



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Indução de parada no ciclo celular e apoptose pelo
ditelureto de difenila: Uma possível relação com
inibição de enzimas topoisomerases.**

Dissertação de Mestrado

Patrícia Mendes Jorge

Porto Alegre

2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Indução de parada no ciclo celular e apoptose pelo ditelureto de difenila: Uma possível relação com inibição de enzimas topoisomerases.

Patrícia Mendes Jorge

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

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre, novembro de 2012

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi subsidiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência – PRONEX/FAPERGS/CNPq10/0044-3 e pelo Laboratório de Genotoxicidade do – GENOTOX - Instituto Royal, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A redação da tese fundamentou-se nas recomendações do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, dessa Universidade.

*“Viver! E não ter a vergonha de ser feliz
Cantar e cantar e cantar a beleza de ser
Um eterno aprendiz...
Ah meu Deus! Eu sei, eu sei
que a vida devia ser bem melhor e será,
mas isso não impede que eu repita
é bonita, é bonita, e é bonita”.*

Gonzaguinha

A meus pais
À minha família e meus amigos
Ao Márcio
Pessoas que foram meu porto seguro nesta etapa

Agradecimentos

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

Ao Professor João Antonio Pêgas Henriques, pela oportunidade de aprendizado e confiança depositada em mim durante esse período e pela amizade. Além de ser um grande pesquisador, é uma grande pessoa que está sempre disposta a ajudar e dar condições para que possamos alcançar os objetivos do trabalho.

À Nucha pela orientação e atenção sempre a mim dispensada durante todo esse período e pela fundamental contribuição na redação do manuscrito.

À Sílvia e ao Luciano, que sempre estiveram prontos e dispostos a ajudar quando surgiram dificuldades durante todo o mestrado. Obrigada pelo carinho e atenção de vocês.

À Professora Fabiana Horn pela colaboração na realização dos ensaios de apoptose.

À todos os colegas do laboratório 210: Clara, Cristiano, Juliane, Michelle, Diana, Victória, Lyda, Grethel, André, Lauren, Ana Lúcia, Fernanda, Lavínia, Andrea, Kelly e Natália pelo carinho e sempre tornar o laboratório um ambiente de trabalho muito divertido.

Aos colegas Larissa e Eduardo obrigado pela ajuda na realização dos ensaios de ciclo celular. Larissa, obrigada também por estar sempre disposta a ajudar sempre que era realizado um pedido de socorro.

À turma do genotox pelo carinho e atenção.

Gostaria de agradecer ao Iuri, uma das pessoas que contribuiu diretamente com este trabalho e me aguentou esse tempo todo. Agradeço pela amizade, por todos os

conselhos, por comemorar comigo nas horas boas e por sempre me ajudar a solucionar os problemas nas horas ruins. És um grande exemplo de pesquisador, por sua competência e profissionalismo.

À professora Adriana Gava por sempre me incentivar a lutar pelos meus objetivos.

Às amigas biólogas Juliana, Sabrina e Natália pelo incentivo e apoio.

À Isis pelo companheirismo e amizade de muitos anos. Obrigada por me ouvir quando eu mais precisava, mesmo sem entender nada sobre o que eu estava falando.

Aos meus sogros Soely e Edgar e aos meus cunhados Leandra, Daniela, Luciano e Carla, pelo carinho e paciência durante este período.

Aos meus sobrinhos e afilhados Rana, Enrico, Maurício, Júlia, João Vitor, Ana Carolina e Vitória obrigada por existirem e tornar a minha vida mais colorida com a presença de vocês.

Ao Márcio, uma pessoa especial e rara que entrou em minha vida. Mais que um marido, um amigo e companheiro para todas as horas, que foi meu alicerce de carinho e envolvimento nesse período decisivo em minha vida. Palavras não são suficientes para traduzir a importância dele e o que representa para mim.

Finalmente agradeço com todo o meu carinho para aqueles que desde o início da minha vida sempre estiveram comigo, me apoiando, ensinando e não me deixando desistir no primeiro obstáculo: meu pai Milton, minha mãe Eva e meu irmão Milton Jr. Obrigada por tudo, eu não teria chegado aqui sem o apoio, amizade e amor de vocês.

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por ter conseguido alcançar mais este objetivo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABELAS	11
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	17
1- Telúrio	17
2 - Toxicologia dos compostos orgânicos contendo telúrio	19
3 – Potencial de moléculas organoteluradas na prevenção e tratamento do câncer	20
4- O ditelureto de difenila, objeto desse estudo.....	21
5- DNA Topoisomerasas	23
5.1- Classificação das topoisomerasas	25
5.2- Como as topoisomerasas funcionam?	25
5.3- O papel fisiológico das topoisomerasas	26
5.4.1- Topoisomerase I.....	26
5.4.2- Topoisomerase II.....	27
5.4.3- Topoisomerase III	27
5.5- Topoisomerasas: enzimas alvo no desenvolvimento de fármacos com aplicação na terapia anticâncer.....	28
5.5.1- Mecanismos de ação de inibidores de topoisomerasas	28
5.5.1.1- Estabilizadores do complexo DNA – topoisomerasas (“venenos de topoisomerase”.)	29
5.5.1.2- Inibidores catalíticos.....	30
5.6- Topoisomerasas, ciclo celular e apoptose	31
6- Ensaio com células de mamíferos	32
6.1 - Células V79	32

6.2- Teste de micronúcleos.....	33
7. A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo.....	35
OBJETIVOS.....	39
Objetivo geral	39
Objetivos específicos	39
CAPÍTULO I- DIPHENYL DITELLURIDE-INDUCED CELL CYCLE ARREST AND APOPTOSIS: A POSSIBLE RELATION WITH TOPOISOMERASE INHIBITION	
	40
Discussion.....	50
CAPÍTULO II- SUPPLEMENTARY RESULTS	67
DISCUSSÃO	76
CONCLUSÃO	86
Conclusões específicas:	86
PERSPECTIVAS	89
REFERÊNCIAS:	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do Ditelureto de Difenila (DTDF)	21
Figura 2. Esquema dos mecanismos de ação de inibidores catalíticos e “venenos de topoisomerase”. Através deste esquema é mostrada a ação de “venenos de topoisomerase” através da estabilização do complexo de clivagem por inibidores conhecidos. Também é apresentada a ação de inibidores catalíticos de topoisomerase que se ligam a essa enzima, não permitindo a formação de quebras no DNA. (Adaptada de Pommier, 2009).....	31
Figura 3. Micrografia óptica de células V79 em cultura.....	32
Figura 4. Fotografia mostrando micronúcleo em célula V79.....	33
Figura 5. Esquema mostrando o processo de formação do micronúcleo. Adaptada de Fenech, (2000).	34
Figura 6. Microscopia eletrônica mostrando células individuais da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – fonte : Universidade de Leicester.	35
Figura 7. Modelo esquemático representando o mecanismo de ação do DTDF. Este modelo sugere que esse composto provavelmente interaja com enzima topoisomerase 1 promovendo uma estabilização do complexo de clivagem e, conseqüentemente formação de DSBs durante a síntese da fita descontínua. Assim, pode ocorrer parada no ciclo celular, provocando morte celular ou a reparação dos danos, levando a sobrevivência celular.....	84

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table I. Yeast strains used in this study.....	61
Table II. Apoptosis and Necrosis evaluation of DPDT in V79 cells by morphological assay.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	trifosfato de adenosina
DNA	ácido desoxirribonucléico
DSB	quebras duplas
DTDF	ditelureto de difenila
GSH	glutationa reduzida
HR	recombinação homóloga
OT	organotelurado
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
Te	telúrio
δ -ALA-D	enzima δ -aminolevulinato-desidratase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
CdTe	Telureto de Cádmio
HL-60	Linhagem celular de leukemia promielocítica humana
V79	Fibroblastos de pulmão de hamster chinês
Top II	Topoisomerase II
Top I	Topoisomerase I
Top III	Topoisomerase III
MMEJ	<i>Microhomology mediated end joining</i>

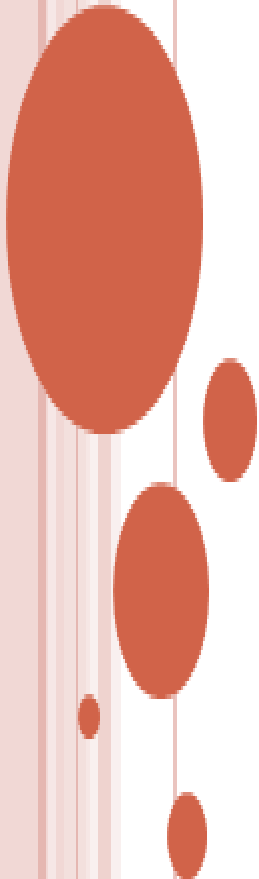
RESUMO

O ditelureto difenila (DTDF) é um protótipo para o desenvolvimento de novas moléculas biologicamente ativas. Estudos prévios caracterizaram o efeito citotóxico dessa molécula em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79) mas os mecanismos relacionados à redução da viabilidade pelo DTDF são pouco conhecidos. Portanto, neste trabalho foi investigado o tipo de morte celular provocada pelo DTDF, sua influência no ciclo celular e sua possível interação com enzimas topoisomerases empregando células V79 e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelos biológicos de estudo. Conforme esperado, houve redução da viabilidade celular após o tratamento DTDF observada pelo ensaio MTT. A análise morfológica por coloração diferencial mostrou ocorrência de células apoptóticas e necróticas. Um aumento da atividade da enzima caspase 3/7 confirma a indução de apoptose pelo DTDF. Foi observada parada na progressão do ciclo celular na fase S e em sub-G1. A interação com topoisomerases foi verificada pelo teste de micronúcleo (MN) em células V79 onde foi verificado um possível potencial intercalante do DPDT. Linhagens de levedura deficientes em Top1p apresentaram maior tolerância ao DTDF em relação à linhagem selvagem, sugerindo que a interação com a enzima pode estar envolvida na toxicidade do DTDF. A sensibilidade ao DTDF encontrada na linhagem *top3Δ* indica que Top3p pode participar na reparação das lesões do DNA induzidas por este composto. Os nossos resultados sugerem que a diminuição da viabilidade celular pode ser atribuída à interação do DTDF com enzimas topoisomerases, levando a formação de quebras no DNA com consequente parada no ciclo celular e morte celular por apoptose/necrose.

ABSTRACT

The diphenyl ditelluride (DPDT) is a prototype for the development of new biologically active molecules. In previous studies, this organotelluride has shown an elevated cytotoxicity in lung fibroblast cell line derived from Chinese hamster (V79 cells), but the mechanisms for reduction of cell viability still remain unknown. Therefore, in this study we investigate the type of cell death induced by DPDT, the influence on cell cycle and its possible interaction with topoisomerase enzymes using V79 cells and the *Saccharomyces cerevisiae* yeast as biological models of study. As expected, there was a reduction in cell viability after DPDT treatment observed by MTT assay. Morphological analysis showed significant elevation in apoptotic and necrotic cells. An increase of caspase 3/7 activity confirms the apoptosis induction by DPDT. The arrest in the progression of the cell cycle in S phase and in sub-G1 was observed. The interaction with DNA topoisomerases was verified by the micronucleus test (MN) in V79 cells, which showed a possible intercalating potential of DPDT. Yeast strain deficient in Top1p showed higher tolerance to DPDT in relation to the wild type isogenic strain, suggesting that the interaction with this enzyme could be involved in the toxicity of DPDT. The sensitivity to DPDT found in *top3Δ* strain indicates that Top3p could participate in the repair of DNA lesions induced by this compound. Our results suggest that the decrease in cell viability can be attributed to interaction of DPDT with topoisomerases enzymes, leading to formation of DNA breakage and consequent cell cycle arrest and cell death by apoptosis / necrosis.

INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO

1- Telúrio

O Telúrio (Te) é um semi-metal, pertencente a um grupo de elementos conhecidos como calcogênios, tendo sido isolado em 1798, por Klaproth, quem lhe deu o nome, em homenagem à deusa da Terra (*Tellus* = terra) (para revisão, ver Chasteen, *et al.*, 2009).

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

O Te^0 é usado como componente de muitas ligas metálicas, sendo adicionado ao chumbo para aumentar a sua resistência mecânica, durabilidade e diminuir a ação corrosiva do ácido sulfúrico nos processos industriais (Petraghani, 1995, Taylor, 1996).

O Te tem sido amplamente utilizado na indústria e na agricultura. Utilizações na indústria incluem a produção de discos ópticos blu-ray (Nishiuchi, *et al.*, 1998, Perrier, *et al.*, 2003), componentes de semicondutores (Abdel-Aziz, 2006), em soluções metal oxidante para escurecer ou macular metais (Yarema & Curry, 2005), na modificação de fase em discos ópticos magnéticos e materiais fotográficos (Tyan, *et al.*, 1986, Dun, *et al.*, 2011), na indústria da borracha (De Silva, 1986) e, como importante intermediador em reações de síntese orgânica (Zeni, *et al.*, 2006). Na agricultura, o telúrio tem sido usado como um componente de inseticidas, bactericidas, fungicidas (Kormutakova, *et al.*, 2000, Massardo, *et al.*, 2009).

O uso de Te também surgiu em vários materiais desenvolvidos nos últimos anos, como pontos quânticos fluorescentes de CdTe, que podem ser usados como sondas em sistemas biológicos de detecção (Deng, *et al.*, 2007, Ba, *et al.*, 2010), bem como as nanopartículas de telureto, clusters e nanotubos que têm sido utilizados na medicina e eletrônica (Tian, *et al.*, 2012). Entretanto, compostos contendo Te já eram utilizados medicinalmente no início dos anos 1930 no tratamento para a sífilis e hanseníase (para revisão, ver Frazer, 1930) e mais recentemente como coadjuvante em terapias anti-câncer (Hayun, *et al.*, 2009).

A exposição ocupacional ao Te pode ocorrer em indivíduos durante o trabalho na produção de algum dos itens acima mencionados. Foi relatado que trabalhadores expostos a vapores de fusão da liga de cobre-telúrio apresentam efeitos adversos

(Blackadder & Manderson, 1975). Devido ao fato de produtos fabricados com Te são indiscriminadamente descartados em aterros, a exposição humana através solo e da água, provavelmente irá aumentar. Acumulação em plantas ocorre, particularmente nos membros da família *Alium*, como cebola e alho, e, portanto, acumulação de Te por ingestão representa uma possibilidade viável (Larner, 1995). Uma vez ingerido, Te tem a capacidade de se distribuir pelo corpo. No estudo realizado por Taylor, (1996) em ratos, a maior proporção de Te foi encontrada no rim e osso, após uma única injeção intraperitoneal, mas com administrações orais repetidas, o Te foi encontrado no coração, osso, rim, baço e pulmão. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que sistema nervoso, rim, pele e feto (hidrocefalia) são os principais locais para a toxicidade Te (Taylor, 1996). Estudos *in vivo* sugerem que cerca de 25% do Te administrado por via oral é absorvido pelo intestino (Taylor, 1996), mas a informação sobre toxicidade gastrointestinal ainda é muito escassa.

