico, nas mesmas doses que levam à parada em G2/M. Tais efeitos biológicos não ocorrem por interação direta com DNA, mas sim por ação indireta como estresse oxidativo ou interferência em processos de replicação celular.

Comparativamente a outros trabalhos do nosso grupo, a faixa de concentrações do DTDF que apresenta citotoxicidade significativa são similares às utilizadas em V79. Outros efeitos biológicos, porém, como para do ciclo celular em fase S em V79, divergem desse estudo por serem em linhagens diferentes

(DEGRANDI et al., 2010; JORGE et al., 2015; TRINDADE et al., 2015). Com as linhagens MRC5 e HCT116 utilizadas nesse trabalho, foi possível observar efeitos biológicos similares a outros estudos conduzidos com compostos OTs. Outro composto organotelurado, o AS101, causa parada no ciclo celular em G2/M e apoptose em células de mielomas múltiplos, em que diversas vias moleculares podem estar envolvidas nesse processo (NAOR et al., 2013). Visto que o bloqueio na replicação causado pelo DTDF são induzidos por lesões no DNA, deve-se considerar que esse fenômeno geralmente vem acompanhado de ativação de proteínas de *checkpoints* que podem levar a parada no ciclo celular (HOEIJMAKERS, 2009). De maneira geral, a parada no ciclo celular é um efeito dos compostos genotóxicos utilizados como agentes antineoplásicos, assim como evidenciado nesse estudo. As respostas ao dano no DNA causadas por esses agentes podem ser diversas, como modificações no genoma que ocorrem em algumas células, como células de câncer proliferativas, propensas a instabilidade genômica (SWIFT e GOLSTEYN, 2014).

Recentemente, Jorge e colaboradores mostraram que o DTDF foi capaz de inibir a enzima Topol em DNA plasmidial e que linhagens de leveduras deficientes em Topol foram resistentes à exposição a este composto, o que poderia explicar os seus efeitos genotóxicos em células de mamíferos (JORGE *et al.*, 2015). Dentro deste cenário, o agente intercalante como o irinotecan, conhecido inibidor de Topol é utilizados no tratamento de CCR e geralmente são prescritos quando os pacientes não respondem adequadamente ao tratamento com 5-FU (HSIANG e LIU, 1988). Como a exposição ao DTDF induziu bloqueio de replicação em G2/M nas linhagens testadas, procurou-se nesse trabalho determinar uma possível ação inibitória de Topoll do tipo *poison*. Foi realizado o ensaio TARDIS em células MRC5 e HCT116 em 3 h de exposição ao DTDF, onde não foi possível detectar formações de complexos de DNA – Topoll (Dados Complementares, Figs. 7, 8 e 9). Nessas condições, foi possível determinar que inibição de Topoll não é a causa dos efeitos biológicos do DTDF nessas linhagens utilizadas, levando a corroborar novos possíveis mecanismos de ação.

Em outro estudo conduzido por Vij and Hardej, os quais utilizaram o DTDF como agente antiproliferativo em células HT-29, observou uma diminuição significativa na viabilidade celular pelo ensaio de MTT numa faixa de concentrações de 62,5 a 1000 μ M (VIJ e HARDEJ, 2012). Ainda que essa faixa de concentrações seja distinta das utilizadas no nosso estudo, é interessante observar que nesse

mesmo trabalho foi determinada a ativação de caspase 3/7 e caspase 9 induzida pela exposição ao DTDF, confirmando a ação antiproliferativa desse composto por apoptose. Ainda, os autores observaram um decréscimo na taxa de GSH/GSSG o que sugere que o telúrio reage com grupos tiol, particularmente GSH. Neste contexto, Schiar e colaboradores demonstraram uma relação entre hemólise induzida pelo DTDF e oxidação de GSH intracelular em eritrócitos e subsequente formação de espécies reativas de oxigênio (SCHIAR *et al.*, 2009). Resultados similares aos descritos anteriormente também foram demonstrados em células V79 e *Saccharomyces cerevisiae*. (DEGRANDI *et al.*, 2010; JORGE *et al.*, 2015). Ainda em células HT-29, outro estudo mostrou alterações em expressão de genes e proteínas antioxidantes, além de um aumento significativo de HO⁻ à exposição ao DTDF numa faixa de concentrações de 500 a 1000 µM, o que fortalece a hipótese de que a ação antiproliferativa e genotóxica do DTDF seja consequência do estresse oxidativo (VIJ e HARDEJ, 2016).

Complementar a possibilidade de o DTDF agir por estresse oxidativo, é importante considerar a participação dessa molécula em processos de resposta ao dano no DNA, principalmente na relação da ação genotóxica e parada no ciclo celular. Uma vez que mudanças no genoma ocorrem em algumas células, como células de câncer, uma das respostas ao dano no DNA, em alguns casos, é adaptação a genotoxicidade e células que tiveram parado no ciclo celular por sua vez entram em mitose (SWIFT e GOLSTEYN, 2014). Nesse cenário, inibidores de Topol e Topoll são utilizados como agentes anticâncer muitas vezes como tratamento complementar a outros agentes. Em tratamentos de CCR, o camptotecina que é um inibidor de Topol derivado de Irinotecan, por exemplo, é utilizado como adjuvante em situações metastáticas em combinação com 5-FU e LV, formando complexos DNA – Topol (POMMIER, 2006; GOODWIN e ASMIS, 2009). Todos os resultados desse estudo merecem devida atenção, desde que compostos anticâncer muitas vezes tendem falhar por mecanismos compensatórios das células (BRAUN e SEYMOUR, 2011).

Os resultados apresentados nesse trabalho evidenciam claramente que efeitos antiproliferativos do DTDF em linhagens MRC5, HCT116 e HT-29, sendo que as linhagens de CCR foram mais sensíveis ao DTDF. A citotoxicidade desse composto está diretamente relacionada a lesões no DNA, o que conseqüentemente causa a parada no ciclo celular em fase G2/M para MRC5 e HCT116. A parada no ciclo celular não se deve a interações diretas do DTDF com o DNA, e nem a sua

ação como inibidor de TopoII. A hipótese então permanece de inibição de TopoI pelo DTDF, causando interferência no processo replicativo das células, acúmulo de lesões no DNA e conseqüente parada no ciclo celular (Figura 10). Como já revisado na literatura, agentes que atuam por esse mecanismo de ação seguem o mesmo padrão de efeitos biológico aos encontrados nesse estudo (WU *et al.*, 2010; SWIFT e GOLSTEYN, 2014). Assim, a investigação mais aprofundada de mecanismos moleculares se faz necessário em estudos futuros com o DTDF.

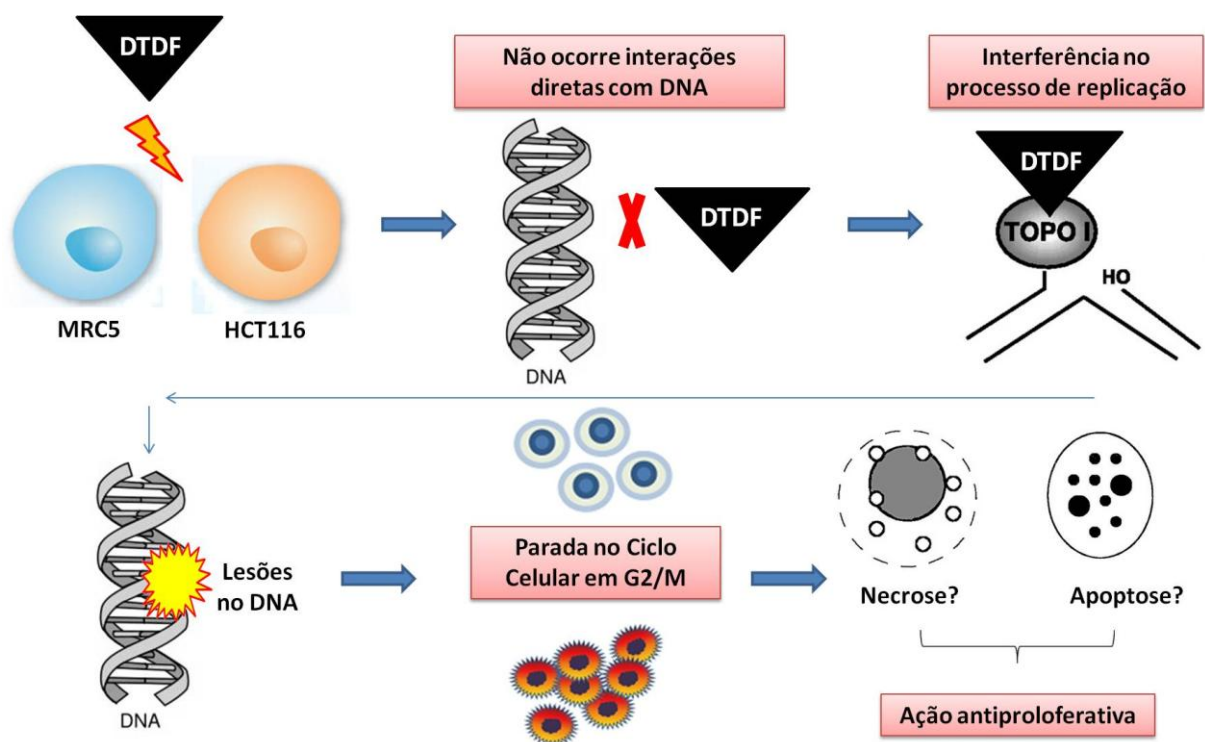


Figura 10 – Modelo proposto para o mecanismo de ação do DTDF em células MRC5 e HCT116. O DTDF interage com TopoI, interferindo no processo de replicação e causando acúmulo de lesões, parada no ciclo celular em G2/M e morte celular.

5. Conclusões

5.1. Conclusão Geral

Esse trabalho pela primeira vez reuniu dados de viabilidade celular, efeitos genotóxicos e perfil de ciclo celular comparando linhagens de fibroblasto humano e células de câncer colorretal *in vitro*. Foi evidenciado que o efeito antiproliferativo, genotóxico e de parada no ciclo celular induzido pelo DTDF não ocorreu por interação direta com o DNA. Ainda, os efeitos biológicos relatados nesse estudo possivelmente não estão relacionados à inibição do tipo “veneno” da enzima TopoII pela formação de complexo estável com o DTDF, conforme testado diretamente nas linhagem MRC5 e HCT116. Assim, a hipótese de inibição de enzima TopoI abre possibilidades de estudos futuros para investigações mais aprofundada de possíveis mecanismos de ação moleculares.

5.2. Conclusões específicas

1. O DTDF induziu citotoxicidade de forma seletiva, sendo tóxico para as células de CCR em concentrações menores quando comparadas às doses que diminuiriam a viabilidade em fibroblasto humano, *in vitro*;
2. Em doses que representam 50 % de viabilidade celular, o DTDF induziu genotoxicidade para ambas as linhagens testadas *in vitro* e foi evidente a maior sensibilidade das células de CCR quando comparadas à linhagem de fibroblasto humano;
3. O DTDF causou parada no ciclo celular em G2/M, iniciando em 24 h de exposição, para ambas as linhagens testadas;
4. O DTDF, em sua forma nativa, não foi capaz de interagir diretamente com DNA plasmidial, causando quebres ou modificações estruturais;
5. Nas condições testadas no experimento TARDIS, o DTDF não foi capaz de agir como inibir de TopoII do tipo veneno.

6. Perspectivas

6.1. Perspectiva

O conjunto de resultados apresentados nesse estudo leva a necessidade de continuar as investigações com essa molécula, aprofundando em possíveis mecanismos de ação na célula, novas abordagens antiproliferativas e tratamentos como agente adjuvante ou sinérgico.