Alguns estudos já demonstraram que pequenas quantidades de telúrio foram identificadas nos fluidos corporais, tais como sangue e urina (Siddik & Newman, 1988, Newman, *et al.*, 1989). Outros trabalhos demonstraram também que esse elemento está presente na forma de telurocisteína e telurometionina em muitas proteínas de bactérias (Boles, *et al.*, 1995, Ogra, *et al.*, 2008), leveduras (Yu, *et al.*, 1993) e outros fungos (Ramadan, *et al.*, 1989). Contudo até o presente momento, proteínas contendo telúrio não foram identificadas em células animais. Por essa razão o telúrio não apresenta função fisiológica descrita até o momento, em mamíferos (Taylor, 1996, Rezanka & Sigler, 2008).

É bem caracterizada a elevada toxicidade de compostos telurados em ratos e humanos (Roman, *et al.*, 2007, Santos, *et al.*, 2009, Schiar, *et al.*, 2009, Sandoval, *et al.*, 2010). Embora as transformações bioquímicas, mecanismos de ação e o significado biológico da exposição a estas substâncias sejam pouco conhecidos, no entanto, há uma crescente preocupação em relação aos potenciais efeitos tóxicos que este elemento pode causar (Meotti, *et al.*, 2003, Řezanka & Sigler, 2008). Desta forma, com o aumento no uso industrial do telúrio, tanto das suas formas orgânicas quanto inorgânicas, trouxe riscos ocupacionais e ambientais para a saúde humana (Meotti, *et al.*, 2003, Borges, *et al.*, 2007).

Os compostos contendo esse semi-metal são potentes agentes neurotóxicos por inibirem a atividade da enzima esqualeno monooxigenase, uma enzima microsossomal contendo flavina-adenina-dinucleotídeo que catalisa o segundo passo na biossíntese do

colesterol, a conversão do esqualeno a 2,3-epoxiesqualeno (Goodrum, 1998, Laden, *et al.*, 2000, Laden & Porter, 2001). A sensibilidade da enzima deve-se à reação desse elemento com grupamentos sulfidríla e com ligação à cisteína presente na estrutura da proteína (Laden & Porter, 2001). Dessa forma, o esqualeno acaba acumulando-se e a síntese do colesterol, que é um precursor da mielina, é inibida nas células de Schwann. A consequência desse processo é uma desmielinização ou hipomielinização (Goodrum, 1998, Gajkowska, *et al.*, 1999). Um efeito secundário é a inibição da expressão de genes que codificam as proteínas envolvidas na síntese da bainha de mielina (Toews, *et al.*, 1997).

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

Apesar da toxicidade do elemento, os compostos organotelurados apresentam propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias, podendo ainda ser empregados como drogas antitumorais e antivirais (Frei, *et al.*, 2008, Friedman, *et al.*, 2009, Sredni-Kenigsbuch, *et al.*, 2010). Consequentemente, o emprego farmacológico desses agentes cresceu muito nos últimos anos (Cunha, *et al.*, 2009).

O primeiro composto orgânico de telúrio foi sintetizado por Friedrich Wöhler em 1840. Desde sua descoberta até metade do século XX, a química dos compostos organotelurados desenvolveu-se rapidamente. Atualmente, esses compostos constituem novos interesses farmacológicos. Vários destas substâncias, com diferentes características e estruturas químicas, vêm sendo estudadas quanto às suas propriedades farmacológicas e toxicológicas (Nogueira, *et al.*, 2004, Rezanka & Sigler, 2008).

2 - Toxicologia dos compostos orgânicos contendo telúrio

Embora exista um crescente uso de compostos orgânicos contendo telúrio nos campos da química e bioquímica, não existem muitos relatos sobre a toxicidade dessas substâncias até o momento. No entanto, da mesma forma que na toxicologia dos compostos organoselenados, as moléculas contendo telúrio são menos tóxicas do que os

compostos iônicos desse metalóide. Além disso, a toxicidade de compostos organotelurados é inferior à dos análogos organoselenados (Nogueira, *et al.*, 2004).

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

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

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

3 – Potencial de moléculas organoteluradas na prevenção e tratamento do câncer

No contexto da terapia anticâncer, compostos orgânicos contendo telúrio, capazes de ser seletivamente incorporados em células tumorais e de inibirem o sistema tioredoxina redutase foram desenvolvidos (Shaaban, *et al.*, 2009). Diversos compostos contendo telúrio foram capazes de reduzir o crescimento tumoral de células em cultura em concentrações na ordem de micromolar (Sun, *et al.*, 1996, Engman, *et al.*, 2000, Hayun, *et al.*, 2009, Rigobello, *et al.*, 2009).

O ditelureto de 3,3'-diaminodifenila e o ditelureto de 4,4'-diisopropildifenila induziram morte celular por apoptose em células de leucemia promielocítica humana (linhagem HL-60) em cultura em concentrações da ordem de 1 μ M (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). Neste mesmo estudo Sailer et al. (2004) mostraram que outros diteluretos diarílicos são capazes de causar apoptose através de alterações no ciclo celular dessa linhagem celular, mostrando um efeito anti-proliferativo. 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 antimestastática (Cunha, *et al.*, 2005). Os estudos utilizando HL-60 como modelo experimental também mostraram que outra molécula contendo telúrio, conhecida como RT-04, o qual também inibe a ação da catepsina B, é capaz de induzir apoptose nessa linhagem celular por meio do aumento da atividade das caspases 3, 6 e 9. O mecanismo envolvido nesse fenômeno inclui a redução da expressão de Bcl-2 (Abondanza, *et al.*, 2008). Consistentemente foi verificada a indução de caspases pelo cloreto de telúrio (TeCl_2) em timócitos de ratos (Iwase, *et al.*, 2004).

Em nível sistêmico, foi verificado que o composto AS101 apresenta propriedades antitumorais em camundongos possivelmente pela sua atividade imunomoduladora (Sredni, *et al.*, 1987, Sredni, *et al.*, 1988, Sredni, *et al.*, 1990). Posteriormente, Kalechman et al., (1996) constataram efeito sinérgico de AS101 e Taxol na redução de adenocarcinoma pulmonar em modelos murinos. Estudos realizados observaram que o composto AS101 apresentou atividade antitumoral em camundongos com linfoma cutâneo de células T. Essa molécula organotelurada reduziu o crescimento tumoral de maneira dose-dependente, por induzir parada no ciclo celular nas células T em fase G2/M e indução de apoptose nas concentrações mais elevadas, por ativação das caspases 3 e 9. Esses efeitos na parada de ciclo e indução de apoptose foi atribuído à alta geração de espécies reativas provocada por esta molécula (Frei, *et al.*, 2008). Compostos telurados como o DTDF e o tetracloreto de telúrio (TeCl_4) promoveram diminuição de viabilidade celular, e aumentos significativos na atividade de caspase 3/7 e 9 indicando apoptose (Vij & Hardej, 2012).

4- O ditelureto de difenila, objeto desse estudo.

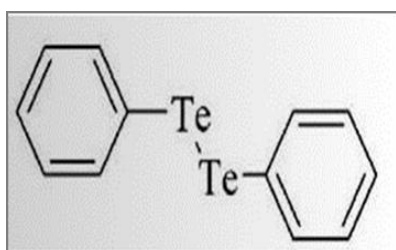


Figura 1. Estrutura química do Ditelureto de Difenila (DTDF)

O ditelureto de difenila (DTDF) é um composto organotelurado, sólido, de peso molecular de 407,2g e altamente hidrofóbico. É um importante intermediário

em reações de síntese orgânica, em especial de drogas contendo telúrio (Muñiz Álvarez, *et al.*, 2005). Dessa maneira, essa molécula representa um potencial risco ocupacional para trabalhadores da indústria química (Taylor, 1996, Meotti, *et al.*, 2003). Esse composto tem sido estudado devido às suas propriedades toxicológicas e interessantes atividades farmacológicas, com fins ao desenvolvimento de novos fármacos organotelurados (Cunha, *et al.*, 2009).

O DTDF possui a capacidade de perturbar a homeostase redox dos grupamentos tiólicos em proteínas é capaz de afetar uma série de enzimas importantes. Este composto inibe também a atividade da enzima Na^+K^+ ATPase em membrana plasmática provenientes de sinapses de córtex cerebral de ratos jovens (Borges, *et al.*, 2005). Foi demonstrado que o DTDF induziu o aumento de hemólise em eritrócitos humanos devido ao aumento do conteúdo de glutathiona oxidada (Santos, *et al.*, 2009, Schiar, *et al.*, 2009).

A perturbação desses processos bioquímicos mediados por diversas enzimas acarreta várias consequências fisiológicas em nível de sistemas e organismos. Em relação ao conhecimento dos efeitos do DTDF em animais, vários efeitos neurotóxicos em roedores foram relatados entre eles este composto pode provocar ainda desmielinização. O DTDF é capaz de afetar sistemas de fosforilação e desfosforilação de proteínas celulares, alterando a organização e a estrutura celular (Moretto, *et al.*, 2005).

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

Essa molécula orgânica contendo telúrio possui potencial teratogênico em fetos de ratos, e além disso, provoca altas taxas de mortalidade pré e pós-natais (Stangherlin, *et al.*, 2005). A exposição a este composto também causa estresse oxidativo no córtex cerebral, hipocampo e estriado dos filhotes, por meio da inibição da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e δ -ALA-D. As observações desses estudos sugerem que o DTDF (ou algum metabólito) consegue passar para os filhotes através do leite materno (Stangherlin, *et al.*, 2009).

Sailer et al.,(2003) mostraram que o DTDF induziu morte celular por apoptose em células de leucemia promielocítica humana em cultura de maneira tempo e dose dependente. Foi mostrado em (Vij & Hardej, 2012) que este composto induz apoptose em células de cólon. Estudos verificaram que esse composto aumentou a população de células hipodiplóides de timócitos de ratos, possivelmente pela indução da ativação de caspases(Iwase, *et al.*, 2004).

Degrandi et al., (2010) verificaram que o DTDF pode induzir alteração no quadro de leitura em *Salmonella typhimurium* e em linhagem selvagem haplóide de *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, o DTDF apresenta um comportamento similar a um agente intercalante. Os mutantes de *S. cerevisiae* defectivos na reparação por excisão de bases e na reparação recombinacional mostraram elevada sensibilidade ao DTDF. O DTDF apresentou citotoxicidade a partir da concentração de 1 μ M após 2 h de exposição. Consistentemente, o tratamento das células por 2 h com concentrações de DTDF citotóxicas aumentaram os níveis de formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nas concentrações mais elevadas, o DTDF induziu a formação de quebras simples e duplas de DNA em células V79, como evidenciado pelo ensaio cometa, nas versões alcalina e neutra, na presença e ausência de ativação metabólica. O tratamento também induziu aumento no número de micronúcleos (MN) em células binucleadas de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79), demonstrando potencial mutagênico dessa molécula em altas concentrações. Finalmente, o pré-tratamento com N-acetilcisteína, que restaura o GSH ao nível normal, reduziu os efeitos oxidativos, genotóxicos e mutagênicos do DTDF em levedura e em células V79.

5- DNA Topoisomerases

A estrutura em dupla fita em forma de hélice do DNA propicia muitos benefícios para um armazenamento estável e seguro da informação genética. A informação contida nos nucleotídeos, mais especificamente nas bases nitrogenadas fica “escondida” no interior da dupla fita, reduzindo o máximo possível que o meio possa induzir alterações nas bases, como em ataques químicos ou físicos. No entanto, essa estrutura em dupla hélice do DNA, apesar de muito vantajosa, pode causar naturalmente problemas de ordem topológica para a molécula. Alterações na topologia da estrutura do DNA ocorrerem normalmente nos processos que devem acessar à informação contidas nas bases nitrogenadas tais como replicação, recombinação, transcrição ou

remodelamento da cromatina. Esses processos necessitam da separação das fitas que formam a dupla hélice, tendo a capacidade de induzir, desta maneira, supertorções na molécula de DNA que podem levar a um superenrolamento ou superhelicoidização com a formação de “nós”, tendo como consequências, a quebra das fitas do DNA (Schoeffler & Berger, 2008, Liu, *et al.*, 2009).

O DNA em eucariotos possui um grande tamanho. Assim, ele se encontra associado a proteínas histonas, formando estruturas denominadas nucleossomos assim o DNA é compactado e permite que os genomas eucarióticos de grandes dimensões caibam dentro do núcleo das células. Desta forma, é produzido uma superhelicoidização que requer relaxamento, caso contrário poderá resultar em problemas topológicos que acompanham os processos acima citados, que ocorrem no DNA da célula.

Em procariotos o material genético consiste em uma grande molécula de DNA circular. A consequência da natureza circular é a origem de um superenovelamento da dupla fita. Em ambas as situações há alterações topológicas no DNA que se não forem resolvidas podem originar quebras nas fitas, bem como dificultar o acesso de enzimas no DNA, desta maneira interferindo em diversos processos celulares, como na expressão gênica, na duplicação e na segregação cromossômica que exigem topologias específicas da molécula de DNA (Liu, *et al.*, 2009, Vologodskii & Rybenkov, 2009, Neuman, 2010).

Os problemas topológicos do DNA são resolvidos por enzimas denominadas de DNA topoisomerasas. Estas enzimas estão presentes em todos os organismos e na manutenção da estrutura e dos processos que envolvem o metabolismo do DNA, modificando e regulando a sua topologia, induzindo quebras simples ou duplas temporárias nas fitas do DNA e posteriormente religando-as. Essas enzimas passam a ter uma importância fundamental já que os movimentos de torção no DNA são limitados, conseqüentemente essas quebras induzidas facilitam enormemente os movimentos das fitas para manutenção topológica da molécula. Desta forma, essas enzimas podem induzir o relaxamento da molécula de DNA evitando a superhelicoidização ou converter uma forma catenada da fita (unida como elos em uma corrente) para uma forma decatenada (separada) (Kalkbrenner, *et al.*, 2009, Vologodskii & Rybenkov, 2009, Rampakakis, *et al.*, 2010).

5.1- Classificação das topoisomerases

As topoisomerases variam conforme o mecanismo de clivagem e quanto a sua arquitetura, sendo classificada em duas classes distintas: enzimas do tipo I (Top I) que induzem quebras de fita simples e enzimas do tipo II (Top II) que formam quebras de fitas duplas (Berger, 1998, Corbett & Berger, 2004).

Há vários subtipos de topoisomerases que são classificados de acordo com a sequência de aminoácidos e o mecanismo de reação. As enzimas do tipo I compreendem as subfamílias IA, IB, e IC. Os membros da subfamília IA não possuem homologia entre si, diferindo no tipo de complexo enzima-DNA que eles formam. Topoisomerases da subfamília IA estabelecem uma ligação covalente entre o resíduo de tirosina e a extremidade 5' do DNA em uma reação metal-dependente (Mg^{+2} e Zn^{+2}). Neste grupo são incluídas as topoisomerases I e III de *Escherichia coli*, topoisomerase III de eucariotos (Top3) e a girase reversa encontrada em arqueobactérias hipertermófilas. Topoisomerases da subfamília IB formam uma ligação fosfotirosil com a extremidade 3' do DNA, sendo uma reação independente de metal. Esse grupo inclui as topoisomerases I (Top1) eucariotas, bem como enzimas homólogas encontradas em certas bactérias. O tipo IC funcionalmente é muito similar as topoisomerases do tipo IB e compreende somente a topoisomerase V, sendo encontrada exclusivamente em um único gênero de *Archea* (Forterre, *et al.*, 1996, Forterre, *et al.*, 2007, Viard & de la Tour, 2007, Baker, *et al.*, 2009, Forterre & Gadelle, 2009)..

As topoisomerases II são subclassificadas em IIA ou IIB. Os subtipos da família IIA incluem: topo II eucarióticas (Top2), DNA girase bacteriana, Archaea e do cloroplasto, e topo IV bacteriana. Todos os tipos de topo IIA são capazes de decatenar e desenrolar o DNA (Gadelle, *et al.*, 2003, Collins, *et al.*, 2009, Forterre & Gadelle, 2009).

5.2- Como as topoisomerases funcionam?

DNA topoisomerases de modo geral induzem quebras de fita simples ou duplas nas fitas do DNA, por uma reação de transesterificação entre o resíduo de tirosina da enzima e a ligação fosfodiéster que liga os nucleotídeos, de maneira a estabelecer uma ligação covalente e formando um complexo entre o DNA e a enzima. Quando a ligação fosfodiéster é reestabelecida a enzima é liberada do complexo. Como foi dito

anteriormente, as topoisomerases do tipo I induzem quebras de fita simples e as topoisomerases do tipo II realizam quebras duplas nas fitas de DNA.

5.3- O papel fisiológico das topoisomerases

De modo geral, as topoisomerases são enzimas fundamentais para resolver problemas topológicos no DNA, como supertorções, induzindo relaxamento na molécula, separar segmentos catenados. Alterações topológicas na estrutura do DNA surgem normalmente em função da molécula ser uma dupla hélice e pelo seu longo tamanho necessitando ser compactado (superenrolado). Consequentemente, processos celulares do metabolismo do DNA que envolvem descompactação e abertura das fitas necessitam que o este sofra alterações estruturais para que a informação nele contida possa ser acessada. Deste modo as topoisomerases são enzimas fundamentais que acompanham diversos processos biológicos que envolvem o DNA (Nitiss, 2009, Pommier, 2009). Neste tópico serão apresentadas as principais funções fisiológicas das principais topoisomerases eucariotas.

5.4.1- Topoisomerase I

A função chave da topoisomerase I é no relaxamento do DNA supertorcido pela transcrição, replicação, recombinação e remodelamento da cromatina. Essa enzima atua sobretudo nas regiões transcritas da cromatina em associação com complexos replicacionais e transcripcionais (Rothenberg, 1997, Corbett & Berger, 2004).

A topoisomerase I possivelmente tenha um papel importante em diferentes fases da transcrição de genes específicos, como na iniciação e na alongação, modulando a torção gerada nestas etapas. Foi mostrado em linhagens de *S. cerevisiae* deficientes nesta topoisomerase níveis transcripcionais reduzidos, sendo que o mesmo ocorre em células de mamíferos quando expostas a camptotecina, um conhecido inibidor de Top1. Entretanto, a sua função real dentro desse processo permanece ainda obscura (Pommier, 2006, Beretta, *et al.*, 2008).

Essa topoisomerase pode influenciar na estrutura da cromatina e na organização dos nucleossomos, bem como afeta a modificação das histonas. Outras funções exercidas pela topoisomerase I, como nas reações de processamento e na condensação dos cromossomos também são consideradas, mas da mesma forma ainda muito pouco esclarecidas (Pommier, 2006, Pommier, 2009).

5.4.2- Topoisomerase II

Um dos papéis centrais da topoisomerase 2 é a resolução de problemas topológicos associados com a replicação, sendo essencial em todas as células eucariotas. Na ausência da atividade dessa topoisomerase, o desenrolamento do duplex parental leva a uma acumulação de DNA supertorcido em frente a forquilha de replicação que deve ser relaxada pela Top1. (Deweese & Osheroff, 2009, Nitiss, 2009, Pommier, 2009).

A topoisomerase 2 parece desempenhar um papel fundamental na estruturação e condensação dos cromossomos, bem como na sua separação durante a divisão celular. Na segregação cromossômica a topoisomerase 2 é importante na separação dos segmentos catenados que se formam normalmente durante a desagregação das cromátides, sendo que estudos recentes em células de mamíferos indicam que a atuação dessa topoisomerase seja localizada sobretudo na região do centrômero. Também pode estar envolvida na regulação da tensão nos cinetocoros (Gimenez-Abian & Clarke, 2003, Nitiss, 2009).

Em leveduras, a perda de uma topoisomerase, não bloqueia a replicação ou a transcrição do DNA, mas ambos os processos são fortemente inibidos. Essa influência na transcrição parece ser, sobretudo sobre a RNA polimerase I, já o efeito na RNA polimerase II parece ser menos acentuado (Nitiss, 2009).

5.4.3- Topoisomerase III

A Top3 (subfamília IA) esta presente em todos os genomas eucariotos, no entanto, a sua função não é muito bem conhecida. Estas enzimas possuem um papel importante na manutenção da estabilidade genômica e estudos recentes tem mostrado que topoisomerase III participa na resolução de intermediários provenientes da recombinação durante o reparo de DNA. Sugere-se que seja importante na resolução das junções de Holliday na recombinação cromossômica. Interessantemente esta enzima não é muito ativa no relaxamento do DNA supertorcido, apenas quando este está em fita simples (Corbett & Berger, 2004, Pommier, 2006).

Embora a topoisomerase 3, seja dispensável para o crescimento em *S. cerevisiae*, na sua ausência, as células crescem lentamente e apresentam níveis elevados de recombinação mitótica e são deficientes na esporulação, devido a defeitos na recombinação mitótica. Por outro lado, a é exigida em *Saccharomyces pombe* para manter a divisão celular.

Eucariotos também contêm duas isoformas de topoisomerase III. Em ratos, a isoforma topoisomerase III é requerida inicialmente durante a embriogênese e pode contribuir para as quebras de pré ligações durante a replicação do DNA celular. Embora ainda não seja claro o papel da topoisomerase III de mamíferos, evidências preliminares indicam que o topoisomerase III β de *Drosophila* pode não ser essencial para a viabilidade das células ou desenvolvimento (Corbett & Berger, 2004, Pommier, 2006).

5.5- Topoisomerasas: enzimas alvo no desenvolvimento de fármacos com aplicação na terapia anticâncer

Novas moléculas alvo estão sendo constantemente investigadas para serem empregadas no tratamento contra o câncer. Neste cenário, as topoisomerasas são atualmente muito estudadas, pois formam ligação covalente da enzima com o DNA, estabelecendo um complexo, onde são criadas quebras na molécula de DNA. Quando estas quebras na cadeia são estabelecidas formam-se intermediários que são potencialmente danosos para o metabolismo celular, que afetam a informação contida na molécula de DNA. Assim, moléculas que interagem com topoisomerasas, podem tornar-se moléculas alvo para o desenvolvimento de fármacos que possam inibir estas enzimas, podendo ser empregados em tratamentos anticâncer. Obviamente o uso desses fármacos pode resultar em diversos efeitos colaterais, por isso é necessário o aperfeiçoamento das moléculas já existentes e o desenvolvimento de novas moléculas com este potencial, maximizando sua eficácia e reduzindo os efeitos danosos.

5.5.1- Mecanismos de ação de inibidores de topoisomerasas

De modo geral, as drogas atuam inibindo a atividade das topoisomerasas. Alguns inibidores são específicos para cada tipo de topoisomerase, podendo ser utilizados também na elucidação do funcionamento dessas enzimas e dos mecanismos tóxicos de outros compostos. Ainda não foram relatados inibidores de Top3 (Pommier, 2006, Pommier, 2009).

Os inibidores de topoisomerasas podem ser divididos em dois grandes grupos: os poisons e os inibidores catalíticos como será visto a seguir. Também será discutido o

mecanismo e os efeitos dos inibidores de topoisomerases empregados neste estudo. Vários compostos utilizados clinicamente em certos tipos de tumores possuem ação inibidora nesta classe de enzima, como doxorubicina, etoposídeo, merbarone, fluoroquinolonas e diversos outros (Burden & Osheroff, 1998, Boos & Stopper, 2000, Pommier, 2006).

5.5.1.1- Estabilizadores do complexo DNA – topoisomerases (“venenos de topoisomerase”).)

A primeira classe inclui os compostos mais ativos clinicamente que aumentam a ocorrência do complexo DNA–Topoisomerase, de maneira a estabilizar este complexo e aumentar a ocorrência de quebras no DNA, estes são denominados de “venenos de topoisomerase”. Esses compostos rapidamente levam a formação de danos no DNA, pelo aumento de quebras. Possuem, desta forma, diversos efeitos na fisiologia celular, afetando a replicação, inibindo a transcrição e levando a mutagênese e morte celular. Ainda podem ser divididos em intercalantes e não intercalantes (Pommier, 2006, Nitiss, 2009, Pommier, 2009).

Genericamente, pode-se dizer que os inibidores do tipo “veneno de topoisomerase” e com ação intercalante podem se intercalar entre as bases da cadeia nucleotídica de maneira a alterar a geometria da ligação das topoisomerases com o DNA, afetando na religação que é requerida para ocorrer entre as extremidades que foram clivadas pela enzima. Assim, a extremidade livre do DNA e a extremidade que está associada a topoisomerase (o complexo DNA–topoisomerase) permanece por mais tempo. Este mecanismo pode também ser denominado de inibição interfacial. (Pommier, 2006, Pommier, 2009)Esse efeito resulta no aumento de quebras nas moléculas de DNA. Enquanto que os não intercalantes atuam por meio de interações com a própria topoisomerase sem interagir com o DNA (Pommier, 2006, Nitiss, 2009, Pommier, 2009, Leon, *et al.*, 2010) (Fig.2).

Um dos principais venenos de topoisomerases que é amplamente utilizada na quimioterapia de tumores é a doxorubicina (DOX) esta é um exemplo de droga que age sobre a molécula de DNA.

A doxorubicina é largamente utilizada na clínica, principalmente para o tratamento de câncer de mama e outros tumores sólidos. Foi uma das primeiras antraciclinas isoladas no decorrer da década de 60, a partir de *Streptomyces peucetius* e

é classicamente conhecida por sua ação inibitória sobre Top2, o que impede que essa proteína religue as fitas de DNA, causando quebras duplas no DNA. Embora sua atividade seja derivada principalmente da inibição da topoisomerase II (Gewirtz, 1999), outros efeitos ligados à indução de radicais livres, à sua capacidade de alquilar diretamente o DNA ou de induzir a formação de pontes entre as duas cadeias de DNA. Essa antraciclina pode também apresentar um papel importante em relação à sua atividade antitumoral, bem como aos importantes efeitos secundários ligados a esta classe de medicamentos que limitam a sua utilização clínica (Minotti, *et al.*, 2004, Cutts, *et al.*, 2005, Bedard & Desmedt, 2010).

A apoptose induzida pela DOX, pode estar relacionada com a ativação da p53, uma proteína supressora tumoral, que induz a transcrição do gene WAF1/CIP1, que codifica a proteína p21, inibidora de algumas quinases responsáveis pela regulação do ciclo celular. Essa ativação pode acarretar primeiramente, parada no crescimento celular, possibilitando a reparação de danos no DNA (Minotti, *et al.*, 2004).

5.5.1.2- Inibidores catalíticos

A outra classe é de compostos que inibem a atividade catalítica dessas enzimas, impedindo que a topoisomerase forme o complexo DNA–enzima que pode ocorrer por dois mecanismos: seja por inibir a ligação da enzima com o DNA ou por impedir que a topoisomerase clive o DNA. Desta forma, ocorre a redução da formação de quebras na molécula de DNA. Estes compostos que inibem a atividade essencial da enzima são chamados de “inibidores catalíticos”(Fig 2). De modo geral, possuem pouco efeito antitumoral, sendo mais utilizados na atenuação do efeito de outros compostos (Pommier 2006; Pommier, 2009).

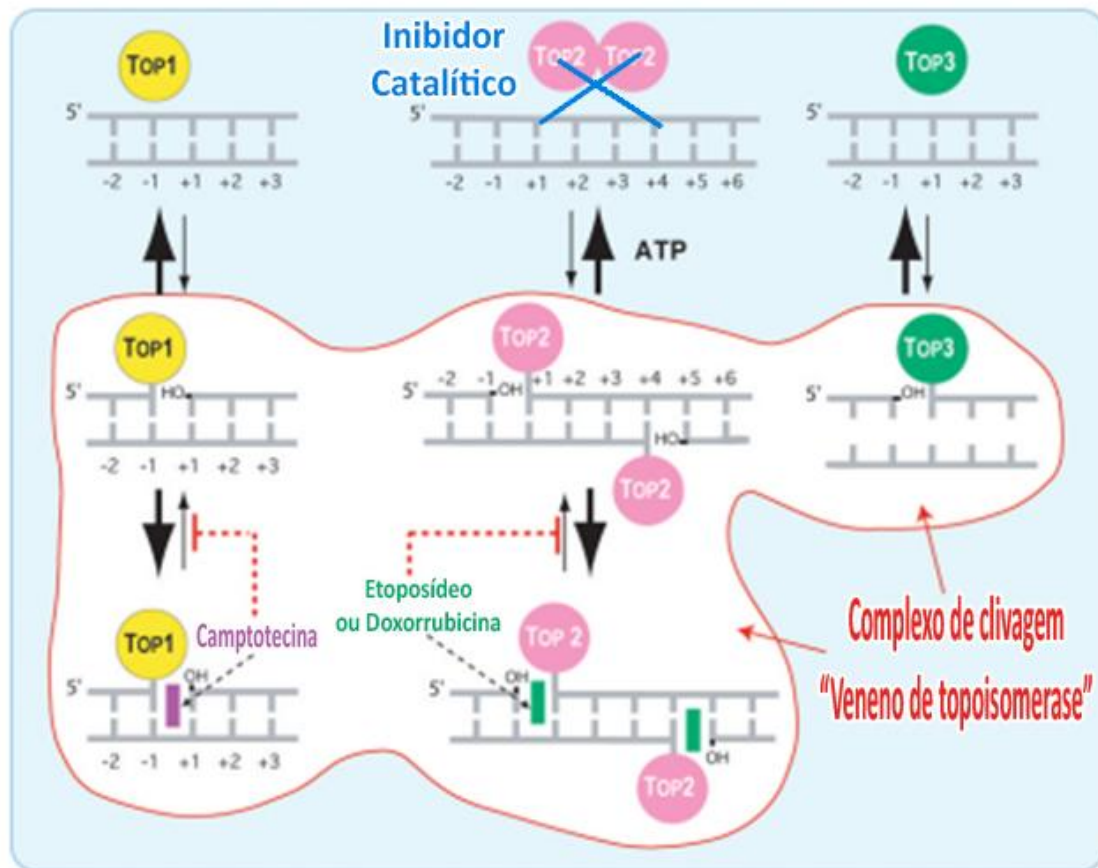


Figura 2. Esquema dos mecanismos de ação de inibidores catalíticos e “venenos de topoisomerase”. Através deste esquema é mostrada a ação de “venenos de topoisomerase” através da estabilização do complexo de clivagem por inibidores conhecidos. Também é apresentada a ação de inibidores catalíticos de topoisomerase que se ligam a essa enzima, não permitindo a formação de quebras no DNA. (Adaptada de Pommier, 2009).