6.2. Perspectivas Específicas

1. Investigar nessas linhagens celulares utilizadas a indução do estresse oxidativo pelo DTDF;
2. Avaliar ocorrência de apoptose/necrose à exposição das linhagens celulares ao DTDF nas mesmas condições apresentadas nesse estudo;
3. Investigar pelo método TARDIS um possível efeito inibidor de TopoI exercido pelo DTDF diretamente nas células;
4. Testar diferentes tempos e doses para a avaliação de inibição de TopoII pelo método TARDIS;
5. Utilizar o DTDF em terapia combinada com compostos já implementados no tratamento do câncer colorretal, *in vitro*;

Referências Bibliográficas

- Ahlquist, D. A., H. Zou, M. Domanico, D. W. Mahoney, T. C. Yab *et al.*, 2012 Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas. *Gastroenterology* 142: 248-256; quiz e225-246.
- Ahmed, D., P. W. Eide, I. A. Eilertsen, S. A. Danielsen, M. Eknaes *et al.*, 2013 Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2: e71.
- Ali, R., Z. Mirza, G. M. Ashraf, M. A. Kamal, S. A. Ansari *et al.*, 2012 New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. *Anticancer Res* 32: 2999-3005.
- Argiris, K., C. Panethymitaki e M. Tavassoli, 2011 Naturally occurring, tumor-specific, therapeutic proteins. *Exp Biol Med (Maywood)* 236: 524-536.
- Arrowsmith, J., 2011 Trial watch: phase III and submission failures: 2007-2010. *Nat Rev Drug Discov* 10: 87.
- Austin, C. A., J. H. Sng, S. Patel e L. M. Fisher, 1993 Novel HeLa topoisomerase II is the II beta isoform: complete coding sequence and homology with other type II topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* 1172: 283-291.
- Bailly, C., 2000 Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem* 7: 39-58.
- Bakkenist, C. J., eM. B. Kastan, 2003 DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499-506.
- Baldwin, E. L., eN. Osheroff, 2005 Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5: 363-372.
- Barnes, S., T. G. Peterson e L. Coward, 1995 Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer. *J Cell Biochem Suppl* 22: 181-187.
- Barretina, J., G. Caponigro, N. Stransky, K. Venkatesan, A. A. Margolin *et al.*, 2012 The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483: 603-607.
- Bartek, J., eJ. Lukas, 2007 DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 19: 238-245.
- Baskar, R., K. A. Lee, R. Yeo e K. W. Yeoh, 2012a Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci* 9: 193-199.
- Baskar, R., K. A. Lee, R. Yeo e K. W. Yeoh, 2012b Cancer and radiation therapy: current advances and future directions, pp. 193-199 in *Int J Med Sci*.
- Bhonde, M. R., M. L. Hanski, M. Notter, B. F. Gillissen, P. T. Daniel *et al.*, 2006 Equivalent effect of DNA damage-induced apoptotic cell death or long-term cell cycle arrest on colon carcinoma cell proliferation and tumour growth. *Oncogene* 25: 165-175.
- Borges, V. C., J. B. Rocha e C. W. Nogueira, 2005 Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. *Toxicology* 215: 191-197.
- Braun, M. S., eM. T. Seymour, 2011 Balancing the efficacy and toxicity of chemotherapy in colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol* 3: 43-52.
- Brozmanova, J., D. Manikova, V. Vlckova e M. Chovanec, 2010 Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch Toxicol* 84: 919-938.
- Bucher, N., eC. D. Britten, 2008 G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br J Cancer* 98: 523-528.
- Burden, D. A., eN. Osheroff, 1998 Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1400: 139-154.
- Castedo, M., J. L. Perfettini, T. Roumier, K. Andreau, R. Medema *et al.*, 2004 Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23: 2825-2837.

- Chasteen, T. G., D. E. Fuentes, J. C. Tantalean e C. C. Vasquez, 2009a Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol Rev* 33: 820-832.
- Chasteen, T. G., D. E. Fuentes, J. C. Tantalean e C. C. Vasquez, 2009b Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance, pp. 820-832 in *FEMS Microbiol Rev*.
- Chen, L., D. M. Gilkes, Y. Pan, W. S. Lane e J. Chen, 2005 ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *EMBO J* 24: 3411-3422.
- Chen, P., C. Luo, Y. Deng, K. Ryan, J. Register *et al.*, 2000 The 1.7 Å crystal structure of human cell cycle checkpoint kinase Chk1: implications for Chk1 regulation. *Cell* 100: 681-692.
- Chini, C. C., eJ. Chen, 2003 Human claspin is required for replication checkpoint control. *J Biol Chem* 278: 30057-30062.
- Ciccía, A., eS. J. Elledge, 2010 The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40: 179-204.
- Cliby, W. A., K. A. Lewis, K. K. Lilly e S. H. Kaufmann, 2002 S phase and G2 arrests induced by topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function. *J Biol Chem* 277: 1599-1606.
- Cortez, D., S. Guntuku, J. Qin e S. J. Elledge, 2001 ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294: 1713-1716.
- Cunha, R. L., I. E. Gouvea e L. Juliano, 2009 A glimpse on biological activities of tellurium compounds. *An Acad Bras Cienc* 81: 393-407.
- Cunha, R. L., M. E. Urano, J. R. Chagas, P. C. Almeida, C. Bincoletto *et al.*, 2005 Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium(IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 755-760.
- Curman, D., B. Cinel, D. E. Williams, N. Rundle, W. D. Block *et al.*, 2001 Inhibition of the G2 DNA damage checkpoint and of protein kinases Chk1 and Chk2 by the marine sponge alkaloid debromohymenialdisine. *J Biol Chem* 276: 17914-17919.
- Degrandi, T. H., I. M. de Oliveira, G. S. d'Almeida, C. R. Garcia, I. V. Villela *et al.*, 2010 Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 25: 257-269.
- Delacroix, S., J. M. Wagner, M. Kobayashi, K. Yamamoto e L. M. Karnitz, 2007 The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev* 21: 1472-1477.
- Du, P., N. E. Saidu, J. Intemann, C. Jacob e M. Montenarh, 2014 A new tellurium-containing amphiphilic molecule induces apoptosis in HCT116 colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1840: 1808-1816.
- Elrasheid A. H. Kheirelseid, N. M., Michael J. Kerin, 2013 Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. *American Journal of Molecular Biology*.
- Emi, M., J. Hihara, Y. Hamai, Y. Aoki, M. Okada *et al.*, 2012 Neoadjuvant chemoradiotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil for esophageal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 69: 1499-1505.
- Engel, L. W., eN. A. Young, 1978 Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Res* 38: 4327-4339.
- Fearon, E. R., eB. Vogelstein, 1990 A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
- Ferlay, J., E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. Coebergh *et al.*, 2013 Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49: 1374-1403.

- Fischer, W., 2001 A second note on the term "chalcogen". *Journal of Chemical Education* 78: 1333-1333.
- Frei, G. M., M. Kremer, K. M. Hanschmann, S. Krause, M. Albeck *et al.*, 2008 Antitumour effects in mycosis fungoides of the immunomodulatory, tellurium-based compound, AS101. *Br J Dermatol* 158: 578-586.
- Froelich-Ammon, S. J., eN. Osheroff, 1995 Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J Biol Chem* 270: 21429-21432.
- Galizia, G., E. Lieto, F. Ferraraccio, M. Orditura, F. De Vita *et al.*, 2004 Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clin Cancer Res* 10: 3490-3499.
- Garner, E., eK. Raj, 2008 Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. *Cell Cycle* 7: 277-282.
- Gasser, G., I. Ott e N. Metzler-Nolte, 2011 Organometallic anticancer compounds. *J Med Chem* 54: 3-25.
- Goodwin, R. A., eT. R. Asmis, 2009 Overview of systemic therapy for colorectal cancer. *Clin Colon Rectal Surg* 22: 251-256.
- Grivicich, I., D. R. Mans, G. J. Peters e G. Schwartzmann, 2001 Irinotecan and oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer. *Braz J Med Biol Res* 34: 1087-1103.
- Grivicich, I., A. Regner, A. B. da Rocha, L. B. Grass, P. A. Alves *et al.*, 2005a Irinotecan/5-fluorouracil combination induces alterations in mitochondrial membrane potential and caspases on colon cancer cell lines. *Oncol Res* 15: 385-392.
- Grivicich, I., A. Regner, A. B. da Rocha, G. B. Kayser, D. P. Schunemann *et al.*, 2005b The irinotecan/5-fluorouracil combination induces apoptosis and enhances manganese superoxide dismutase activity in HT-29 human colon carcinoma cells. *Chemotherapy* 51: 93-102.
- Groden, J., A. Thliveris, W. Samowitz, M. Carlson, L. Gelbert *et al.*, 1991 Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66: 589-600.
- Hande, K. R., 1998 Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1400: 173-184.
- Hartwell, L. H., eT. A. Weinert, 1989 Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634.
- Hassan, W., M. Ibrahim, C. W. Nogueira, A. L. Braga, A. M. Deobald *et al.*, 2009a Influence of pH on the reactivity of diphenyl ditelluride with thiols and anti-oxidant potential in rat brain. *Chem Biol Interact* 180: 47-53.
- Hassan, W., M. Ibrahim e J. B. Rocha, 2009b Towards the mechanism and comparative effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen under various pathophysiological conditions in rat's kidney preparation. *Chem Biol Interact* 182: 52-58.
- Hayun, M., Y. Naor, M. Weil, M. Albeck, A. Peled *et al.*, 2006 The immunomodulator AS101 induces growth arrest and apoptosis in multiple myeloma: association with the Akt/survivin pathway. *Biochem Pharmacol* 72: 1423-1431.
- Helleday, T., E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson e R. A. Sharma, 2008 DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 193-204.
- Hirose, Y., M. S. Berger e R. O. Pieper, 2001 Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 61: 5843-5849.
- Hodge, J. W., A. Ardiani, B. Farsaci, A. R. Kwilas e S. R. Gameiro, 2012 The tipping point for combination therapy: cancer vaccines with radiation, chemotherapy, or targeted small molecule inhibitors. *Semin Oncol* 39: 323-339.

- Hoeijmakers, J. H., 2009 DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361: 1475-1485.
- Hsiang, Y. H., R. Hertzberg, S. Hecht e L. F. Liu, 1985 Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 260: 14873-14878.
- Hsiang, Y. H., M. G. Lihou e L. F. Liu, 1989 Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res* 49: 5077-5082.
- Hsiang, Y. H., eL. F. Liu, 1988 Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res* 48: 1722-1726.
- Huang, L. C., K. C. Clarkin e G. M. Wahl, 1996 Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4827-4832.
- Huang, M., Z. H. Miao, H. Zhu, Y. J. Cai, W. Lu *et al.*, 2008 Chk1 and Chk2 are differentially involved in homologous recombination repair and cell cycle arrest in response to DNA double-strand breaks induced by camptothecins. *Mol Cancer Ther* 7: 1440-1449.
- Hurst, R., L. Hooper, T. Norat, R. Lau, D. Aune *et al.*, 2012 Selenium and prostate cancer: systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 96: 111-122.
- Ibrahim, M., R. Sabouni e G. A. Hussein, 2016 Anti-Cancer Drug Delivery Using Metal Organic Frameworks (MOFs). *Curr Med Chem*.
- INCA, 2016 Estimativa 2016.
- Ivanovich, J. L., T. E. Read, D. J. Ciske, I. J. Kodner e A. J. Whelan, 1999 A practical approach to familial and hereditary colorectal cancer. *Am J Med* 107: 68-77.
- Jazayeri, A., J. Falck, C. Lukas, J. Bartek, G. C. Smith *et al.*, 2006 ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8: 37-45.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward *et al.*, 2011 Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90.
- Jin, J., X. L. Ang, X. Ye, M. Livingstone e J. W. Harper, 2008 Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *J Biol Chem* 283: 19322-19328.
- Jorge, P. M., I. M. de Oliveira, E. C. Filippi Chiela, C. M. Viau, J. Saffi *et al.*, 2015 Diphenyl ditelluride-induced cell cycle arrest and apoptosis: a relation with topoisomerase I inhibition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 116: 273-280.
- Kalechman, Y., A. Shani, S. Dovrat, J. K. Whisnant, K. Mettinger *et al.*, 1996 The antitumoral effect of the immunomodulator AS101 and paclitaxel (Taxol) in a murine model of lung adenocarcinoma. *J Immunol* 156: 1101-1109.
- Kaluderovic, G. N., eR. Paschke, 2011 Anticancer metallotherapeutics in preclinical development. *Curr Med Chem* 18: 4738-4752.
- Kellner, U., M. Sehested, P. B. Jensen, F. Gieseler e P. Rudolph, 2002 Culprit and victim -- DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol* 3: 235-243.
- Kim, M. S., J. Lee e D. Sidransky, 2010 DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29: 181-206.
- Kinzler, K. W., M. C. Nilbert, B. Vogelstein, T. M. Bryan, D. B. Levy *et al.*, 1991 Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251: 1366-1370.
- Kumagai, A., J. Lee, H. Y. Yoo e W. G. Dunphy, 2006 TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 124: 943-955.
- Laine, A. L., eC. Passirani, 2012 Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery. *Curr Opin Pharmacol* 12: 420-426.