5.6- Topoisomerases, ciclo celular e apoptose

As topoisomerases, induzem quebras transitórias no DNA e desta maneira, podem atuar como toxinas provocando quebras na molécula do DNA, que se não forem devidamente reparadas podem levar a mutações e morte celular por apoptose (Nitiss, 2009).

Os passos chaves no andamento do ciclo celular são monitorados pelos chamados pontos de checagem (checkpoints), que garantem sua integridade. Estudos indicam que as topoisomerases influenciam no ciclo celular. A Topoisomerase II por ter influência na replicação e na segregação cromossômica participa desse monitoramento, pela interação com outras proteínas de pontos de checagem. Inibidores catalíticos como ICRF – 187 e 193 inibem a Topoisomerase II provocando um atraso no ciclo celular. Alguns inibidores do tipo *poison* como etoposídeo e doxorrubicina provocam acúmulo

de quebras fitas duplas, induzindo parada na fase S, parada no ciclo celular em G2/M, podendo ainda resultar em apoptose via p53 e ativação de caspases em diversos tipos celulares (Pommier, 2006, Nitiss, 2009, Bower, *et al.*, 2010).

Inibidores de topoisomerases induzem o aumento de apoptose, como inibidores de topoisomerase 1 que ativam vários efetores de apoptose como BAX e a via extrínseca de apoptose, como FAS e caspase 6 (Nitiss, 2009, Karki, *et al.*, 2010).

Desta maneira, inibidores de topoisomerases atualmente são estudados com potencial emprego em terapias antitumorais, exemplos de novas moléculas com essa ação são o veroloxina, ciprofloxacina (Bower, *et al.*, 2010, Sciandrello, *et al.*, 2010, Walsby, *et al.*, 2011).

6- Ensaio com células de mamíferos

6.1 - Células V79

Os ensaios de mutagênese empregando células de mamíferos em cultura datam de 1968 e as primeiras linhagens celulares utilizadas para esse propósito foram os fibroblastos de pulmão de hamster chinês (Fig. 3), conhecida como V79, e as células de ovário de hamster chinês, as CHO (Bradley, *et al.*, 1981).

As células V79 possuem interessantes propriedades para ensaios de toxicologia genética: fácil cultivo e manutenção; crescimento rápido e curto período de adaptação; tempo de geração entre 12 e 16 horas e capacidade de iniciar um rápido crescimento exponencial a partir um pequeno inóculo. Além disso, possuem uma elevada eficiência de clonagem, em torno de 75-95%, pertencem ao gênero masculino e apresentam cariótipo estável (22 ± 1) (Bradley, *et al.*, 1981). Essas células recuperam-se rapidamente após estoque em nitrogênio líquido, o que permite criopreservação sem afetar suas características, e possuem uma baixa frequência de mutação espontânea (Bradley, *et al.*, 1981).

De tal forma, o emprego das células V79 em estudos de genotoxicidade é indiscutível. O ensaio de micronúcleo é empregado para avaliar quebras cromossômicas e essas células também são a primeira escolha para o teste de aberrações cromossômicas

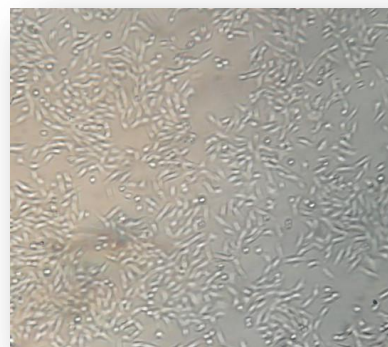


Figura 3. Micrografia óptica de células V79 em cultura.

e troca de cromátides irmãs (Kalweit, *et al.*, 1999, von der Hude, *et al.*, 2000, Osada, *et al.*, 2005).

Os elementos básicos de estrutura e reparação de DNA nas células V79 são similares, mas não idênticos, aos de células humanas. De tal maneira que as consequências da interação química de xenobióticos com o DNA, seja de células humanas, ou seja, de células V79 são similares. Portanto, os resultados obtidos nessa linhagem são extremamente relevantes para humanos, sendo inclusive mais importantes que a extrapolação dos dados obtidos em procariotos (Bradley, *et al.*, 1981).

As células V79 têm sido amplamente empregadas em estudos de diversas áreas, como estresse oxidativo (Shin, *et al.*, 2008), mutagênese e reparação de DNA (Smart, *et al.*, 2008), mecanismos da morte celular programada (Zhang, *et al.*, 2008) e metabolismo (Yamada, *et al.*, 2008).

6.2- Teste de micronúcleos

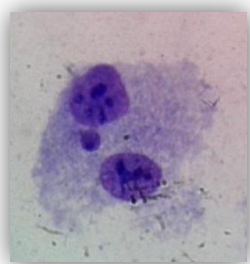


Figura 4. Fotografia mostrando micronúcleo em célula V79

As anormalidades na estrutura do cromossomo são uma consequência direta do dano em nível de DNA. A perda de cromossomos e os erros de segregação são eventos importantes na carcinogênese, causados principalmente por defeitos na formação do fuso, centrômero e alterações na condensação da cromatina antes da metáfase (Fenech, 2000). O ensaio de micronúcleo é hoje um dos testes citogenéticos *in vivo* mais bem estabelecidos, com validação internacional e aplicável a qualquer população celular nucleada (Fenech, 2000).

As quebras cromossômicas que não possuem centrômero não podem ligar-se às fibras cinetocóricas e conseqüentemente, não podem migrar para os pólos opostos da célula juntamente com os demais cromossomos durante a anáfase. Na telófase, tanto da mitose quanto meiose, a membrana nuclear é refeita ao redor do conjunto de cromossomos. Os fragmentos acêntricos ou até mesmo um cromossomo inteiro que não estava ligado ao fuso mitótico é incapaz de integrar-se aos novos núcleos (Fig. 4). Em razão disso, esses fragmentos formam um pequeno núcleo individual, denominado micronúcleo, o qual é detectado em células interfásicas como um pequeno corpúsculo

arredondado de cromatina, separado do núcleo principal (Figura 5) (Fenech, 2000, Fenech, 2006, Fenech, 2007).

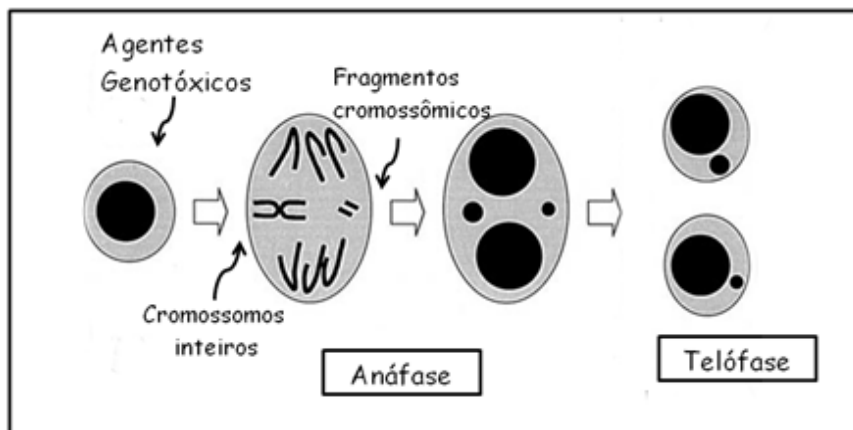


Figura 5. Esquema mostrando o processo de formação do micronúcleo. Adaptada de Fenech, (2000).

O micronúcleo constitui um índice de quebras cromossômicas permanentes e perda cromossomal que pode ser detectado em células que tenham completado ao menos uma divisão celular, sendo desejável a avaliação no estágio de células binucleadas (Fenech, 2000). O teste de micronúcleos detecta mutagênese cromossômica do tipo clastogênese, aneugênese, danos no fuso mitótico, aberrações numéricas e cromossômicas. O micronúcleo aparece pela primeira vez no final da primeira divisão mitótica, após clastogênese ou aneugênese, porém micronúcleos adicionais podem se formar nas divisões seguintes. Em razão disso, as células precisam ter passado por um ciclo mitótico (Fenech, 2000, Fenech, 2006, Fenech, 2007).

Para a execução da técnica, a população celular deve dividir-se e a cinética dessa divisão celular deve ser bem estabelecida. Uma das mais conhecidas é o teste de micronúcleo com bloqueio na citocinese. Nessa variação do teste, as células que completaram uma divisão nuclear são tratadas com citocalasina B, um inibidor da polimerização da actina, necessária para formação dos microfilamentos que constriem o citoplasma entre os núcleos filhos durante a citocinese, permitindo que as células em divisão sejam rapidamente identificadas pelo aspecto binucleado (Fenech, 2000). O uso da citocalasina B possibilita o acúmulo das células em divisão no estágio binucleado na

população, independente da sincronização e proporção de células em divisão (Fenech, 2006).

Alguns estudos demonstram a utilização deste ensaio para verificação da ação intercalante de alguns compostos, por exposição simultânea das células a bleomicina e ao composto que está sendo analisado, desta forma, se o composto for intercalante há uma formação de micronúcleos, pois a bleomicina muda a conformação do DNA de maneira a facilitar a intercalação de outros agentes (Snyder & Streckowski, 1999). Os inibidores de topoisomerasas também têm sido identificados e caracterizados empregando o teste de micronúcleos. Os inibidores do tipo “veneno de topoisomerase” aumentam a ocorrência de quebras no DNA, conseqüentemente a frequência de micronúcleos, assim esses inibidores são detectados pelo aumento da clastogenicidade no DNA. Entretanto, os inibidores catalíticos não promovem esse aumento nas quebras de DNA, dessa forma impedem a formação do complexo de clivagem reduzindo a formação das quebras dos “venenos” quando expostos em conjunto. Desta forma, realizando exposições simultâneas das células a substância teste e inibidores de ação conhecida, pode-se inferir e caracterizar a ação da substância desconhecida, como inibidora catalítica ou veneno se aumenta ou reduz a frequência de micronúcleos, respectivamente, que são originados no co-tratamento (Snyder & Streckowski, 1999, Snyder & Diehl, 2000, Snyder & Gillies, 2003, Michael McClain, *et al.*, 2006).

7. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 6) é um fungo unicelular com ciclo eucarioto típico e completo e tem sido amplamente estudada, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas biomédicas em razão da sua simplicidade e similaridade genética, bioquímica e funcional com mamíferos em vários aspectos. Dessa maneira, esse organismo é um modelo útil para o melhor entendimento de diversas funções biológicas, principalmente na biologia do câncer, estudos de genética toxicológica e doenças humanas (Altmann & Trachsel, 1994, Foury, 1997, Lafon, *et al.*, 2007, McCue & Phang, 2008, Miller-

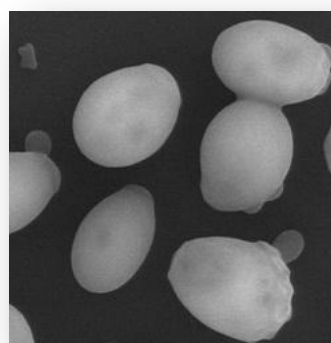


Figura 6. Microscopia eletrônica mostrando células individuais da levedura *Saccharomyces cerevisiae* – fonte : Universidade de Leicester.

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

Algumas das propriedades que fazem a levedura particularmente apropriada para estudos biológicos incluem o seu rápido crescimento, segurança, o fato de possuir um sistema genético bem definido e mais significativamente, o conhecimento da seqüência completa do seu genoma. *S.cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a possuir o genoma completamente seqüenciado e depositado em bases de dados especializadas (como <http://www.yeastgenome.org>) e também existem ferramentas moleculares apropriadas para manipulação gênica e estudos de expressão, como o transcriptoma, proteoma, metaboloma, lipidoma e interactoma (Parsons, *et al.*, 2003, Pena-Castillo & Hughes, 2007, Ejsing, *et al.*, 2009, Gibson & Goldberg, 2009).

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

relação estrutura-atividade de proteínas, incluindo mutagênese e reparação (Klinner & Schafer, 2004, Le Meur & Gentleman, 2008, Schoner, *et al.*, 2008).

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

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

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



OBJETIVOS

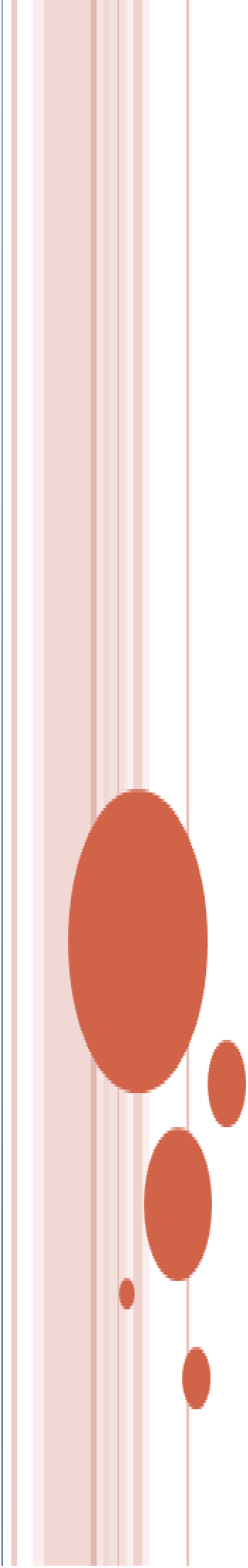
OBJETIVOS

Objetivo geral

- A proposta desse trabalho é ampliar os conhecimentos a respeito da toxicidade do ditelureto de difenila (DTDF), investigando o tipo de morte celular provocada por esta molécula (apoptose/necrose), sua influência no ciclo celular e a possível interação com as DNA topoisomerases.

Objetivos específicos

- Avaliar pelo teste de micronúcleos a possível ação intercalante do DTDF.
- Investigar a interação do DTDF com DNA topoisomerases I e/ou II pelo teste de micronúcleos com exposição simultânea das células V79 ao composto organotelurado e a diferentes inibidores específicos de topoisomerases, visando à caracterização dessa molécula como inibidor do tipo “veneno” ou inibidor catalítico.
- Verificar o efeito do DTDF na progressão do ciclo celular por citometria de fluxo
- Avaliar a indução de apoptose e necrose pelo DTDF pelo método da coloração diferencial de laranja de acridina e brometo de etídeo. Confirmar a ocorrência de apoptose pela determinação da atividade das enzimas caspases 3/7.
- Avaliar a possível interação com enzimas topoisomerases 1 e 3 utilizando linhagens da levedura *S. cerevisiae* deficientes nessas enzimas ($\Delta top1$, $\Delta top3$ e $\Delta top1\Delta top3$).



**CAPÍTULO I- DIPHENYL
DITELLURIDE-INDUCED CELL
CYCLE ARREST AND APOPTOSIS: A
POSSIBLE RELATION WITH
TOPOISOMERASE INHIBITION**

DIPHENYL DITELLURIDE-INDUCED CELL CYCLE ARREST AND APOPTOSIS: A POSSIBLE RELATION WITH TOPOISOMERASE INHIBITION

Patrícia Mendes Jorge¹, Iuri Marques de Oliveira¹, Eduardo Fillipi-Chiela¹, Fabiana Horn¹, Renato Moreira Rosa², Temenouga Nikolova Guecheva¹ and João Antonio Pêgas Henriques^{1,3*}

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

² Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil.

³ Instituto de Biotecnologia, Departamento de Ciências Biomédicas Universidade de Caxias do Sul – UCS Caxias do Sul – RS, Brazil.

*Corresponding author

Prof. João Antonio Pêgas Henriques

Departamento de Biofísica- Prédio 43422- Laboratório 210

Campus do Vale – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 33166069

Fax: +55 5133167003

E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

Abstract

The diphenyl ditelluride (DPDT) is a prototype for the development of new biologically active molecules. In previous studies, this organotelluride has shown an elevated cytotoxicity in lung fibroblast cell line derived from Chinese hamster (V79 cells), but the mechanisms for reduction of cell viability still remain unknown. DPDT has shown mutagenic properties by induction of frameshift mutation in bacterium *Salmonella typhimurium* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*, as well as an increase of double-strand DNA breaks (DSBs) induction in V79 cells. Therefore in this work was studied the mechanism of DPDT genotoxicity by the evaluation of cell cycle progression and apoptosis induction by this compound in V79 cells. Significant decrease of cell viability following DPDT treatment was observed by MTT assay. Morphological analysis showed significant elevation in apoptotic and necrotic cells. An increase of caspase 3/7 activity confirms the apoptosis induction. The cell cycle analysis showed an increase of percentage of cells in arrest in S-phase and sub-G1 phase. Yeast strain deficient in Top1p showed higher tolerance to DPDT in relation to the wild type isogenic strain, suggesting that the interaction with this enzyme could be involved in the toxicity of DPDT. The sensitivity to DPDT found in *top3Δ* strain and in the double mutant *top1Δtop3Δ* indicates that Top3p could participate in the repair of DNA lesions induced by the interaction of the compound with Top1p. Our results suggest that the DPDT-induced cell cycle arrest and reduction in cell viability in replicating cells could be attributed to interaction with topoisomerase 1.

Keywords: diphenyl ditelluride, V79 cells, genotoxicity, topoisomerase, apoptosis.

Introduction

Organotellurium (OT) compounds have been pointed out as promising and useful alternatives for numerous synthetic operations in organic synthesis, as seen in the increase of reports on OT chemistry appearing in the literature (Nogueira & Rocha, 2009). In the last few decades, evidence has been accumulating that OT molecules are promising pharmacological agents. Several reports have been published showing immuno-modulatory, antioxidant, anticancer and anti-inflammatory properties of OT compounds (Sailer, *et al.*, 2003, Nogueira, *et al.*, 2004, Friedman, *et al.*, 2009). Despite the growing use of OT compounds in the chemical and biochemical fields, there has been little concern about their toxicity. Inorganic and OT compounds are highly toxic to some organisms (Maciel, *et al.*, 2000, Nogueira, *et al.*, 2001) Thus, risks from occupational and environmental human exposure to these elements may be implied due to this use. Consequently, it is important to improve our understanding about the toxicological properties of organotellurides.

Diphenyl ditelluride (DPDT) (Fig. 1) is a solid, non-volatile, hydrophobic, simple and stable OT compound used as an important and versatile intermediate in organic synthesis (Ba, *et al.*, 2010). It is extremely toxic to rodents, causing marked neurotoxic effects in mice after acute or prolonged exposure (Nogueira, *et al.*, 2001, Borges, *et al.*, 2005, Moretto, *et al.*, 2007, Stangherlin, *et al.*, 2009). DPDT can also be teratogenic, causing various morphologic abnormalities in mice fetuses during development (Roman, *et al.*, 2007). In addition, it produces renal and hepatic toxicity in rodents as well as hematological disorders in humans (Maciel, *et al.*, 2000, Schiar, *et al.*, 2009). In contrast to these toxic effects, studies have demonstrated that DPDT in low concentrations is able to prevent oxidative stress induced by several oxidizing agents (Hassan, *et al.*, 2009).

The toxicology of OT compounds has been studied mainly based on the toxicity observed in animal models, effects in tissues or by the inhibition of cellular growth (Sailer, *et al.*, 2004). However, the underlying mechanism of toxicity of Te compounds leading to cell death has been poorly investigated. Some studies have indicated that OT compounds can induce apoptosis and cell cycle arrest in cancer cells such as human promyelocytic (HL-60) cell line (Sailer, *et al.*, 2003). In this context, data from our laboratory showed that DPDT induced double strands breaks (DSBs) in permanent lung fibroblast cell line derived from Chinese hamster (V79 cells). The observed DSBs formation could indicate the ability of this compound to intercalate into DNA and/or affect topoisomerase activity.

In this sense, the aim of present study was to evaluate DPDT-induced toxicity, effect on cell cycle progression and mechanism of cell death, as well as possible interaction with DNA topoisomerase enzymes. To this end, two different test systems were employed: mammalian V79 cells and yeast *S. cerevisiae*. The DPDT-induced apoptosis/necrosis in V79 cells was evaluated by morphological analysis and caspase 3/7 activity, whereas the cell cycle progression was evaluated by flow cytometry. In addition, the possible interaction with the enzymes topoisomerases I and III was evaluated in *S. cerevisiae* strains proficient and deficient in these proteins.

Materials and Methods

1. Chemicals

DPDT (CAS registry number 32294-60-3) was provided by Dr Antônio Braga, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, Brazil. The chemical purity of DPDT (99.9%) was determined by gas chromatography/high-performance liquid chromatography (Braga, *et al.*, 1994). Yeast extract, bacto-peptone and bacto-agar were

obtained from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), foetal bovine serum (FBS), trypsin – ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), L-glutamine and antibiotics were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). L-histidine, L-threonine, L-methionine, L-tryptophan, L-leucine, L-lysine, nitrogenous bases (adenine and uracil) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). BCA protein assay reagent was purchased from Pierce (Rockford, IL, USA) and caspase 3/7 substrate was purchased from Peptide Institute (Osaka, Japan).

2. Assays in V79 cells

V79 cell culture and treatments. V79 cells were cultured under standard conditions in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.2 mg/ml L-glutamine, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were kept in tissue culture flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air and were harvested by treatment with 0.15% trypsin and 0.08% EDTA in PBS. Cells were seeded (3×10^6 cells) in 5 ml of complete medium in a 25-cm² flask and grown for 2 days up to 60–70% confluence before treatment with the test substance. DPDT was dissolved in DMSO and added to FBS-free medium to reach the different desired concentrations. The final DMSO concentration in the medium never exceeded 0.2%, and the control group was exposed to an equivalent concentration of solvent.

Cytotoxicity evaluation in V79 cells using MTT assay. V79 cells were seeded at 1×10^3 cells/well in DMEM/5% FBS in 96-well plates. They were then exposed to increasing concentrations (1, 5, 10 µg/ml) of the DPDT, for 2h. After the treatment the medium was replaced by drug-free medium with FBS. After, 12h the cell viability was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

(Mosmann, 1983). This assay measures the activity of cellular dehydrogenases (mainly from mitochondria) and, indirectly, the cell viability, even of the spontaneously detached cells in the culture medium. The method is based on the reduction of a tetrazolium bromide salt (MTT [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]). It provides a quantitative measure of the number of metabolically viable cells. The results were expressed as the percentage of cell viability in relation to the control.

Cell cycle analysis. The effects of DPDT on V79 cells cycle phase distribution was assessed using flow cytometry. Cells (3×10^5 cells per well) were cultured in triplicate in 24-well plates. Cells were treated with DPDT (1, 5, 10 μM) for 2h and after that the medium was replaced by drug-free medium with FBS. After 12h, the cells were harvested, fixed with 70% ethanol (in PBS) and stained with PSSI solution (Triton X-100 0.1%, RNase 0.5 mg/mL and Propidium Iodide 6 μM per sample, in PBS). Data acquisition and analysis were performed through flow cytometry using Guava EasyCyte 8HT Flow Cytometer (Millipore Corporation, MA, USA), and data from 10,000 cells were collected for each data file. Cell cycle analysis was performed with Guava Software.

Apoptosis Analysis. Apoptosis was evaluated by morphological analysis and enzymatic caspase 3/7 assay. For both assays, 5×10^5 cells were treated with 1, 5, 10 μM of DPDT for 2h and analyzed for 2, 4, 12 and 24 h.

Morphological analysis was based on (Amarante-Mendes GP, 1998.). After treatment, cells were harvested, centrifuged and resuspended in 20 μl of PBS buffer. A 2 μl aliquot of acridine orange ($100 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) and ethidium bromide ($100 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) were

added in PBS buffer. Cells were analyzed in fluorescence microscope with 600x magnification.

Protocols for conducting the apoptosis analysis by measure the caspase 3/7 activity were described previous by (Bastiani, *et al.*, 2005). The culture medium was removed after treatments; cells were washed with PBS and lysed with Triton X-100 0.2% in PBS for 10 min on ice. After centrifugation at 12 000 rpm for 10 min, protein concentration in cell extracts was estimated using BCA Protein Assay Reagent. The 40 µg aliquot of protein was incubated with 20 µM caspase synthetic substrates in 100 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 0.1 mgml⁻¹ BSA and 10 mM DDT. The substrate tested was Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA. Substrate hydrolysis was monitored for 1.5 h at 370 nm excitation/460 nm emission in a microplate fluorescence reader; substrate hydrolysis was quantified by comparison with a standard curve for MCA substrates. Experiments were performed in triplicate.

3. Assays in yeast

Strains and media for yeast assays. Media, solutions and buffers were prepared as previously described by (Burke, 2000). The relevant genotypes of *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table I. Complete medium [yeast extract, peptone, glucose-D (YPD)] containing 0.5% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose was used for routine growth. Minimal medium (MM) contained 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose and 2% bacto-agar. Synthetic complete (SC) medium consisted of MM supplemented with 2 mg adenine, 2 mg arginine, 5 mg lysine, 1 mg histidine, 2 mg leucine, 2 mg methionine, 2 mg uracil and 2 mg tryptophan per 100 ml. For plates, the medium was solidified with 2% bacto-agar.

Yeast growth. Stationary cultures were obtained by inoculation of an isolated colony in liquid YPD medium and growth for 48 h at 30°C with aeration by shaking. The cultures contained 1–2 x10⁸ cells/ml with 2–3% budding cells. Cells were harvested and washed twice with saline solution. The number of cells with or without buds was determined by counting in a Neubauer chamber.

Cytotoxicity in yeast strains proficient and deficient in topoisomerases. The cytotoxicity of DPDT in yeast strains topoisomerase mutants (*top1Δ* and *top3Δ*) was assayed by incubation of stationary cultures (2 x 10⁸ cells/ml) in phosphate-buffered saline (PBS, 0.067 M, pH 7.0) with different concentrations (0; 10; 100 and 1000 μM) of the compound in a rotary shaker at 30°C for 2 h. After treatment, cells were harvested by centrifugation at 12 000 x g for 1 min, washed twice with PBS, counted, diluted and plated on solid YPD. Plates were incubated at 30°C for 3–5 days before counting.

Results

Cytotoxic effects in V79 cells

In order to evaluate the cytotoxicity of DPDT in V79 cells, subconfluent cultures of cells were incubated with various concentrations of the compound (0; 1; 5; 10 μM) for a period of 24 h. The results of cell viability using the MTT assay are seen in Fig. 2. Cells treated with DPDT showed significant reduction in cell viability at all concentrations tested when compared to control.

Effect of DPDT on the cell cycle distribution

The analysis of the cell cycle profile of V79 cells treated with DPDT (5 μ M) showed that the fraction of cells in S-phase was significantly increased in treated cells as compared to control, whereas the fraction of G₁ phase cells was decreased (Fig. 3A). We also found significant increase in the percentage of sub-G₁ cells after treatment at a higher concentration (10 μ M) used, which is considered to indicate the proportion of apoptotic cells over total (Fig. 3B).

Apoptosis Induction

To confirm if the cell death induction by DPDT can be related to apoptosis induction we applied the morphological analysis using acridine orange and ethidium bromide staining. This analysis showed an increase of apoptotic cells starting at 2h for the higher concentrations used (5 μ M and 10 μ M). We also measured the caspase 3/7 activation and further performed a morphological analysis (after different treatment times). Our results showed that DPDT treatment induced apoptosis and necrosis (Fig. 4 and Table II). Indeed, apoptosis induction was observed after only 4 h of treatment with the OT compound, and the highest level of activation of the enzyme was in 12h (Table II and Fig. 4). The induction of necrosis was observed starting from 4 h treatment at the highest concentration used (10 μ M) (Table II).

Relationship with DNA topoisomerase enzymes

The survival data in yeast showed that the yeast single mutant *top1* Δ was more tolerant to the DPDT exposure in relation to the wild type (WT) isogenic strain, whereas the *top3* Δ single mutant was more sensitive. The double mutant *top1* Δ *top3* Δ showed

increased resistance to DPDT as compared to WT, which is similar to that of *top1Δ* mutant (Fig. 5).

Discussion

MTT assay was employed to evaluate the concentration range of DPDT induced cytotoxicity in V79 cells. As expected, the cytotoxic threshold of DPDT was consistent with the results obtained by Degrandi et al.(2010), that showed the toxicity of the compound in V79 cells. Recently, significant decrease in cell viability was observed in human colon carcinoma (HT-29) treated at concentration range of 62.5–1000 μ M DPDT, and heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2) cells, in MTT and luminescence assays (Vij & Hardej, 2012).