- Larner, A. J., 1995 How does garlic exert its hypocholesterolaemic action? The tellurium hypothesis. *Med Hypotheses* 44: 295-297.
- Layani-Bazar, A., I. Skornick, A. Berrebi, M. H. Pauker, E. Noy *et al.*, 2014 Redox modulation of adjacent thiols in VLA-4 by AS101 converts myeloid leukemia cells from a drug-resistant to drug-sensitive state. *Cancer Res* 74: 3092-3103.
- Lee, J. H., eT. T. Paull, 2005 ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308: 551-554.
- Lenz, H. J., 2007 Prognostic/Predictive molecular markers in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 1: S29-32.
- Letavayova, L., V. Vlckova e J. Brozmanova, 2006 Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology* 227: 1-14.
- Lin, W. M., A. C. Baker, R. Beroukhim, W. Winckler, W. Feng *et al.*, 2008 Modeling genomic diversity and tumor dependency in malignant melanoma. *Cancer Res* 68: 664-673.
- Liu, Q., S. Guntuku, X. S. Cui, S. Matsuoka, D. Cortez *et al.*, 2000 Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14: 1448-1459.
- Lukas, C., J. Falck, J. Bartkova, J. Bartek e J. Lukas, 2003 Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* 5: 255-260.
- Lukas, C., F. Melander, M. Stucki, J. Falck, S. Bekker-Jensen *et al.*, 2004 Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J* 23: 2674-2683.
- Manic, G., F. Obrist, A. Sistigu e I. Vitale, 2015 Trial Watch: Targeting ATM-CHK2 and ATR-CHK1 pathways for anticancer therapy. *Mol Cell Oncol* 2: e1012976.
- Mayr, L. M., eP. Fuerst, 2008 The future of high-throughput screening. *J Biomol Screen* 13: 443-448.
- McGuire, S., 2016 World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv Nutr* 7: 418-419.
- Michor, F., Y. Iwasa, C. Lengauer e M. A. Nowak, 2005 Dynamics of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol* 15: 484-493.
- Miorelli, S. T., R. M. Rosa, D. J. Moura, J. C. Rocha, L. A. Lobo *et al.*, 2008 Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. *Mutagenesis* 23: 93-99.
- Monsuez, J. J., 2012 Detection and prevention of cardiac complications of cancer chemotherapy. *Arch Cardiovasc Dis* 105: 593-604.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers *et al.*, 1997 Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275: 1787-1790.
- Nam, E. A., eD. Cortez, 2011 ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J* 436: 527-536.
- Naor, Y., M. Hayun, B. Sredni e J. Don, 2013 Multiple signal transduction pathways are involved in G2/M growth arrest and apoptosis induced by the immunomodulator AS101 in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 54: 160-166.
- Naziroglu, M., K. Yildiz, B. Tamturk, I. Erturan e M. Flores-Arce, 2012 Selenium and psoriasis. *Biol Trace Elem Res* 150: 3-9.
- Neve, R. M., K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F. L. Baehner *et al.*, 2006 A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10: 515-527.

- Nitiss, J. L., 2009 Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 9: 338-350.
- Niu, N., eL. Wang, 2015 In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics* 16: 273-285.
- Nogueira, C. W., eJ. B. Rocha, 2011 Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol* 85: 1313-1359.
- Nogueira, C. W., G. Zeni e J. B. Rocha, 2004 Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104: 6255-6285.
- Parkin, D. M., 2001 Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2: 533-543.
- Pommier, Y., 2006 Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 6: 789-802.
- Powell, S. M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T. M. Bryan, S. R. Hamilton *et al.*, 1992 APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359: 235-237.
- Rawson, J. B., eB. Bapat, 2012 Epigenetic biomarkers in colorectal cancer diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 12: 499-509.
- Rayman, M. P., 2012 Selenium and human health. *Lancet* 379: 1256-1268.
- Rees, K., L. Hartley, C. Day, N. Flowers, A. Clarke *et al.*, 2013 Selenium supplementation for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 1: CD009671.
- Rezanka, T., eK. Sigler, 2008 Biologically active compounds of semi-metals. *Phytochemistry* 69: 585-606.
- Rigobello, M. P., V. Gandin, A. Folda, A. K. Rundlof, A. P. Fernandes *et al.*, 2009 Treatment of human cancer cells with selenite or tellurite in combination with auranofin enhances cell death due to redox shift. *Free Radic Biol Med* 47: 710-721.
- Ring, A., Y. M. Kim e M. Kahn, 2014 Wnt/catenin signaling in adult stem cell physiology and disease. *Stem Cell Rev* 10: 512-525.
- Sailer, B. L., N. Liles, S. Dickerson e T. G. Chasteen, 2003 Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Arch Toxicol* 77: 30-36.
- Sailer, B. L., N. Liles, S. Dickerson, S. Sumners e T. G. Chasteen, 2004 Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicol In Vitro* 18: 475-482.
- Sargent, D., A. Sobrero, A. Grothey, M. J. O'Connell, M. Buyse *et al.*, 2009 Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *J Clin Oncol* 27: 872-877.
- Schiar, V. P., D. B. Dos Santos, M. W. Paixao, C. W. Nogueira, J. B. Rocha *et al.*, 2009 Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: a possible involvement of reactive oxygen species. *Chem Biol Interact* 177: 28-33.
- Schonn, I., J. Hennesen e D. C. Dartsch, 2010 Cellular responses to etoposide: cell death despite cell cycle arrest and repair of DNA damage. *Apoptosis* 15: 162-172.
- Schroterova, L., V. Kralova, A. Voracova, P. Haskova, E. Rudolf *et al.*, 2009 Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicol In Vitro* 23: 1406-1411.
- Schwartz, T. R., eE. B. Kmiec, 2007 Reduction of gene repair by selenomethionine with the use of single-stranded oligonucleotides. *BMC Mol Biol* 8: 7.
- Shao, R. G., C. X. Cao, T. Shimizu, P. M. O'Connor, K. W. Kohn *et al.*, 1997 Abrogation of an S-phase checkpoint and potentiation of camptothecin cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in human cancer cell lines, possibly influenced by p53 function. *Cancer Res* 57: 4029-4035.

- Shiloh, Y., eY. Ziv, 2013 The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 197-210.
- Siegel, R. L., K. D. Miller e A. Jemal, 2016 Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66: 7-30.
- Smith, J., L. M. Tho, N. Xu e D. A. Gillespie, 2010 The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 108: 73-112.
- Society, A. C., 2016 What's new in colorectal cancer research?
- Soriano-Garcia, M., 2004 Organoselenium compounds as potential therapeutic and chemopreventive agents: a review. *Curr Med Chem* 11: 1657-1669.
- Sos, M. L., K. Michel, T. Zander, J. Weiss, P. Frommolt *et al.*, 2009 Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J Clin Invest* 119: 1727-1740.
- Souza, A. C., E. C. Stangherlin, A. P. Ardais e C. W. Nogueira, 2010 Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride: neurotoxic effect in brain of young rats, in vitro. *Mol Cell Biochem* 340: 179-185.
- Sredni, B., 2012 Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. *Semin Cancer Biol* 22: 60-69.
- Stevenson, L., W. L. Allen, I. Proutski, G. Stewart, L. Johnston *et al.*, 2011 Calbindin 2 (CALB2) regulates 5-fluorouracil sensitivity in colorectal cancer by modulating the intrinsic apoptotic pathway. *PLoS One* 6: e20276.
- Swift, L. H., eR. M. Golsteyn, 2014 Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int J Mol Sci* 15: 3403-3431.
- Tansley, K., F. G. Spear e A. Glucksmann, 1937 The Effect of Gamma Rays on Cell Division in the Developing Rat Retina. *Br J Ophthalmol* 21: 273-298.
- Taylor, A., 1996 Biochemistry of tellurium. *Biol Trace Elem Res* 55: 231-239.
- Toczyski, D. P., D. J. Galgoczy e L. H. Hartwell, 1997 CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* 90: 1097-1106.
- Trindade, C., A. L. Juchem, N. R. de Albuquerque, I. M. de Oliveira, R. M. Rosa *et al.*, 2015 Antigenotoxic and antimutagenic effects of diphenyl ditelluride against several known mutagens in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutagenesis* 30: 799-809.
- Van Cutsem, E. J., J. Oliveira, V. V. Kataja e E. G. T. Force, 2005 ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 16 Suppl 1: i18-19.
- Vij, P., eD. Hardej, 2012 Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non-transformed human colon cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 34: 768-782.
- Vij, P., eD. Hardej, 2016 Alterations in antioxidant/oxidant gene expression and proteins following treatment of transformed and normal colon cells with tellurium compounds. *Environ Toxicol Pharmacol* 43: 216-224.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger *et al.*, 1988 Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532.
- Wagner, J. M., eL. M. Karnitz, 2009 Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival. *Mol Pharmacol* 76: 208-214.
- Wang, X., Y. Y. Kuang e X. T. Hu, 2014 Advances in epigenetic biomarker research in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 20: 4276-4287.
- Willmore, E., A. J. Frank, K. Padget, M. J. Tilby e C. A. Austin, 1998 Etoposide targets topoisomerase IIalpha and IIbeta in leukemic cells: isoform-specific cleavable complexes visualized and quantified in situ by a novel immunofluorescence technique. *Mol Pharmacol* 54: 78-85.

- Wilsker, D., eF. Bunz, 2007 Loss of ataxia telangiectasia mutated- and Rad3-related function potentiates the effects of chemotherapeutic drugs on cancer cell survival. *Mol Cancer Ther* 6: 1406-1413.
- Wu, N., X. W. Wu, K. Agama, Y. Pommier, J. Du *et al.*, 2010 A novel DNA topoisomerase I inhibitor with different mechanism from camptothecin induces G2/M phase cell cycle arrest to K562 cells. *Biochemistry* 49: 10131-10136.
- Xu, R., Y. Kalechman, M. Albeck, H. Kung e B. Sredni, 1996 Inhibition of B16 melanoma metastasis by the immunomodulator AS101. *Int J Oncol* 9: 319-325.
- Yoshioka, K., Y. Yoshioka e P. Hsieh, 2006 ATR kinase activation mediated by MutSalpha and MutLalpha in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. *Mol Cell* 22: 501-510.
- Yu, Q., J. H. Rose, H. Zhang e Y. Pommier, 2001 Antisense inhibition of Chk2/hCds1 expression attenuates DNA damage-induced S and G2 checkpoints and enhances apoptotic activity in HEK-293 cells. *FEBS Lett* 505: 7-12.
- Zavoral, M., S. Suchanek, F. Zavada, L. Dusek, J. Muzik *et al.*, 2009 Colorectal cancer screening in Europe. *World J Gastroenterol* 15: 5907-5915.
- Zeman, M. K., eK. A. Cimprich, 2014 Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 16: 2-9.
- Zhang, K., eH. Wang, 2015 [Cancer Genome Atlas Pan-cancer Analysis Project]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 18: 219-223.
- Zhao, H., eH. Piwnica-Worms, 2001 ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* 21: 4129-4139.
- Zhou, B. B., eS. J. Elledge, 2000 The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-439.
- Zhou, Y., F. G. Gwadry, W. C. Reinhold, L. D. Miller, L. H. Smith *et al.*, 2002 Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects. *Cancer Res* 62: 1688-1695.