In the present study, the mechanism of cell death upon exposure to DPDT was investigated by evaluation of apoptosis and/or necrosis induction. For this, we applied the enzymatic morphological analysis that showed an increase of apoptotic and necrotic cells and dose-dependent induction of apoptosis and necrosis was observed at all time periods studied. In agreement, Sailer et al.(2003) demonstrated a cell cycle specific (from S- and G2 phase) apoptosis induction in HL-60 cells after DPDT exposure. As caspases are important mediators of apoptosis (Lakhani, *et al.*, 2006), we determine apoptosis observed in DPDT treated cells by the luminescence based caspase 3/7 assay. In accordance with expected, an increase in 3/7 caspase activity was observed in all treatment concentrations. The decrease in the caspase activity after treatment at extended time period was accompanied by the increase in the percentage of necrotic cells. Our results are in agreement with the study conducted by Vij and Hardej (2012) that showed an increases in caspase 3/7 and 9 activity in HT-29 and normal human colon (CCD-18Co) cells treated with DPDT (500–1000 μ M). Caspase 3, -6 and -9

activation have also been demonstrated by Abondanza et al. (2008) in HL60 cells when exposed to a novel organotellurium compound RT-04. In addition, the study conducted by Yan et al. (2011) demonstrated the endothelial toxicity of Cd-Te quantum dots, which are a novel bioimaging and drug delivery media, and related apoptosis induction preceded by cytochrome c release and activation of caspase 3 and 9. In contrast, the study conducted by Roy and Hardej (2011) for DPDT treatment in rat hippocampal astrocytes do not demonstrate apoptosis induction in these cells, but only necrosis process. These discrepancies may be due to variation of glutathione (GSH) content in different cell types. Considering the ability of Te to bind to sulfhydryl groups, differences in the GSH levels might be at least partially responsible for the choice of either apoptosis or necrosis induction (Roy & Hardej, 2011).

We also observed an increase the percentage of cells in sub-G₁ phase in cell cycle analysis that is the fraction considered indicative for the proportion of apoptotic cells over total. The cell cycle analysis also showed a significant increase in the fraction of S-phase in the treated cells when compared to control cells. Interestingly, it was found that the organotellurium compound AS101 reduced tumor growth in a dose dependent manner by inducing drag of the cell cycle in T cells in G₂/M phase, and induce apoptosis at the highest concentrations activating the caspases 3 and 9 (Frei, *et al.*, 2007). Moreover, it was described that the compound AS101 may be involved in G₂/M growth arrest and apoptosis induced in multiple myeloma (Naor, *et al.*, 2012). Consistently, DPDT treatment induced a time-dependent increase in the number of apoptotic cells from the S and G₂/M portions of the cell cycle in HL-60 cells (Sailer, *et al.*, 2003). This suggests that DPDT interferes either with DNA replication or with cell division processes.

Chemical compounds with planar topologies are often capable of intercalation between DNA bases (Snyder & Arnone, 2002). Intercalating agent-induced genotoxicity manifests itself primarily as frameshift mutagenicity in bacterial and yeast systems and as clastogenicity in mammalian systems. This affirmation is in agreement with the results reported by Degrandi et al. (2010) showing frameshift mutation induction by DPDT in *S. typhimurium* and *S. cerevisiae* and an increase in the double-strand DNA breaks in V79 cells. In order to determine the possible interaction of DPDT with topoisomerase 1 and 3, we studied the response of *S. cerevisiae* mutants defective in these topoisomerase enzymes to treatment with this OT compound. The results of the survival assays demonstrated that DPDT treatment leads to pronounced tolerance in *top1Δ*. This observation indicates that DPDT could interact with the Top1 enzyme, when present in the cell, inducing DNA lesion responsible for the induced cell death. A key function of topoisomerase I is relaxation of DNA supercoiling ahead of the replication and transcription machinery, and during DNA repair and chromatin remodeling. Inhibitors of topoisomerase I block the second transesterification reaction, which prevents the DNA religation step and stabilizes the cleavage complex with topoisomerase I. Thus, transient reversible topoisomerase I-cleavage complex intermediates can be converted into irreversible DNA lesions upon collision with the DNA replication or transcription machinery. It was shown that the DNA replication fork collision with the drug-stalled topoisomerase I-cleavage complex on the leading strand produces a replication-dependent DNA double-strand end, resulting in so called “replication fork run-off” (Strumberg, *et al.*, 2000). One of the possible causes for the increased resistance to DPDT of yeast strains deficient in Top1p, observed in our study, could be the impossibility to form stable complexes with DNA in the absence of this enzyme. This could prevent the DNA DSBs formation during replication and

consequently to reduce the toxic effect. Such replication induced DSBs trigger DNA damage response signaling, including activation of the protein kinases, γ H2AX phosphorylation and p53 stabilization, activating DNA repair mechanisms or apoptosis induction (Furuta, *et al.*, 2003, Sordet, *et al.*, 2003, Huang, *et al.*, 2010). Consistently, camptotecin, a known inhibitor of topoisomerase I, induced DNA damage that activates checkpoint kinases, and causes S- and G2-phase arrest (Xiao, *et al.*, 2003). Possible inhibition of topoisomerase I by DPDT can explain the cell cycle arrest in S-phase observed in V79 cells.

The absence of DNA topoisomerase 1 in *S. cerevisiae* leads to a temporary delay in the extension of the short DNA chains (Kim & Wang, 1989). This delay in chain elongation is also reflected in the rate of total DNA synthesis in the *top1 Δ* , during the early S-phase (Tomicic & Kaina, 2012). However, if the DPDT promote its toxic effect by interaction with Top1p, the absence of this enzyme in the *top1 Δ* yeast strain could decrease the toxic effect induced by the treatment. This could explain the lower susceptibility of *top1 Δ* mutant in relation to the WT strain observed in our experiment. In contrast, *top3 Δ* mutant was more sensitive to DPDT suggesting involvement of Top3p in repair of DPDT-induced lesions. In yeast *S. cerevisiae* the Top3p is a part of the Sgs1-Top3-Rmi1 complex, which in combined activity with Dna2 participates in resection of DSBs with incompatible ends (Symington & Gautier, 2011). The end resection is initiated by MRX complex and is an essential step of homologous recombination, which is one of the main pathways involved in repair of DPDT-induced DNA damage (Degrandi, *et al.*, 2010). Moreover, the end processing can result in mutagenic deletions or insertions at the break site (Symington & Gautier, 2011), which could explain the induction of frameshift mutation by DPDT (Degrandi, *et al.*, 2010).

The double mutant *top1Δtop3Δ* showed DPDT tolerance similar to that observed in *top1Δ* mutant. This suggests the involvement of Top3p in the repair of specific lesion induced by interaction of DPDT with Top1p that could be DSBs induced by topoisomerase I cleavage complexes during replication. When Top1p is absent, presumably such lesion does not occur and the repair activity requiring the Top3p is dispensable.

Conclusions

The present work demonstrated that DPDT promote a reduction in cell viability by apoptosis induction, confirmed by the increased activity of caspase 3/7, as well as cell cycle arrest in S- phase. These events may possibly be a consequence of putative interaction with topoisomerase I, leading to the formation of stable complexes resulting in DSBs formation, cell cycle arrest and cell death induction.

Funding

This work was supported by Brazilian Agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul - FAPERGS; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência – PRONEX /FAPERGS /CNPq10/0044-3 and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES.

References

Abondanza, T.S., Oliveira, C.R., Barbosa, C.M., Pereira, F.E., Cunha, R.L., Caires, A.C., Comasseto, J.V., Queiroz, M.L., Valadares, M.C., Bincoletto, C., 2008. Bcl-2

expression and apoptosis induction in human HL60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium(IV) compound RT-04. *Food Chem Toxicol* 46, 2540-2545.

Amarante-Mendes GP, B.-W.E., Brunner T, Green DR., 1998. In *Cell: A Laboratory Manual*. in: Spector DL, G.R., L, L. (Eds.). Apoptosis assay. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Ba, L.A., Doring, M., Jamier, V., Jacob, C., 2010. Tellurium: an element with great biological potency and potential. *Organic & Biomolecular Chemistry* 8, 4203-4216.

Bastiani, M., Vidotto, M.C., Horn, F., 2005. An avian pathogenic *Escherichia coli* isolate induces caspase 3/7 activation in J774 macrophages. *FEMS Microbiol Lett* 253, 133-140.

Borges, V.C., Rocha, J.B., Nogueira, C.W., 2005. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. *Toxicology* 215, 191-197.

Braga, A.L., Silveira, C.C., Reckziegel, A., Menezes, P.H., 1994. ChemInform Abstract: Convenient Preparation of Alkynyl Selenides, Sulfides and Tellurides from Terminal Alkynes and Phenylchalcogenyl Halides in the Presence of Copper(I) Iodide. *ChemInform* 25, no-no.

Burke, D., Dawson, D. and Stearns, T. (Ed.), 2000. *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual New York, USA.

Degrandi, T.H., de Oliveira, I.M., d'Almeida, G.S., Garcia, C.R., Villela, I.V., Guecheva, T.N., Rosa, R.M., Henriques, J.A., 2010. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 25, 257-269.

Frei, G.M., Lebenthal, I., Albeck, M., Albeck, A., Sredni, B., 2007. Neutral and positively charged thiols synergize the effect of the immunomodulator AS101 as a growth inhibitor of Jurkat cells, by increasing its uptake. *Biochem Pharmacol* 74, 712-722.

Friedman, M., Bayer, I., Letko, I., Duvdevani, R., Zavaro-Levy, O., Ron, B., Albeck, M., Sredni, B., 2009. Topical treatment for human papillomavirus-associated genital warts in humans with the novel tellurium immunomodulator AS101: assessment of its safety and efficacy. *Br J Dermatol* 160, 403-408.

Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z.Y., Aune, G.J., Redon, C., Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Rogakou, E.P., Celeste, A., Chen, H.T., Nussenzweig, A., Aladjem, M.I., Bonner,

W.M., Pommier, Y., 2003. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 278, 20303-20312.

Hassan, W., Ibrahim, M., Nogueira, C.W., Braga, A.L., Deobald, A.M., Mohammadzai, I.U., Rocha, J.B., 2009. Influence of pH on the reactivity of diphenyl ditelluride with thiols and anti-oxidant potential in rat brain. *Chem Biol Interact* 180, 47-53.

Huang, T.H., Chen, H.C., Chou, S.M., Yang, Y.C., Fan, J.R., Li, T.K., 2010. Cellular processing determinants for the activation of damage signals in response to topoisomerase I-linked DNA breakage. *Cell Res* 20, 1060-1075.

Kim, R.A., Wang, J.C., 1989. Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* 208, 257-267.

Lakhani, S.A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G.A., Jr., Booth, C.J., Mehal, W.Z., Inayat, I., Flavell, R.A., 2006. Caspases 3 and 7: Key Mediators of Mitochondrial Events of Apoptosis. *Science* 311, 847-851.

Maciel, E.N., Bolzan, R.C., Braga, A.L., Rocha, J.B., 2000. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* 14, 310-319.

Moretto, M.B., Boff, B., Franco, J., Posser, T., Roessler, T.M., Souza, D.O., Nogueira, C.W., Wofchuk, S., Rocha, J.B., 2007. (45)Ca(2+) influx in rat brain: effect of diorganylchalcogenides compounds. *Toxicol Sci* 99, 566-571.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

Naor, Y., Hayun, M., Sredni, B., Don, J., 2012. Multiple signal transduction pathways are involved in G(2)/M growth arrest and apoptosis induced by the immunomodulator AS101 in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*.

Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2009. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *PATAI'S Chemistry of Functional Groups*. John Wiley & Sons, Ltd.

Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Perry, M.L., Souza, D.O., da Rocha, J.B., 2001. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res* 906, 157-163.

Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and Organotellurium Compounds: Toxicology and Pharmacology. *Chemical Reviews* 104, 6255-6286.

Roman, S.S., Nava, A., Favero, A.M., Weis, S.N., Zeni, G., Rocha, J.B., Nogueira, C.W., 2007. Diphenyl ditelluride effect on embryo/fetal development in mice: interspecies differences. *Toxicology* 231, 243-249.

Roy, S., Hardej, D., 2011. Tellurium tetrachloride and diphenyl ditelluride cause cytotoxicity in rat hippocampal astrocytes. *Food Chem Toxicol* 49, 2564-2574.

Sailer, B.L., Liles, N., Dickerson, S., Chasteen, T.G., 2003. Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Arch Toxicol* 77, 30-36.

Sailer, B.L., Liles, N., Dickerson, S., Summers, S., Chasteen, T.G., 2004. Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicol In Vitro* 18, 475-482.

Schiar, V.P., Dos Santos, D.B., Paixao, M.W., Nogueira, C.W., Rocha, J.B., Zeni, G., 2009. Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: a possible involvement of reactive oxygen species. *Chem Biol Interact* 177, 28-33.

Snyder, R.D., Arnone, M.R., 2002. Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using the V79 in vitro micronucleus assay. *Mutat Res* 503, 21-35.

Sordet, O., Khan, Q.A., Kohn, K.W., Pommier, Y., 2003. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 3, 271-290.

Stangherlin, E.C., Rocha, J.B., Nogueira, C.W., 2009. Diphenyl ditelluride impairs short-term memory and alters neurochemical parameters in young rats. *Pharmacol Biochem Behav* 91, 430-435.

Strumberg, D., Pilon, A.A., Smith, M., Hickey, R., Malkas, L., Pommier, Y., 2000. Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol Cell Biol* 20, 3977-3987.

Symington, L.S., Gautier, J., 2011. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* 45, 247-271.

Tomicic, M.T., Kaina, B., 2012. Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1835, 11-27.

Vij, P., Hardej, D., 2012. Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non-transformed human colon cells. *Environ Toxicol Pharmacol*.

Xiao, Z., Chen, Z., Gunasekera, A.H., Sowin, T.J., Rosenberg, S.H., Fesik, S., Zhang, H., 2003. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 278, 21767-21773.

Yan, M., Zhang, Y., Xu, K., Fu, T., Qin, H., Zheng, X., 2011. An in vitro study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. *Toxicology* 282, 94-103.

Legends for figures

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

Fig. 2. Dose-dependent cytotoxicity in V79 cells as determined by MTT reduction method (% of negative control). Cells were treated with 1; 5; and 10 μM for 2 h. Negative control (solvent) was included; Data are expressed as mean \pm SD, n= 4. *Data significant in relation to the control group $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ /One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

Fig. 3A. Effect of DPDT treatment on the cell cycle distribution. V79 cells were treated for 2h with 1; 5; and 10 μM . Values are the relative number of cells in the sub- G_1/G_1 , S and G_2/M phases of cell cycle. 3B. Sub- G_1 phase. Each column represents the mean of 4 independent experiments performed in triplicate and the lines indicate the standard error means. Data were analyzed by one way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. *Significantly different from the control group $(P < 0.05)$; ** $(P < 0.01)$; *** $(P < 0.001)$.

Fig. 4. Apoptosis evaluation by caspase 3/7 activation in V79 cells treated with DPDT. The quantity of pMol MCA released per μg of protein after treatment with: (○) negative control; (▲) 1 μM ; (▽) 5 μM ; (◆) 10 μM of DPDT; and (□) positive control. Treatments were performed for: (a) 2 h; (b) 4 h; (c) 12 h; and (d) 24 h. Data are representative of at least three experiments performed in duplicate; the mean \pm standard deviation of V_{max} for each curve is indicated on the right of the curve.

Fig 5. Survival after DPDT treatment of *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient and proficient in topoisomerases 1 and 3. Data are expressed as mean \pm SD, n= 3.

Table I. Yeast strains used in this study

Strains	Relevant genotypes	Source
BY4741 (WT)	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf ^a
<i>top1Δ</i>	BY4741; <i>top1::kanMX4</i>	Euroscarf ^a
<i>top3Δ</i>	BY4741; <i>top3::kanMX4</i>	Euroscarf ^a
<i>top1Δ top3Δ</i>	BY4741, <i>top3:: kanMX4; top1::URA3</i>	This study

^a Obtained from EUROSCARF, Frankfurt, Germany

Table II. Apoptosis and Necrosis evaluation of DPDT in V79 cells by morphological assay

DTDF (μM)	Apoptosis (%) / treatment time			
	2h	4h	12h	24h
Control^a	1.17 ± 0.76	2.00 ± 0.50	4.00 ± 1.32	4.50 ± 0.50
1	1.67 ± 1.04	5.50 ± 1.00*	16.83 ± 3.79***	20.83 ± 3.33***
5	3.83 ± 1.04*	8.83 ± 0.76***	22.00 ± 2.50***	25.50 ± 2.65***
10	4.83 ± 1.53*	9.83 ± 2.25***	27.00 ± 2.29***	29.83 ± 3.21***
	Necrosis (%) / treatment time			
	2h	4h	12h	24h
Control^a	1.33 ± 0.58	2.17 ± 0.76	3.50 ± 1.00	4.00 ± 1.00
1	1.50 ± 0.87	3.67 ± 1.26	11.33 ± 1.04*	12.00 ± 1.80*
5	1.83 ± 0.76	3.83 ± 2.57	15.67 ± 3.75**	28.00 ± 1.50***
10	2.33 ± 0.76	8.17 ± 1.76**	18.33 ± 5.13**	35.17 ± 5.01***

^a Negative control (solvent); Data are expressed as mean ± SD, n= 3. *Data significantly different in relation to the group. **P*<0.05; ** *P*<0.01; *** *P*<0.001/One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

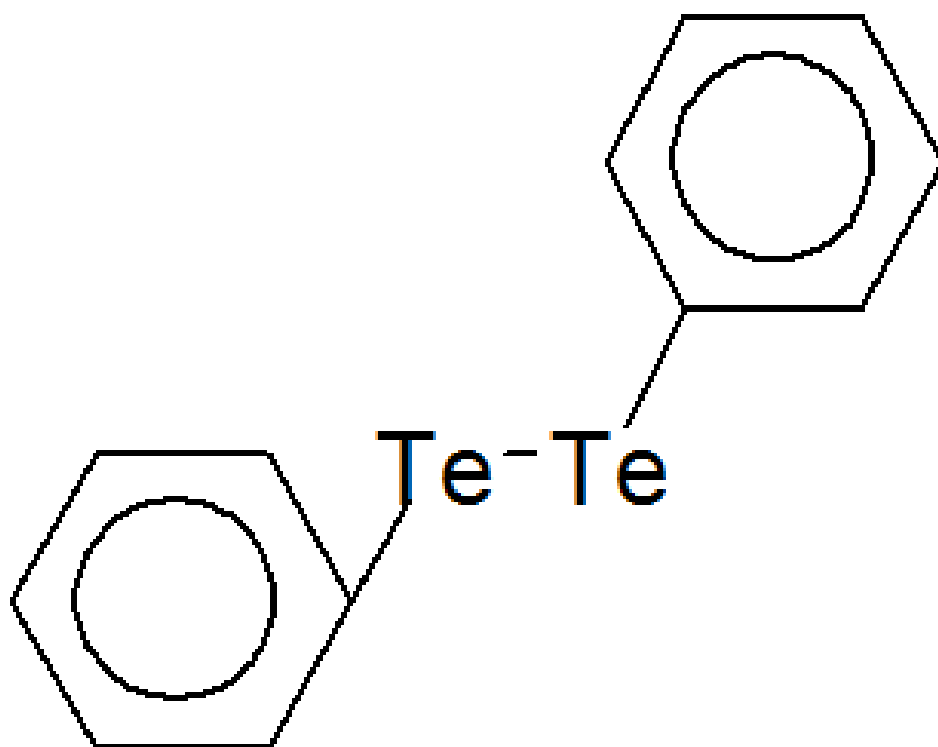


Fig. 1

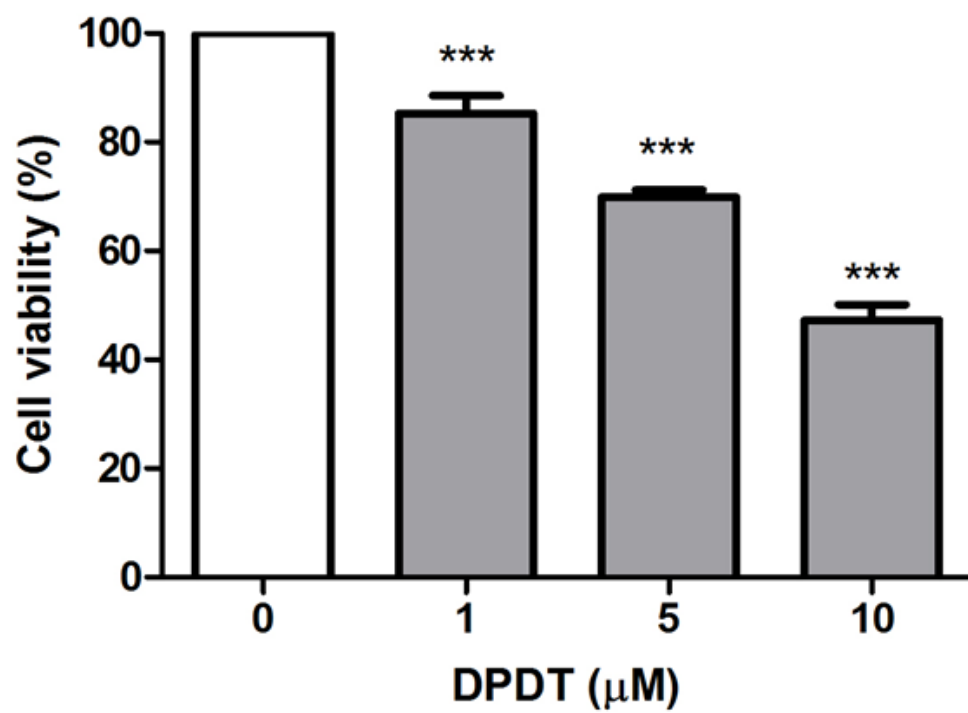
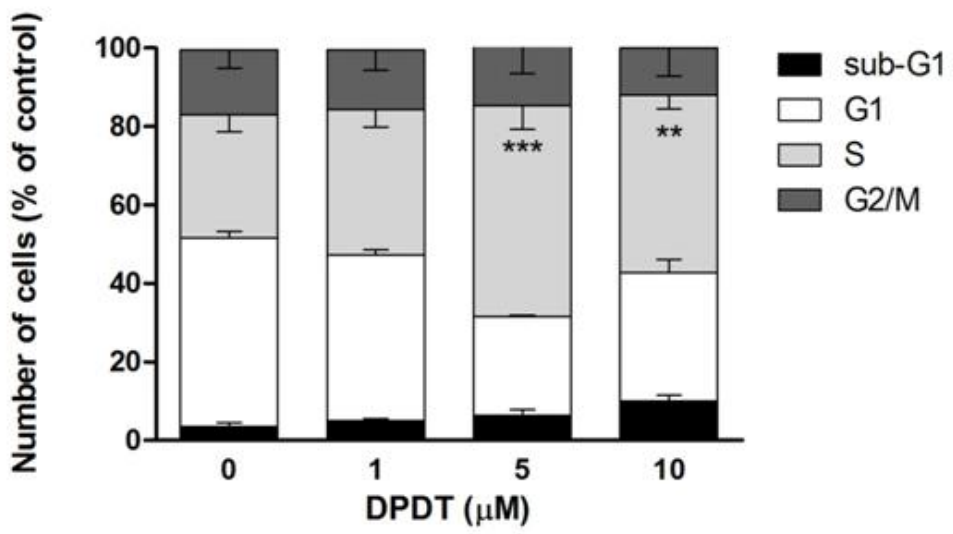


Fig. 2

A.



B.