Anexo I

Original Manuscript

Antigenotoxic and antimutagenic effects of diphenyl ditelluride against several known mutagens in Chinese hamster lung fibroblasts

Cristiano Trindade¹, André L. M. Juchem¹, Nathália R. M. de Albuquerque¹, Iuri M. de Oliveira¹, Renato M. Rosa¹, Temenouga N. Guecheva¹, Jenifer Saffi² and João A. P. Henriques^{1,3}

¹Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre - RS, Brazil, ²Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre – UFCSPA, Porto Alegre - RS, Brazil and ³Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul – UCS, Caxias do Sul - RS, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. 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. Tel: +55 51 33166069; Fax: +55 51 33167003; Email: pegas@cbiot.ufrgs.br

Received 29 September 2014; Revised 17 April 2015; Accepted 20 April 2015.

Abstract

The present study evaluates antigenotoxic and antimutagenic properties of diphenyl ditelluride (DPDT) against several known mutagens in Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells). DPDT was not cytotoxic and genotoxic at concentrations ranging from 0.01 to 0.1 μM . The pre-treatment for 2 h with this organotellurium compound at non-cytotoxic dose range (0.01, 0.05 and 0.1 μM) increased cell survival after challenge with hydrogen peroxide (H_2O_2), *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH), methylmethanesulphonate (MMS) or ultraviolet (UV)C radiation. In addition, the pre-treatment with DPDT decreased the DNA damage and Formamidopyrimidine DNA-glycosylase (Fpg)- and Endonuclease III (Endo III) sensitive sites induction by the studied genotoxic agents, as verified by comet assay and modified comet assay, respectively. The pre-treatment also reduced micronucleus frequency, revealing the protector effect of DPDT against MMS and UVC-induced mutagenesis. Our results demonstrate that DPDT-treated cells at concentration range of 0.01–0.1 μM do not change thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels and ROS generation. Moreover, DPDT pre-treatment at this concentration range decreases the ROS induction by H_2O_2 and *t*-BOOH treatment indicating antioxidant potential. On the other hand, concentrations higher than 0.1 μM increase TBARS formation and inhibited superoxide dismutase (SOD) activity, suggesting pro-oxidative effect of this compound at high concentrations. Our results suggest that DPDT presents antigenotoxic and antimutagenic properties at concentration range of 0.01–0.1 μM . The protection effect could be attributed to antioxidant capacity of DPDT at this concentration range in V79 cells.

Introduction

In the fields of chemistry and biochemistry, it has been shown that organotellurium (OT) compounds could induce a variety of toxic effects that depend on the dose employed. (1, 2) On the other hand,

these compounds have been pointed out as promising and useful alternatives for pharmaceutical industry. (2, 3) OT compounds that inhibit thioredoxin reductase (TrxR) could be useful as antitumor agents with effects including induction of oxidative stress, cell cycle arrest and apoptosis. (4) Consequently, it is essential to increase the

knowledge about pharmacological properties of OT compounds, particularly in view of their toxic potential or antioxidant and antigenotoxic activities. (5)

OT compounds can exhibit potent antioxidant activity mediated by their glutathione peroxidase (GPx) mimetic properties (6, 7) and/or by their ability to scavenge reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in mammalian models. (8) Moreover, OT compounds revealed anti-inflammatory, immunomodulatory, anticancer, hepato- and neuroprotective properties. (9–11)

The diphenyl ditelluride (DPDT) is a solid, simple and stable OT compound. It is an important and versatile intermediate in organic synthesis. The DPDT in high doses is extremely toxic in rodents, causing neurotoxic effects in mice after acute or prolonged exposure and neurodegenerations in rats. (12–14) Also, previous studies of our laboratory showed cytotoxic, genotoxic and mutagenic properties of DPDT in mammalian V79 cells and in strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae* both proficient and deficient in several DNA repair pathways. (3) Moreover, DPDT has been shown to inhibit TrxR and GPx in adult mice. (15)

On the other hand, Rossato (7) reported an antioxidant action of DPDT by reducing the level of lipid peroxidation induced by some oxidants in rat brain. Indeed, Brito *et al.* (16) showed that DPDT afforded protection in adult mice against 4-aminopyridine-induced neurotoxicity and oxidative stress. Moreover, it has been reported that DPDT at low concentrations (1–4 μM) significantly increased Na^+/K^+ -ATPase activity in rat brain, suggesting that DPDT could be an antioxidant agent. (13)

The aim of this study was to establish the concentration range of DPDT with possible protective, antigenotoxic and antimutagenic effects in V79 cells. For this purpose we evaluated cell survival and DNA damage induction in comet assay and cytokinesis block micronucleus test. Oxidative stress parameters and activity of antioxidant enzymes following low concentration DPDT treatment are also determined.

Materials and methods

Chemicals

DPDT (CAS registry number 32294-60-3) was provided by Dr Antônio Braga, Federal University of Santa Catarina, Brazil. The analysis of ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed that DPDT analytical and spectroscopic data fully agreed with their assigned structure. The chemical purity of DPDT (99.9%) was determined by gas chromatography/high-performance liquid chromatography. Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, l-glutamine and antibiotics were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA); cytochalasin-B (Cyt-B), methylmethanesulfonate (MMS), hydrogen peroxide (H_2O_2), thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA) and hydrolysed 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Low-melting point agarose and normal agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Formamidopyrimidine DNA-glycosylase (Fpg) and Endonuclease III (Endo III) were obtained from New England BioLabs (Beverly, MA, USA). Giemsa stain was from Merck (Darmstadt, Germany) and 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) from Invitrogen (PoortGebouw, The Netherlands). All other reagents were of analytical grade. The tissue culture flasks (bottles and dishes) were supplied by TPP (Trasadingen, Switzerland).

Cell culture and treatments

V79 cells were grown as monolayers 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 maintained in tissue culture flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide, and were harvested by treatment with 0.15% trypsin-0.08% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS) solution. Cells were seeded in complete medium and grown to 80–90% confluence prior to the treatment with the test substance. DPDT was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to FBS-free medium to reach the different desired concentrations. The final DMSO concentration in the medium never exceeded 0.2%, and the control group was exposed to an equivalent concentration of solvent. Cells were treated with DPDT for 2 h, at concentrations from 0.01 to 1 μM , in DMEM culture without serum, then washed with PBS at pH 7.4 and submitted to the mutagen treatment.

For oxidative challenge, cells were exposed to 150 μM H_2O_2 or to 200 μM *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) for 2 h in the dark at 37°C. For the MMS exposure, cells were incubated with 40 μM MMS for 2 h in the dark at 37°C. For the ultraviolet (UV)C exposure, medium was removed after incubation, and the monolayer was rinsed with PBS at pH 7.4. Each dish received PBS at pH 7.4, and cells were exposed to a dose of UV light (254 nm) at a rate of 0.3 $\text{J}/\text{m}^2/\text{s}$ at room temperature. UVC dosimetry was performed in air with Blak-Ray Ultraviolet Meter (Upland, CA, USA) and the irradiation dose was 5 J/m^2 . Prior to exposure, lids of the dishes were removed, and the covering solution aspirated from the dishes.

Cytotoxicity evaluation using a lactate dehydrogenase leakage assay

V79 cells (1×10^4 cells/well) in logarithmic growth phase were seeded in 96-well plates. After treatment, the fraction of total lactate dehydrogenase (LDH) activity in the supernatant was taken as an indicator of membrane leakage or cell lysis. CytoTox assay kit (Promega, Madison, WI, USA) was used for enzymatic assessment of LDH release, following the manufacturer's instructions. This method involves assessing the rate of conversion of NADH (1.5 mmol/l) to NAD^+ 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 containing 1% Triton X-100. The percentage of LDH leakage was calculated as follows: % LDH leakage = $S \div (S + C) \times 100$, where S corresponds to the LDH activity measured in the supernatants and C to the LDH activity measured in the remaining cells of each sample after lysis.

Colony-forming ability (clonal survival)

Exponentially growing V79 cells were treated according to the experimental protocol of Mirabelli *et al.* (17) After treatment, cells were trypsinised, and 200 cells per 60-mm dish were seeded in triplicate to determine colony-forming ability. After 5–7 days incubation, colonies were fixed with ethanol, stained with crystal violet (0.1%), counted, and their survival was calculated as a percentage relative to the control treatment.

Comet assay

The alkaline comet assay was performed as described (3) with minor modifications. V79 cells were pre-treated at low concentrations of DPDT and exposed to mutagens. After treatment, cells were washed with ice-cold PBS, trypsinised and resuspended in complete medium. Then, 15 μl of cell suspension were mixed with low-melting point

agarose, and immediately spread onto a glass microscope slide pre-coated with a layer of 1.5% normal melting point agarose. Agarose was allowed to set at 4°C for 5 min. Slides were incubated in ice-cold lysis solution at 4°C for at least 1 h to remove cell proteins, leaving DNA as 'nucleoids'. The alkaline comet assay was performed at pH 13. In the modified comet assay, slides were removed from the lysis solution, washed three times in enzyme buffer and incubated with 60 µl of Fpg (45 min 37°C) or Endo III (30 min 37°C) solutions. After lysis, slides were placed on a horizontal electrophoresis unit, covered with fresh buffer for 15 min at 4°C to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was performed for 20 min at 25 V and 300 mA (0.90 V/cm). Slides were then neutralised (4 mM Tris, pH 7.5), washed in bi-distilled water and stained using a silver nitrate. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected, and analysed for each concentration of the test substance. Cells were visually scored according to tail length into five classes: (i) class 0: undamaged, without tail; (ii) class 1: with a tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (iii) class 2: with a tail length 1–2 × the diameter of the head; (iv) class 3: with a tail longer than 2 × the diameter of the head and (v) class 4: comets with no heads. A value damage index (DI) was assigned to each sample. DI ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells × 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells × 4). The formation of Fpg- and Endo III sensitive sites was calculated as a difference between the score obtained after incubation with the respective enzyme and with the enzyme buffer only.

Micronucleus test

The micronucleus assay in binucleated cells was performed according to Thomas and Fenech, (18) with minor modifications. V79 cells were incubated with various DPDT concentrations for 2 h in FBS-free medium. Cultures were then washed twice with medium, and Cyt-B was added to a final concentration of 3 µg/ml. As positive controls, the classical mutagenic agents MMS and UVC were used. Cultures were harvested 21 h after Cyt-B addition. Cells were separated from the bottle by trypsinisation, and the cell suspension was centrifuged at 1000 × g for 5 min. Cells were resuspended in 75 mM KCl, and maintained at 4°C for 3 min (mild hypotonic treatment). They were then centrifuged, and a methanol/acetic acid (3:1) solution was slowly added. This fixation step was repeated twice, and the cells were finally resuspended in a small volume of methanol/acetic acid, dropped on clean slides, and stained with 3% Giemsa (pH 6.8) for 5 min. Slides were mounted, and codified prior to microscopic analysis. Micronuclei were counted in 2000 binucleated cells (BNC) with well-preserved cytoplasm. Nuclear division index (NDI) was also calculated employing the formula, $NDI = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$

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

Determination of ROS levels

The levels of intracellular ROS were determined by DCFH-DA. DCFH-DA enters the cells and predominantly reacts with highly oxidising ROS to produce the fluorophore dichlorofluorescein (DCF). (19) Briefly, 5×10^4 cells/well were plated in 24-well culture plates, grown overnight, pre-treated with DPDT for 2 h and submitted to mutagen treatment. For oxidative challenge, cells were exposed to 500 µM H₂O₂ or 400 µM *t*-BOOH for 2 h in the dark at 37°C. After that, the cells were washed twice with PBS and incubated with 10 µM DCFH-DA in PBS at 37°C for 30 min, protected from light. After incubation, cells were washed with PBS, harvested with

trypsin/EDTA and for quantification of ROS, the fluorescence intensity was measured using a Guava easyCyte Plus Flow Cytometry (Guava Technologies, Hayward, CA, USA). Ten thousand cells were measured for each experimental condition. Relative ROS production was expressed as the change in fluorescence of the test samples compared with that of the appropriate controls (100%).

Superoxide dismutase

Superoxide dismutase (SOD) activity was spectrophotometrically determined according to the method described by Bannister and Calabrese. (20) The V79 cells (1×10^6 cells/well) were plated in 6-well culture plates, grown overnight and treated with DPDT for 2 h, washed three times with phosphate buffer, scraped and centrifuged at 3000 × g for 10 min, and the supernatant was collected. The SOD was measuring by the inhibition of self-catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm in a reaction medium containing 1 mmol/l adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol/l glycine (pH 10.2). This reaction was performed at 30°C for 3 min and was expressed as U SOD/mg protein; protein was measured by Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo, Rockford, IL, USA).

Catalase

The catalase (CAT) activity was determined according to the method described by Aebi (21) in cell extracts obtained as follows. V79 cells (1×10^6 cells/well) were plated in 6-well culture plates, grown overnight and treated with DPDT for 2 h. Cells were washed three times with 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). The resulting suspension was centrifuged at 3000 × g for 10 min, and the supernatant was incubated with phosphate buffer containing H₂O₂ 3 mM. CAT activity was determined by measuring the decrease in absorbance (H₂O₂ degradation) at 240 nm for 3 min and expressed as U CAT/mg protein. One unit of catalase activity was defined as 1 µM of H₂O₂ consumed/min; protein was measured by Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo).

Measurement of lipid peroxidation

The extent of DPDT-induced lipid peroxidation was determined by the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction. The assays were performed according to Salgo and Pryor (22), with minor modifications. V79 cells (1×10^7 cells) were seeded in 25 cm² flask. After the treatments, the cells were washed with cold PBS, scraped and homogenised in ice-cold PBS. Samples containing 400 µl of the cell lysates were combined with 600 µl of 15% TCA and 0.67% TBA. The mixture was heated at 100°C for 25 min. After cooling to room temperature, the samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 min, the supernatant fraction was isolated and the absorbance was measured at 532 nm. Hydrolysed TMP was used as a standard and results are expressed as malondialdehyde equivalents.

Statistical analysis

The data were obtained from at least three independent experiments in duplicate, and the results are expressed as mean ± SD. Data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by test of Tukey with *P* < 0.05 considered as statistically significant.

Results

DPDT range finder study

In order to choose DPDT concentrations for the study, LDH leakage assay and clonal survival were employed. DPDT treatment at concentration range of 0.01–0.5 µM was not cytotoxic, while a concentration of 1 µM DPDT significantly increased LDH leakage (to 19% of

total, $P < 0.001$) in relation to the control (8% of total, Figure 1A) and decreased clonal survival to 15% (Figure 2A). In addition, the treatment with DPDT at non-cytotoxic concentrations (0.01–0.5 μM) was unable to induce DNA strand breaks as shown by the alkaline comet assay (Figures 3A and 4A). Therefore, we decided to use concentration range of 0.01–1.0 μM DPDT in all subsequent experiments.

Protective effect of DPDT in V79 cells

The ability of non-toxic concentrations of DPDT to reduce the H_2O_2 toxicity was measured in the LDH leakage assay and by clonal survival. Figure 1B shows that the cytotoxicity of 150 μM

H_2O_2 treatment (74% of total LDH) was significantly suppressed by DPDT pre-treatment at concentrations 0.01 (58% of total, $P < 0.05$), 0.05 (51% of total, $P < 0.01$) and 0.1 μM (39% of total, $P < 0.001$). As can be seen in Figure 2B, the exposure at 150 μM H_2O_2 decreased the clonal survival to 47% ($P < 0.001$) when compared to the negative control. However, when cells were pre-treated with DPDT prior exposure to H_2O_2 , the clonal survival was significantly higher compared to cells only exposed to mutagens at DPDT concentrations of 0.01 (70%, $P < 0.05$), 0.05 (84%, $P < 0.001$) and 0.1 μM (80%, $P < 0.001$), showing protective effect against toxicity generated by H_2O_2 .

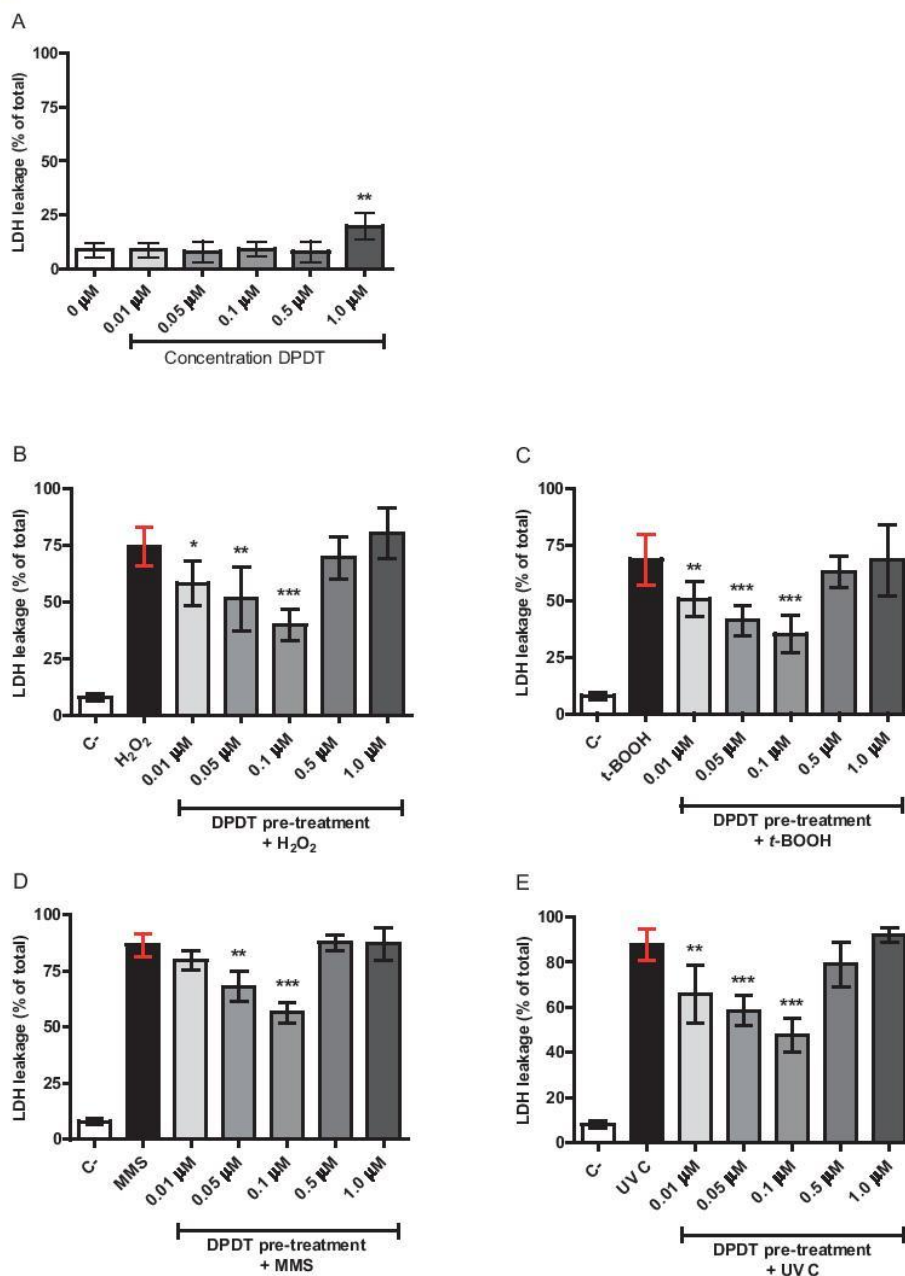


Figure 1. Effects of DPDT on extracellular LDH leakage in V79 cells. (A) DPDT treatment was compared with the negative control. (B–E) DPDT pre-treated cells were compared to cells only exposed to mutagens. Results are expressed as mean \pm SD ($n = 6$). Data significantly different in relation to the control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ /one-way ANOVA Tukey's multiple comparison test.

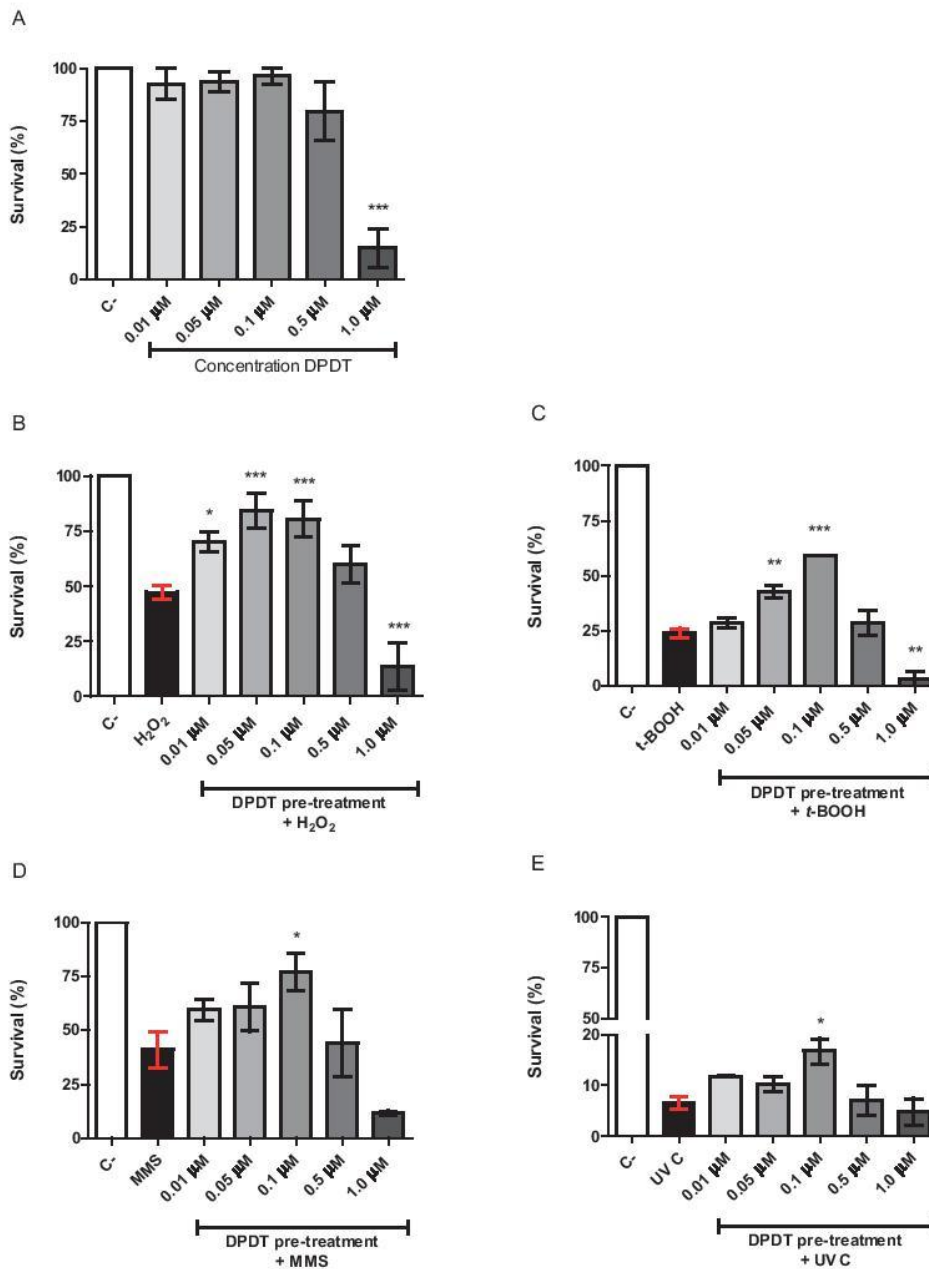


Figure 2. Clonogenic survival in V79 cells. (A) DPDT treatment was compared to the negative control. (B–E) DPDT pre-treated cells were compared to cells only exposed to mutagens. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$. Data significantly different in relation to the control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ /one-way ANOVA Tukey's multiple comparison test.

The DPDT pre-treatment also decreased the leakage of LDH in V79 cells after 200 μ M *t*-BOOH oxidative challenge (68% of total, Figure 1C), to 50% at concentration of 0.001 μ M ($P < 0.05$), to 41% at 0.05 μ M ($P < 0.001$) and to 35% at 0.1 μ M ($P < 0.001$), indicating an increase of cell viability in a concentration-dependent manner. Figure 2C shows that the pre-treatment at concentrations of 0.05 (42% survival, $P < 0.05$) and 0.1 μ M (59% survival, $P < 0.001$), DPDT prevented the cell death and increased the clonal survival about two times in comparison with cells exposed to 200 μ M *t*-BOOH alone (23% survival, $P < 0.001$). As can be seen in Figure 1D, the pre-treatment with DPDT at concentrations 0.05 (68% of total LDH leakage, $P < 0.05$) and 0.1 μ M (56% of

total LDH leakage, $P < 0.001$) decreased the cytotoxicity induced by MMS (86% of total). Figure 2D shows that MMS decreased the clonal survival to 41% when compared to the negative control; however, the pre-treatment with DPDT at concentration of 0.1 μ M (76% survival, $P < 0.05$) decreased the toxicity generated by 40 μ M MMS. It can be seen in Figure 1E that the exposure to 5 J/m² UVC was highly cytotoxic, as measured in LDH leakage assay (87% of total LDH leakage, $P < 0.001$), when compared to the negative control (8% of total); however, pre-treatment with DPDT at doses 0.01 (65% of total LDH, $P < 0.05$), 0.05 (58% of total LDH, $P < 0.001$) and 0.1 μ M (47% of total LDH, $P < 0.001$) decreased cytotoxicity induced by UVC (Figure 1E). The exposure

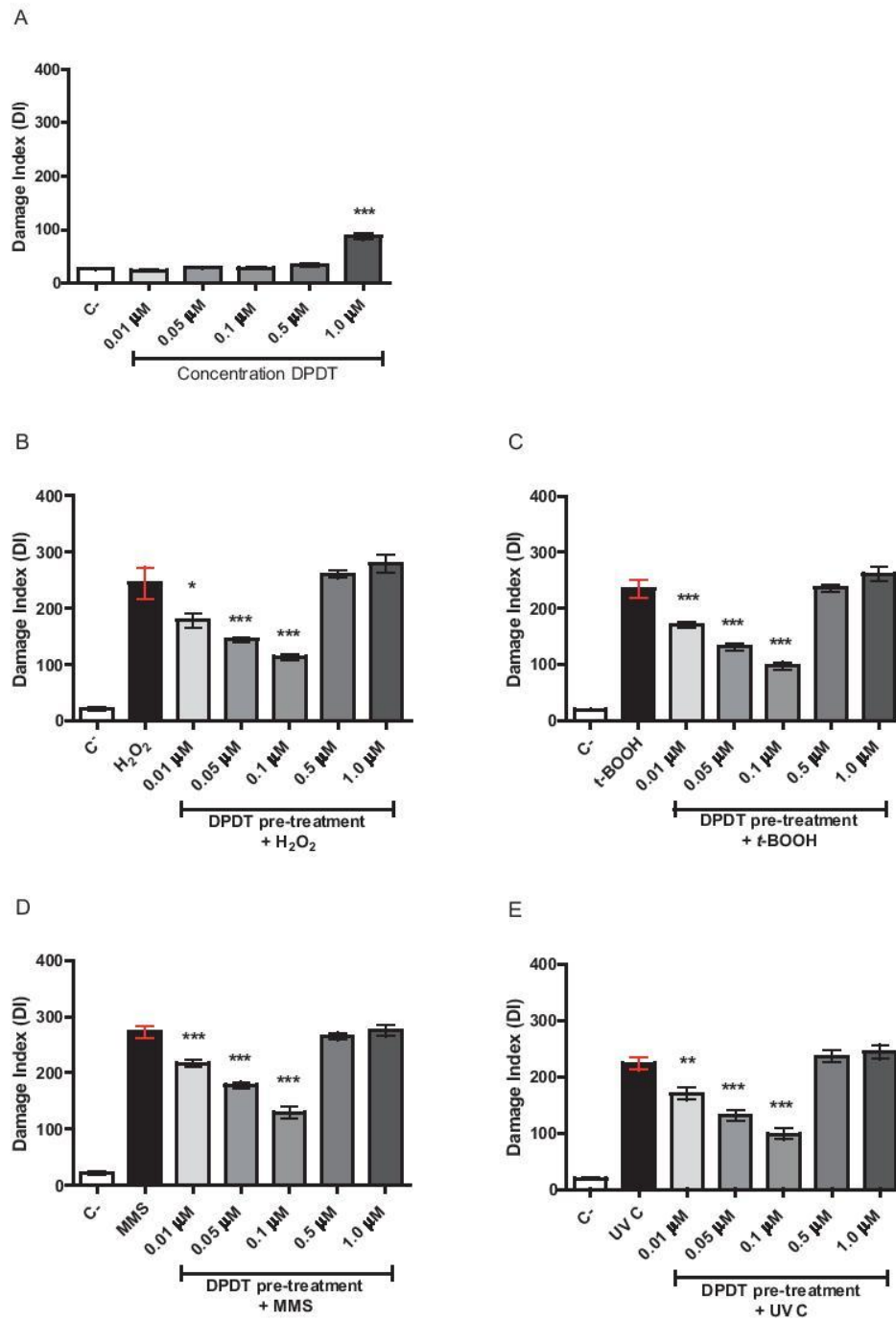


Figure 3. Antigenotoxic evaluation in V79 cells by comet assay. (A) DPDT treatment was compared to the negative control. (B–E) DPDT pre-treated cells were compared to cells only exposed to mutagens. Solvent was used as a negative control. Data are expressed as means \pm SD, $n=6$. Data significantly different in relation to the control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ /one-way ANOVA/Tukey's multiple comparison test.

of cells to UVC leads to significant decrease in clonal survival (7% survival, $P < 0.001$); however, pre-treatment with DPDT at concentration 0.1 μ M (16% survival, $P < 0.05$) increases clonal survival (Figure 2E).

Antigenotoxic effects of DPDT

In order to verify possible antigenotoxic effect, we tested DPDT action against the oxidative agents H₂O₂ or *t*-BOOH (Figure 3B and C, respectively). When the cells were pre-treated with DPDT

at concentrations of 0.01, 0.05 and 0.1 μ M prior exposure to the genotoxic agents, the DNA strand breaks and Fpg- and Endo III sensitive sites were significantly reduced, as verified in traditional ($P < 0.05$) (Figure 3B and C) and modified Comet assay ($P < 0.05$) (Figure 4B and C). DPDT pre-treatment afforded best protection against the MMS and UVC genotoxicity at concentration of 0.1 μ M ($P < 0.001$), reducing DI ($P < 0.001$) (Figure 3D and E) and Fpg- and Endo III sensitive sites ($P < 0.05$) (Figure 4D and E) induced by MMS or UVC, respectively.

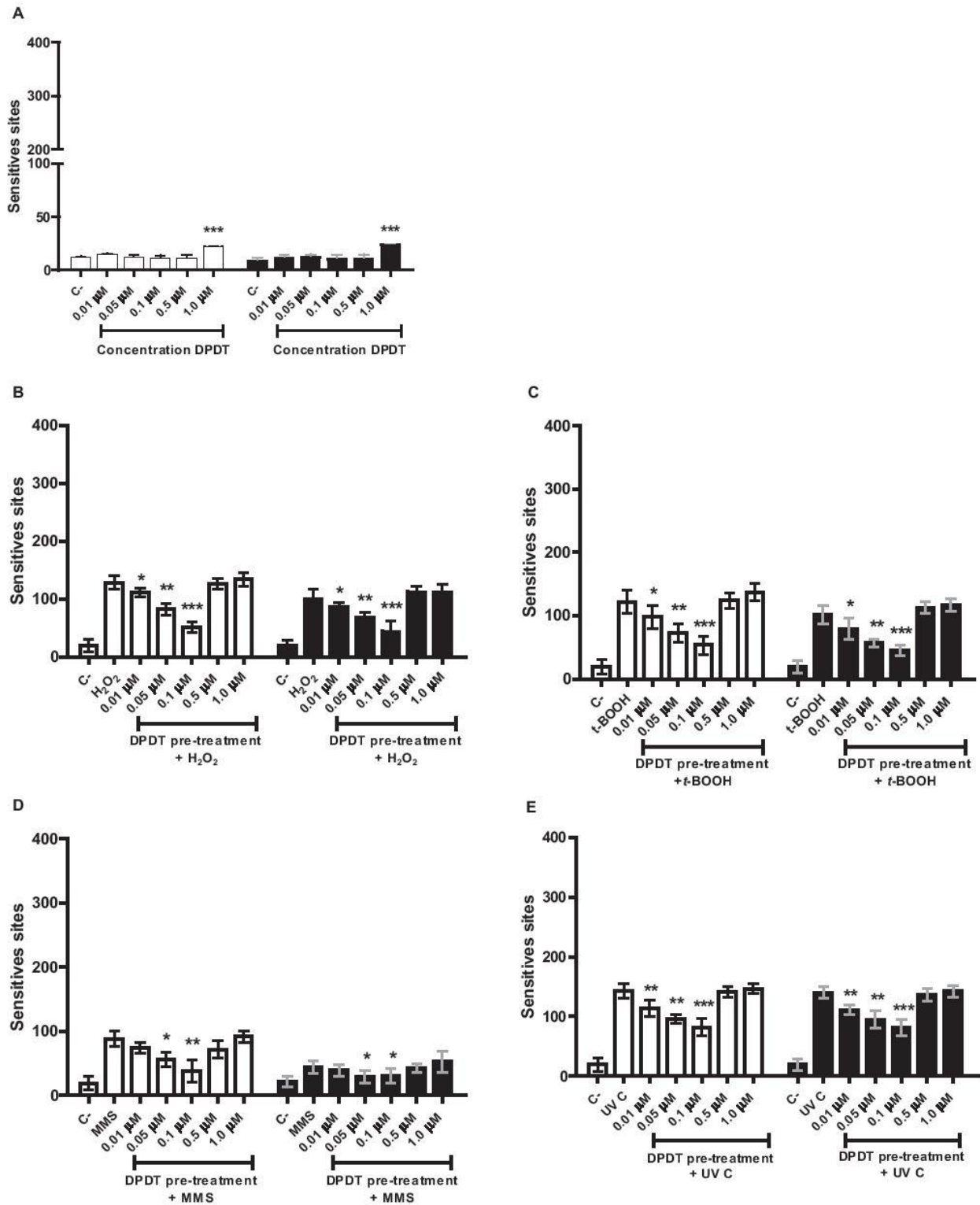


Figure 4. DPDT pre-treatments were compared to cells only exposed to mutagen as evaluated by a modified comet assay using Fpg (clear bars) and Endo III (black bars) enzymes. The Fpg- and Endo III sensitive sites were calculated as a difference between the score obtained after incubation with the respective enzyme and with the enzyme buffer only. (A) DPDT treatment was compared with the negative control. (B–E) DPDT pre-treated cells were compared to cells only exposed to mutagens. Solvent was used as a negative control. Data are expressed as means \pm SD, $n = 5$. Data significantly different in relation to the control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ /one-way ANOVA Tukey's multiple comparison test.

Antimutagenic properties of DPDT

As can be seen in Figure 5A, the DPDT did not induce micronuclei at concentration range of 0.01 to 0.1 μM . The concentrations 0.5 (12.6 ± 3.5 MN, $P < 0.001$) and 1 μM (18.6 ± 1.5 MN, $P < 0.001$) of DPDT increased the micronucleus frequency three and four times, respectively, when compared to the negative control (4.3 ± 0.5 MN) (Figure 5A). Therefore, for the evaluation of the antimutagenic effects, concentrations of 0.01, 0.05 and

0.1 μM DPDT were used. Figure 5B and C shows that MMS (13.5 ± 0.6 MN, $P < 0.001$) and UVC (18.1 ± 2.1 MN, $P < 0.001$) induced micronucleus formation and decrease cell proliferation (59%, $P < 0.001$ and 58%, $P < 0.05$, respectively) (Figure 5D and E). However, the pre-treatment with DPDT decreased micronucleus frequency for MMS and UVC at concentrations of 0.01 (4.0 ± 0.8 MN, $P < 0.01$ and 6.1 ± 1.0 MN, $P < 0.001$), 0.05 (4.0 ± 0.7 MN, $P < 0.01$ and 5.3 ± 0.7 MN, $P < 0.001$) and

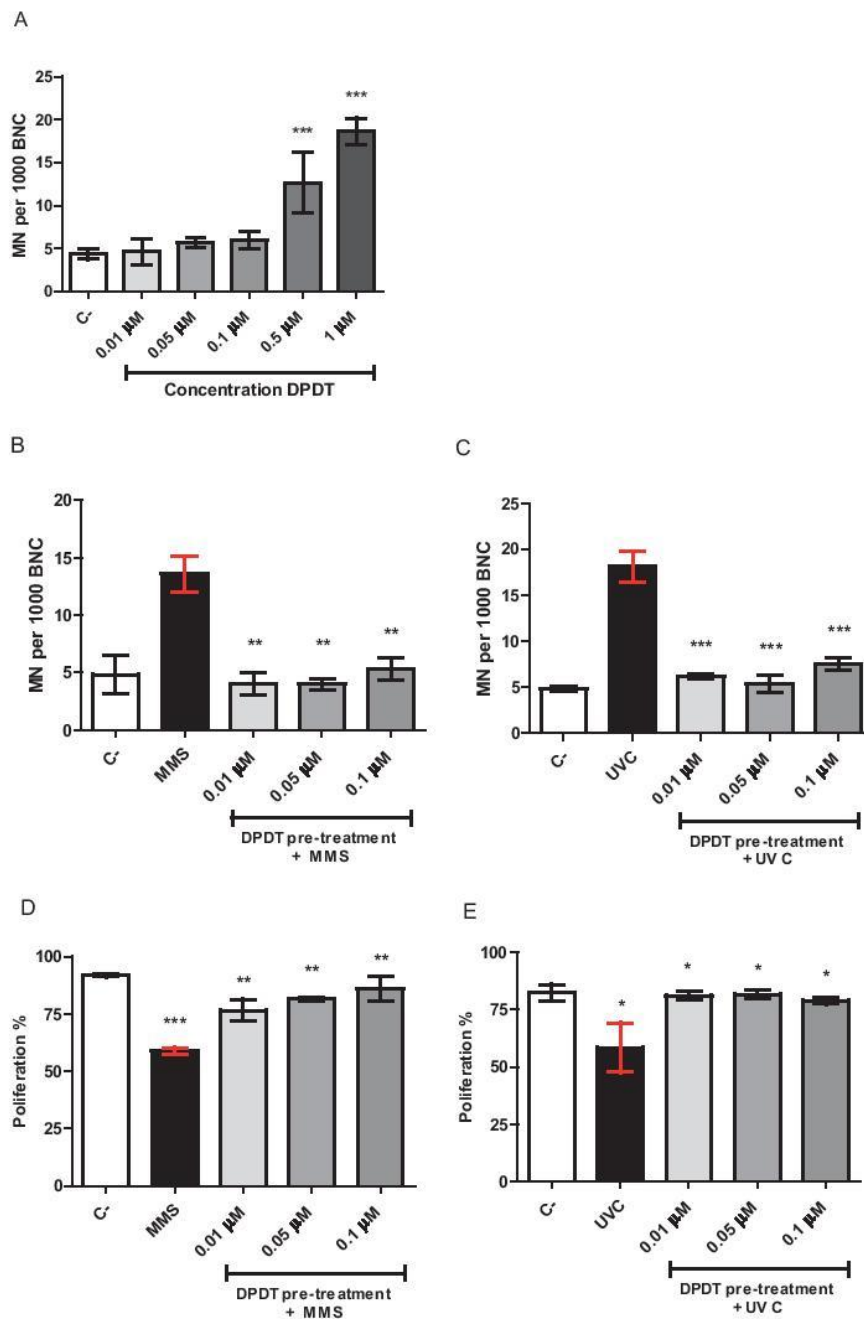


Figure 5. Micronucleus induction in V79 cells by 2h DPDT treatment (A). DPDT pre-treated cells were compared to cells only exposed to MMS (40 μM) (B), or UVC 5 J/m^2 (C). Effect of the treatment with non-mutagenic DPDT concentrations on the cell proliferation measured by NDI. (D) Treatment with MMS (40 μM) following DPDT pre-treatment at the indicated concentrations. (E) Treatment with UVC 5 J/m^2 following DPDT pre-treatment at the indicated concentrations. Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$. Data significantly different in relation to the control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ /one-way ANOVA Tukey's multiple comparison test. The groups with pre-treatment were compared to the treatment with mutagen alone. Positive control was compared to the solvent control.

0.1 μM (5.3 ± 1.5 MN, $P < 0.01$ and 7.5 ± 1.5 MN, $P < 0.001$) (Figure 5B and C, respectively) and increased the cell proliferation in all tested concentrations ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), assessed by NDI (Figure 6A and B). Thus, DPDT afforded protection against both mutagenic agents (MMS and UVC), suggesting antimutagenic effects.

Determination of intracellular ROS accumulation

As can be seen in Figure 6A, 2 h incubation with 0.01, 0.05 and 0.1 μM DPDT did not increase ROS generation. Moreover, pre-treatment at these concentrations decreased the ROS induction by H_2O_2 from 193% to about 150% ($P < 0.05$), and by *t*-BOOH, from 228% to about 170% ($P < 0.01$) (Figure 6B and C, respectively). However, pre-treatment with 1 μM DPDT (230% of total) potentiates ROS generation by H_2O_2 alone (193% of total) (Figure 6B).

Oxidative stress biomarkers

We also investigate the enzymatic antioxidant defenses by measuring SOD and CAT activity as well as TBARS concentration following DPDT treatment. Table 1 shows that DPDT at concentrations above 0.1 μM reduced SOD activity, whereas CAT activity remained unaltered. The concentration of TBARS significantly increased after exposure at 0.5 ($P < 0.001$) and 1 μM ($P < 0.001$) DPDT indicating oxidative stress induction (Table 1).

Discussion

OT compounds can have contrasting behaviours depending on the concentration used. The equilibrium between toxicological and therapeutic effects of a compound is a very important parameter when evaluating its usefulness as a pharmacological drug. Several authors have described that OT compounds are effective protector agents, even more active than their organoselenium (OS) and sulfur analogues. (16, 23) Accordingly, in low concentrations DPDT reduces lipid peroxidation induced by quinolinic acid and sodium nitroprusside in rat brain. (7) Also, it has been reported that DPDT concentrations below 5.0 μM are not cytotoxic and genotoxic in human leucocytes. (24) In this study, we demonstrate for the first time that the DPDT pre-treatment at non-toxic concentrations, ranging from 0.01 to 0.1 μM , presents potent antigenotoxic and antimutagenic effects against several known mutagens in V79 cells. The concentration of 0.1 μM was the most effective against the H_2O_2 and *t*-BOOH oxidative agents, as well as against UVC-radiation (that can damage DNA directly or via production of free radicals), reducing the observed genotoxic and mutagenic effect over 50% in relation to the respective mutagen alone. In conformity, DPDT at concentration range from 0.01 to 0.1 μM was able to reduce intracellular ROS accumulation generated by H_2O_2 and *t*-BOOH (Figure 6B and C) suggesting antioxidant properties.

Moreover, pre-treatment with DPDT resulted in survival improvement, antigenotoxic and antimutagenic effects following

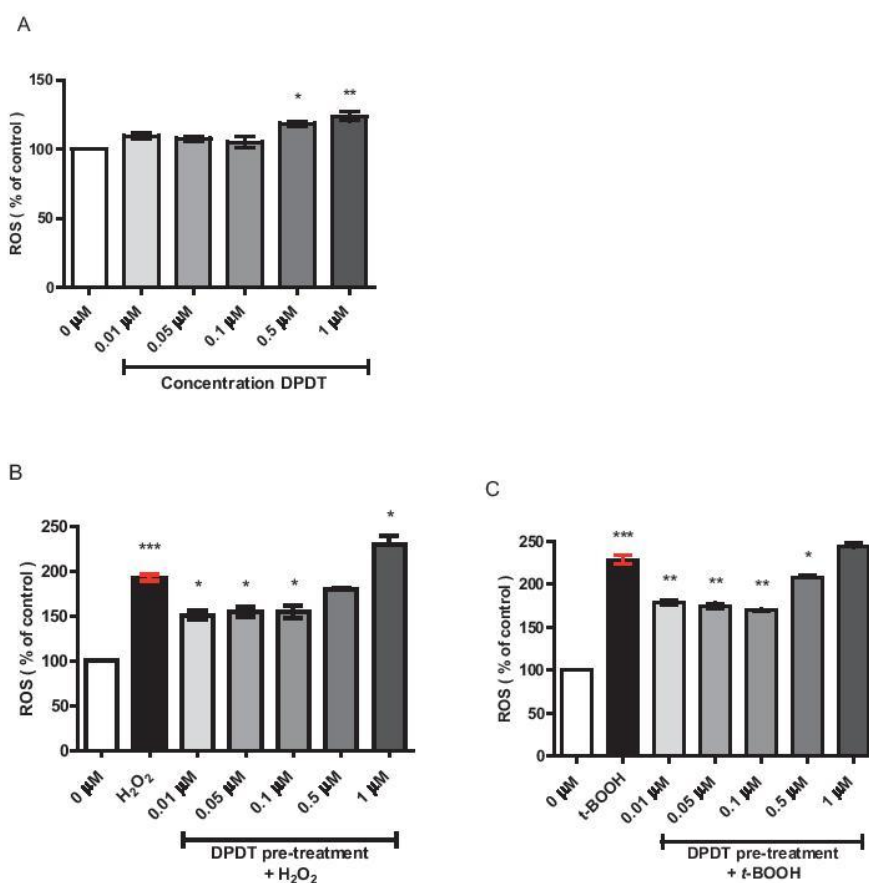


Figure 6. ROS generation in V79 cells by 2 h DPDT treatment (A). Cells treated with H_2O_2 (B) and *t*-BOOH (C) following DPDT pre-treatment. DPDT pre-treated cells were compared to cells only exposed to the oxidative agents H_2O_2 (500 μM) or *t*-BOOH (400 μM). Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$. Data significantly different in relation to the control group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ one-way ANOVA Tukey's multiple comparison test.

Table 1. Effect of DPDT treatment on oxidative stress biomarkers in V79 cells^a

| Concentration (μmol) | SOD activity (U SOD/mg protein) | CAT activity (U CAT/mg protein) | TBARS (MDA equivalents nmol/mg protein) |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|
| 0 | 185.48 ± 18.77 | 3.51 ± 0.84 | 1.2 ± 0.04 |
| 0.01 | 184.17 ± 32.65 | 3.71 ± 0.77 | 1.45 ± 0.27 |
| 0.05 | 163.99 ± 14.78 | 3.57 ± 1.49 | 0.7 ± 0.04 |
| 0.1 | 117.58 ± 28.66* | 3.86 ± 1.41 | 0.65 ± 0.21 |
| 0.5 | 109.44 ± 24.89** | 2.44 ± 0.83 | 3.6 ± 0.04*** |
| 1 | 115.01 ± 23.08* | 2.01 ± 1.31 | 4.9 ± 0.22*** |

MDA, malondialdehyde.

^aData expressed as mean ± SD of three independent experiments performed in duplicate. Significantly different in relation to the control group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001/one-way ANOVA Tukey's multiple comparison test.

MMS treatment. MMS is used as an experimental model compound for several decades to elucidate the toxicity mechanisms of alkylating agents relative to mutagenesis. (25, 26) It is a direct-acting alkylating agent whose action is mediated by base tautomerisation. (27) Numerous reports describe rapid glutathione (GSH) depletion by alkylating agents in mammalian cells leading to generation of oxidative stress. (28, 29) GSH is an intracellular peptide responsible for the maintenance of thiol status, peroxide metabolism, detoxification and antioxidant defense. (30) It has been postulated that a decrease of GSH may compromise cellular antioxidant defenses, leading to the accumulation of ROS generated as products of the normal cellular metabolism or external agents. The treatment with oxidative stress inducing agents such as UVC, H₂O₂ and *t*-BOOH, or activators of Phase II detoxifying enzymes such as MMS, can induce GSH synthesis. (30, 31) Detoxification of xenobiotics or their metabolites is one of the major functions of GSH. These compounds are electrophiles and form conjugates with GSH either spontaneously or in reactions catalysed by the enzyme Glutathione *S*-transferase. Moreover, GSH plays a crucial role in the metabolism, inducing adaptive responses to different metals and metalloids. (32)

Interestingly, the co-treatment with DPDT presented lower reduction in the genotoxic damage induced by H₂O₂, *t*-BOOH and MMS, and the post-treatment had no significant effect (data not shown). These data suggest that the protection effect of DPDT could be result of cellular antioxidant defense modulation rather than direct antioxidant action. DPDT is an electrophilic compound, which can suffer thiol nucleophilic attack in the tellurium atom. (15, 33) In this sense, it could interact with GSH and thiol group containing proteins. Such interaction of DPDT with a thiol containing redox sensitive blood enzyme δ-aminolevulinic acid dehydratase (δ-ALA-D) leading to the enzyme inhibition was observed in mice. (15) Consistently, previous works of our group showed that DPDT at concentrations above 50 and 0.5 μM in yeast and V79 cells, respectively, induced depletion of GSH resulting in decreased reduced/oxidized glutathione ratio. (3) On the other hand, Comparsi *et al.* (15) showed that the thiol content in mice brain increased as an adaptive response of cerebral tissue to the redox disruption caused by the compound. In this manner, one may suppose that DPDT, depleting GSH due to oxidation and/or as possible substrate of GSH conjugation, could modulate cellular antioxidant defense inducing GSH synthesis. Such induction could explain the antigenotoxic and antimutagenic effect of DPDT pre-treatment observed in our study. In support of this, diphenyl diselenide (the OS structural analog of DPDT) is detoxified by conjugation with GSH in rat liver fractions (34) and induced depletion of GSH in V79 cells. (26) Diphenyl diselenide also showed antigenotoxic activities against H₂O₂-, MMS- and UVC- induced DNA damage in V79 cells, which is observed at higher concentration range (1.62–12.5 μM) in relation to the DPDT. (26)

Furthermore, DPDT treatment at low concentrations did not induce changes in the SOD and CAT enzyme activities (Table 1). In contrast, concentrations above 0.1 μM increase lipid peroxidation and inhibit SOD activity in V79 cells (Table 1), indicating an oxidative stress induction. In accordance, Comparsi *et al.* (15) reported that 10 μmol/kg DPDT decreased SOD and CAT activity in rat brain. Previous studies reported that inhibition of SOD activity could be a result from the enzyme inactivation by oxidant agents. (35, 36) In addition, synthetic Se- and Te-containing organic redox modulators were shown to generate high levels of ROS at concentrations of 100 μM. (37) Tellurium can generate compounds that are structurally related to their selenium analogues and consequently can exhibit some similar chemical properties. In this sense, a series of OS compounds, as well as the structural analog diphenyl diselenide, also exhibit dual nature displaying both antimutagenic and mutagenic effects. (26, 38, 39) Multiple mechanisms of the protection against genotoxicity and oxidative stress induction by these compounds were suggested, including the influence on the activity of antioxidant enzymes (such as SOD, CAT and GPx) and on the level of GSH, which is capable of scavenging free radicals directly and may also play a role in protection against DNA damage. (38, 39)

In summary, the present study shows that pre-treatment with DPDT at concentration range of 0.01 to 0.1 μM confers protection against H₂O₂, *t*-BOOH, MMS- and UVC-induced cytotoxicity and genotoxicity. The chemoprotective effect is, most probably, due to the antioxidant action of the compound in low concentrations. Thus, investigation of the balance between the cytotoxic and antimutagenic potential of DPDT and its structural derivatives may help to develop novel and more efficient chemotherapy regimens.

Funding

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Bolsa de Pós Doutorado Júnior - PDJ no 164160/2013-2; MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 no 454929/2014-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul (FAPERGS). Conflict of interest statement: None declared.

References

- Carvalho, C. A., Gemelli, T., Guerra, R. B., Oliboni, L., Salvador, M., Dani, C., Araújo, A. S., Mascarenhas, M. and Funchal, C. (2009) Effect of in vitro exposure of human serum to 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)octen-1-one on oxidative stress. *Mol. Cell. Biochem.*, 332, 127–134.
- Nogueira, C. W., Zeni, G. and Rocha, J. B. (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.*, 104, 6255–6285.

3. Degrandi, T. H., de Oliveira, I. M., d'Almeida, G. S., Garcia, C. R., Villela, I. V., Guecheva, T. N., Rosa, R. M. and Henriques, J. A. (2010) Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis*, 25, 257–269.
4. Urig, S. and Becker, K. (2006) On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.*, 16, 452–465.
5. Avila, D. S., Benedetto, A., Au, C., Manarin, F., Erikson, K., Soares, F. A., Rocha, J. B. and Aschner, M. (2012) Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 52, 1903–1910.
6. Ren, X., Xue, Y., Zhang, K., Liu, J., Luo, G., Zheng, J., Mu, Y. and Shen, J. (2001) A novel dicyclodextrinyl ditelluride compound with antioxidant activity. *FEBS Lett.*, 507, 377–380.
7. Rossato, J. I., Ketzler, L. A., Centurião, F. B., Silva, S. J., Lüdtkke, D. S., Zeni, G., Braga, A. L., Rubin, M. A. and Rocha, J. B. (2002) Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.*, 27, 297–303.
8. Briviba, K., Tamler, R., Klotz, L. O., Engman, L., Cotgreave, I. A. and Sies, H. (1998) Protection by organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. *Biochem. Pharmacol.*, 55, 817–823.
9. Engman, L., Kandra, T., Gallegos, A., Williams, R. and Powis, G. (2000) Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. *Anticancer. Drug Des.*, 15, 323–330.
10. Avila, D. S., Colle, D., Gubert, P. et al. (2010) A possible neuroprotective action of a vinylic telluride against Mn-induced neurotoxicity. *Toxicol. Sci.*, 115, 194–201.
11. Sredni, B. (2012) Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. *Semin. Cancer Biol.*, 22, 60–69.
12. Nogueira, C. W., Rotta, L. N., Perry, M. L., Souza, D. O. and da Rocha, J. B. (2001) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res.*, 906, 157–163.
13. Borges, V. C., Rocha, J. B. and Nogueira, C. W. (2005) Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats. *Toxicology*, 215, 191–197.
14. Heimfarth, L., Loureiro, S. O., Dutra, M. F., Andrade, C., Pettenuzzo, L., Guma, F. T., Gonçalves, C. A., da Rocha, J. B. and Pessoa-Pureur, R. (2012) In vivo treatment with diphenyl ditelluride induces neurodegeneration in striatum of young rats: implications of MAPK and Akt pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 264, 143–152.
15. Comparsi, B., Meinerz, D. F., Franco, J. L. et al. (2012) Diphenyl ditelluride targets brain selenoproteins in vivo: inhibition of cerebral thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in mice after acute exposure. *Mol. Cell. Biochem.*, 370, 173–182.
16. Brito, V. B., Rocha, J. B., Folmer, V. and Erthal, F. (2009) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice. *Acta Biochim. Pol.*, 56, 125–134.
17. Mirabelli, C. K., Sung, C. M., McCabe, F. L., Faucette, L. F., Croke, S. T. and Johnson, R. K. (1988) A murine model to evaluate the ability of in vitro clonogenic assays to predict the response to tumors in vivo. *Cancer Res.*, 48, 5447–5454.
18. Thomas, P. and Fenech, M. (2011) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. *Methods Mol. Biol.*, 682, 217–234.
19. Wang, H. and Joseph, J. A. (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 612–616.
20. Bannister, J. V. and Calabrese, L. (1987) Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem. Anal.*, 32, 279–312.
21. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105, 121–126.
22. Salgo, M. G. and Pryor, W. A. (1996) Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 333, 482–488.
23. Pessoa-Pureur, R., Heimfarth, L. and Rocha, J. B. (2014) Signaling mechanisms and disrupted cytoskeleton in the diphenyl ditelluride neurotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014, 458601.
24. Caeran Bueno, D., Meinerz, D. F., Allebrandt, J., Waczuk, E. P., dos Santos, D. B., Mariano, D. O. and Rocha, J. B. (2013) Cytotoxicity and genotoxicity evaluation of organochalcogens in human leucocytes: a comparative study between ebselen, diphenyl diselenide, and diphenyl ditelluride. *Biomed Res. Int.*, 2013, 537279.
25. Liu, H., Colavitti, R., Rovira, I. I. and Finkel, T. (2005) Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ. Res.*, 97, 967–974.
26. Rosa, R. M., Moura, D. J., Romano E Silva, A. C., Saffi, J. and Pêgas Henriques, J. A. (2007) Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. *Mutat. Res.*, 631, 44–54.
27. Zhang, J. G., Nicholls-Grzeski, F. A., Tirmenstein, M. A. and Fariss, M. W. (2001) Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chem. Biol. Interact.*, 138, 267–284.
28. Liu, H., Lightfoot, R. and Stevens, J. L. (1996) Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidation of protein thiols. *J. Biol. Chem.*, 271, 4805–4812.
29. van de Water, B., Zoetewij, J. P. and Nagelkerke, J. F. (1996) Alkylation-induced oxidative cell injury of renal proximal tubular cells: involvement of glutathione redox-cycle inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327, 71–80.
30. Lu, S. C. (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.*, 30, 42–59.
31. Lu, S. C. (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.*, 13, 1169–1183.
32. Srikanth, K., Pereira, E., Duarte, A. C. and Ahmad, I. (2013) Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish—a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 20, 2133–2149.
33. Rigobello, M. P., Folda, A., Citta, A. et al. (2011) Interaction of selenite and tellurite with thiol-dependent redox enzymes: Kinetics and mitochondrial implications. *Free Radic. Biol. Med.*, 50, 1620–1629.
34. Prigol, M., Nogueira, C. W., Zeni, G., Bronze, M. R. and Constantino, L. (2012) In vitro metabolism of diphenyl diselenide in rat liver fractions. Conjugation with GSH and binding to thiol groups. *Chem. Biol. Interact.*, 200, 65–72.
35. Anbarasi, K., Vani, G., Balakrishna, K. and Devi, C. S. (2006) Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sci.*, 78, 1378–1384.
36. Pinton, S., da Rocha, J. T., Zeni, G. and Nogueira, C. W. (2010) Organoselenium improves memory decline in mice: involvement of acetylcholinesterase activity. *Neurosci. Lett.*, 472, 56–60.
37. Mániková, D., Letavayová, L. M., Vlasáková, D. et al. (2014) Intracellular diagnostics: hunting for the mode of action of redox-modulating selenium compounds in selected model systems. *Molecules*, 19, 12258–12279.
38. Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E. and Waszkielewicz, A. M. (2014) Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J. Appl. Genet.*, 55, 273–285.
39. Santos, R. A. and Takahashi, C. S. (2008) Anticlastogenic and antigenotoxic effects of selenomethionine on doxorubicin-induced damage in vitro in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 671–677.