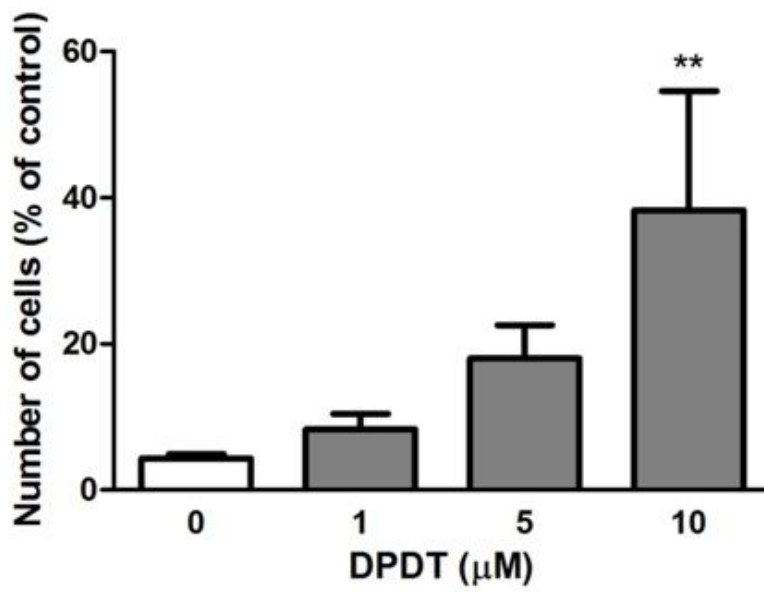


Fig. 3

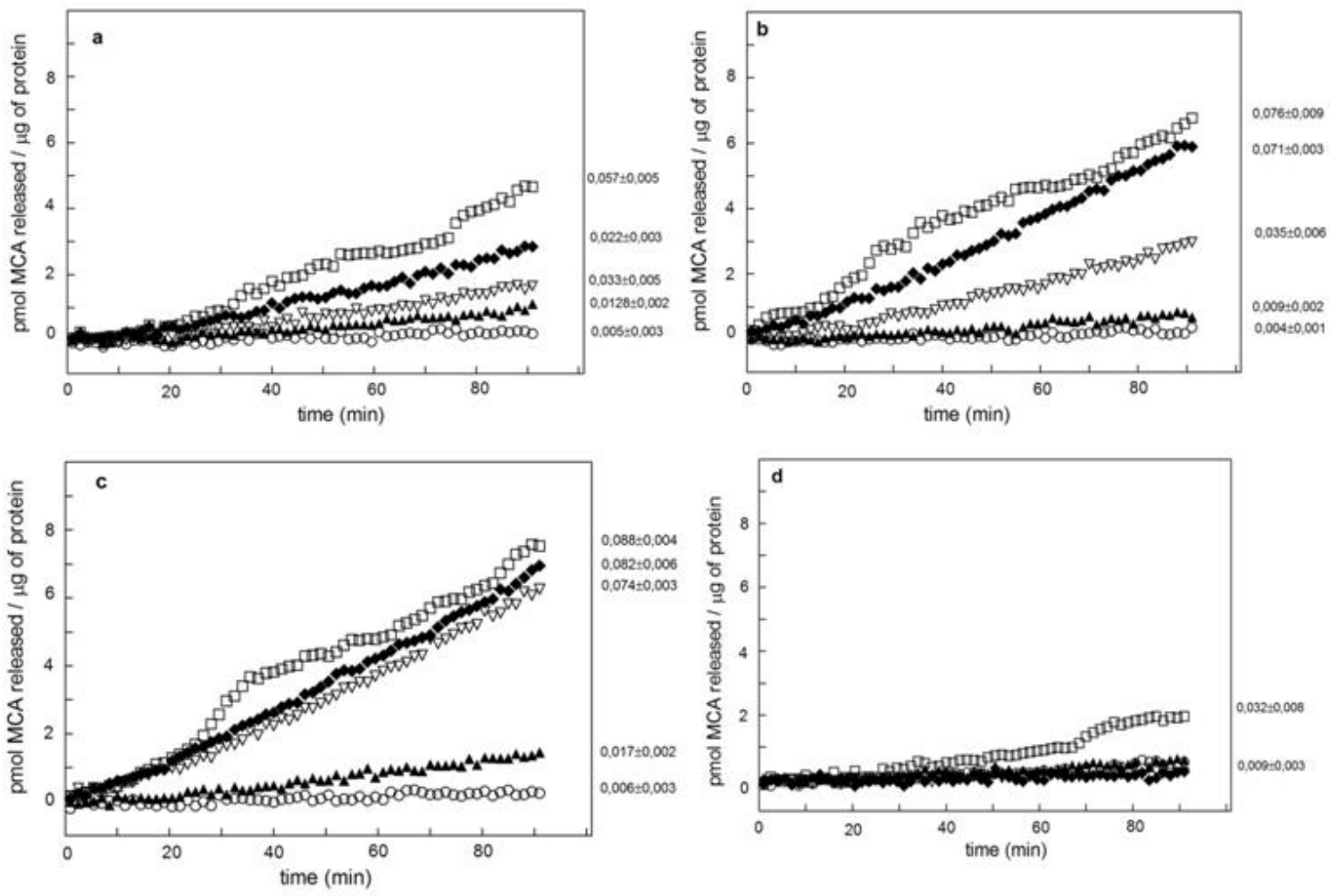


Fig. 4

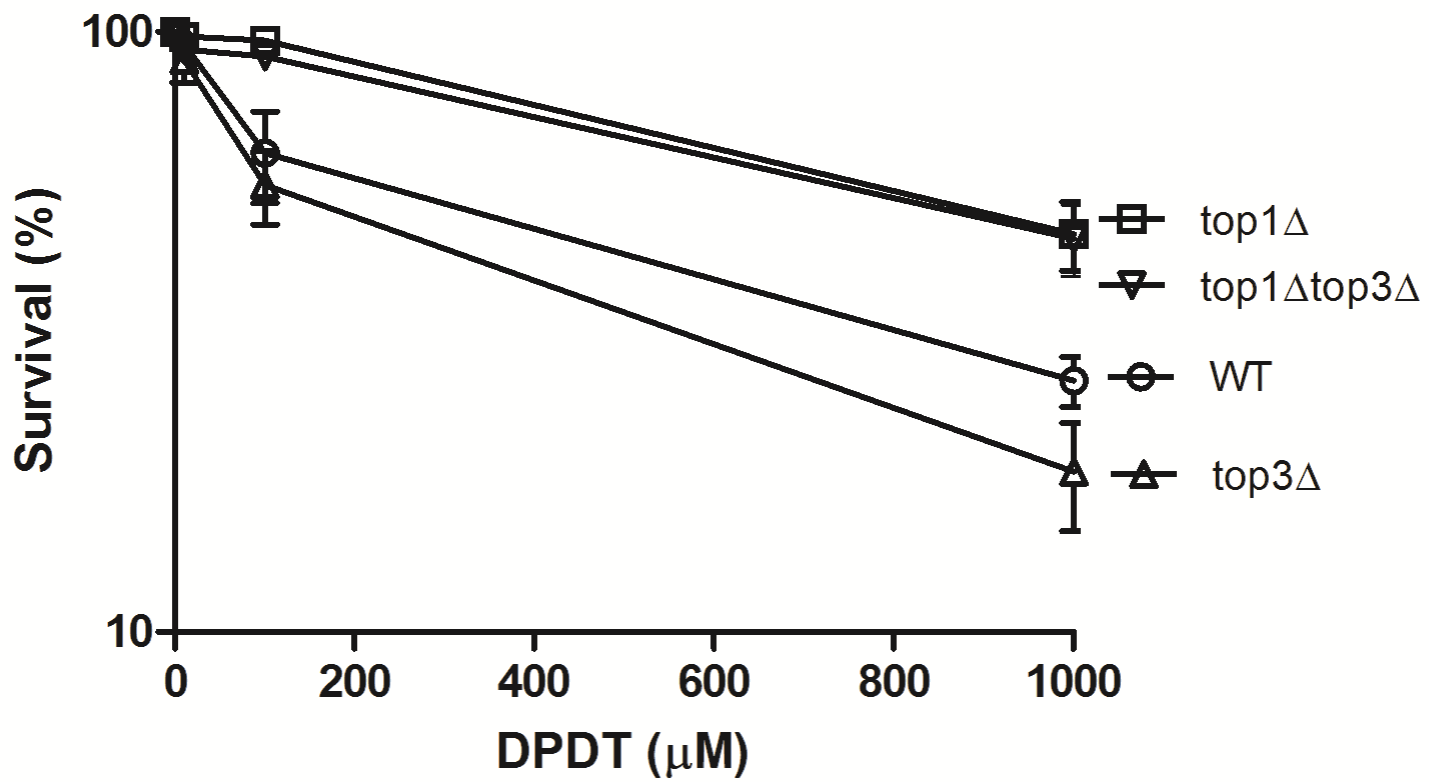
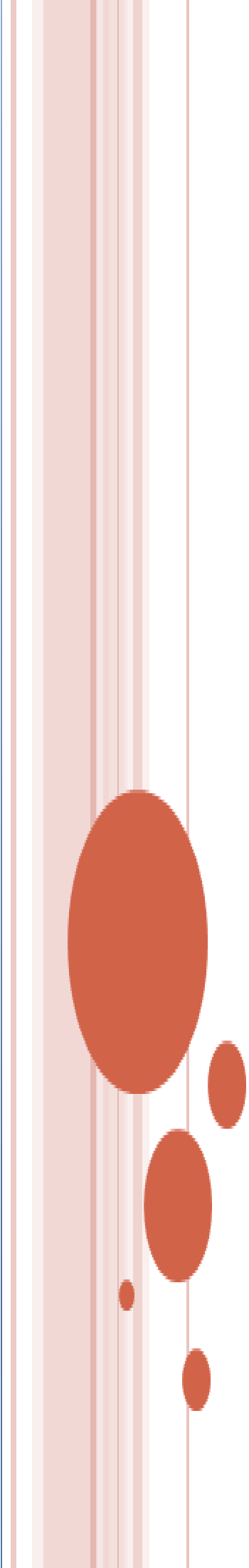


Fig. 5



**CAPÍTULO II- SUPPLEMENTARY
RESULTS**

Supplementary Results for

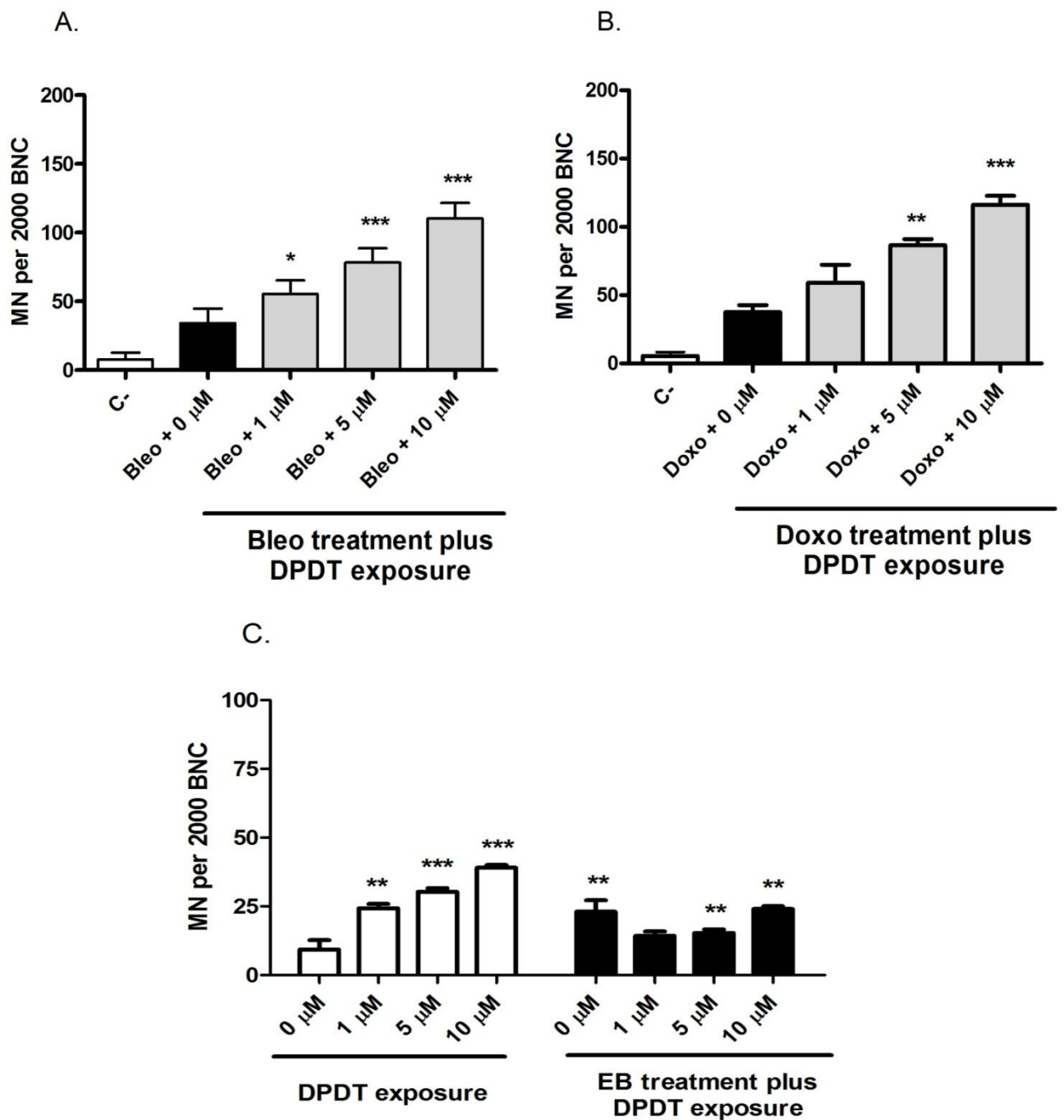
(título da dissertação) **Diphenyl ditelluride-induced cell cycle arrest and apoptosis: a possible relation with topoisomerase inhibition.**

Patrícia Mendes Jorge¹, Iuri Marques de Oliveira¹, Eduardo Fillipi-Chiela¹, Fabiana Horn¹, Renato Moreira Rosa², Temenouga Nikolova Guecheva¹ and João Antonio Pêgas Henriques^{1,3*}.

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

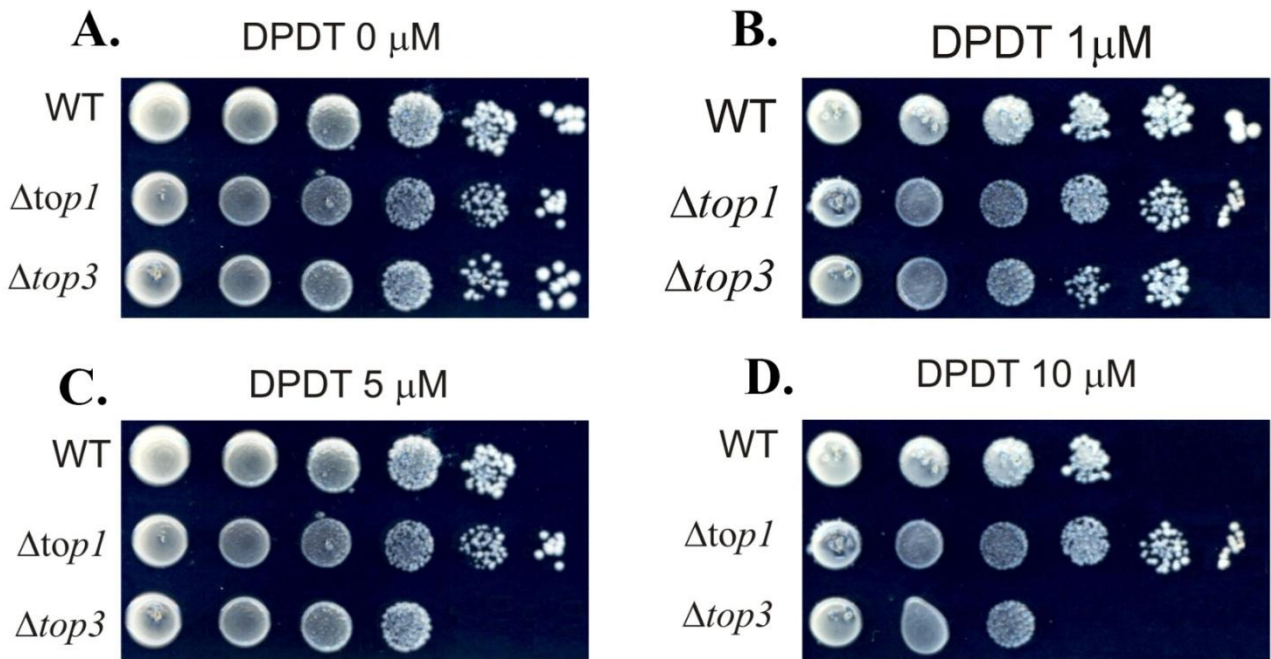
²Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil.

³ Instituto de Biotecnologia, Departamento de Ciências Biomédicas Universidade de Caxias do Sul – UCS Caxias do Sul – RS, Brazil.



Supplementary Figure 1. Induction of micronuclei formation in V79 cells. **A.** Bleomycin amplification assay of DPDT with intercalating agent. **B.** Effect of catalytic topo II poison on the clastogenicity of DPDT. **C.** Effects of catalytic topo II inhibitors on the DPDT, showed this compound as topo II poison. Values are represented as means \pm S.E.M. from up to three independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. *Significantly different from the control group *($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$); ***

($P < 0.001$). The V79 cell-based bleomycin amplification assay was used to determine if the compounds possessed DNA intercalation ability. Thus, the treatment with DPDT plus bleomycin (agent which intercalate to form the DNA double breaks) increased the frequency of MN, indicating an intercalant potential of DPDT. The pretreatment with DPDT do not decrease the formation of MN induced by doxorubicin (which acts as the topoisomerase II poison, preventing religation of the strands of DNA leading to double breaks), suggesting that the DPDT do not acting as catalytic inhibitor of topoisomerase II. The exposure of cells to Ethidium Bromide (EB) plus DPDT decreased the frequency of MN when compared with exposure only to DPDT. Since EB is a catalytic inhibitor, which hampers the breakdown of the strands, this result suggests that the DPDT could act as a topoisomerase II poison, preventing religation of the strands of DNA. In the absence of induction of breaks by inhibiting the enzyme (by EB) DPDT is not capable to induce MN formation.



Supplementary Figure 2. Tolerance of *top1* Δ and *top3* Δ strains to DPDT treatment during respiratory metabolism. Cells were diluted between 10^8 and 10^3 cells/mL, and 10 μ L of each dilution were plated in SC solid medium plus 0 μ M of DPDT (A) 1 μ M (B) 5 μ M (C) or 10 μ M (D). In each square of the grid, WT (BY4741) is shown in the upper row and the other strains are shown in the lower rows. Note that the survival data showed that the yeast single mutant *top1* Δ was more tolerant to the DPDT exposure than the WT strain. On the other hand, the *top3* Δ mutant was more sensitive to DTDT than WT strain.

Methodology

1. *Micronucleus test*

Chinese hamster lung (V79 cells) were grown and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS. The cytochalasin B-blocked *in vitro* micronucleus assay followed standard procedure, as originally reported (Fenech & Morley, 1985, Fenech, 2007). Briefly, chemical treatments were for 3 h in fresh medium, followed by removal of chemical and addition of fresh medium containing 3µg/ml cytochalasin B for approximately 20 h. Cells were harvested with trypsin–EDTA, hypotonically swollen, fixed to glass slides, stained and coverslipped. Slides were examined for relative numbers of binucleate and mononucleate cells in order to assess antiproliferative effects of the treatment. Binucleated cells were examined for the presence of micronuclei (500 from each slide). Independent experiments were conducted for data collection.

2. *Bleomycin amplification assay*

In order to assess the DNA intercalative activity of the compounds used in this study, the bleomycin amplification assay was employed as described previously (Snyder, 1998, Snyder & Streckowski, 1999, Snyder, 2000, Snyder, *et al.*, 2005). Briefly, V79 cells were exposed to 5µg/ml bleomycin sulfate for 2h in the presence or absence of putative intercalating agent. Cells were then processed as above for the *in vitro* micronucleus assay and slides were prepared. Enhancement of the micronucleus-inducing activity of bleomycin by a test article is consistent with a DNA intercalative effect of that test article.

3. *Cell-based assay for detecting topoisomerase inhibition*

In order to determine if the clastogenicity of a particular intercalating agent is due to topo II poisoning, a modification of the *in vitro* micronucleus assay in V79 cells was conducted. Briefly, cells were preincubated for 5–10 min with or without known catalytic inhibitors of topo II (EB) and then for 2h with the putative topo II poison (DPDT). Reduction of clastogenicity (micronucleus formation) by catalytic topo II inhibitors suggests that the clastogenic agent may be a topo II poison. In order to determine if a test compound may be a catalytic topo II inhibitor, its ability to antagonize the clastogenicity of the known topo II poisons, etoposide or DOX, was assessed as above. Reduction of etoposide- or DOX-dependent clastogenicity by the test compound suggests that the intercalating agent may be a catalytic inhibitor of topo II.

4. *Assay in yeast – Drop Test*

With the objective to verify a possible difference in the sensitivity to DPDT among yeast strains, we used wild type (WT) and mutant strains with disruption of gene coding for topoisomerase 1 or 3. Cells were grown at 30°C in a YEL medium until the stationary phase, collected by centrifugation and washed 2x in distilled water. The cell number was determined using a Neubauer chamber. After washing, the cells were diluted between 10^8 and 10^3 cells/ml and aliquots of 10 μ L of each dilution were applied on plates of synthetic medium solidified with agar 2%, containing different concentrations of DPDT (1, 5 and 10 μ M). The plates were incubated at 30° C for 48h. Subsequently the plates were analyzed qualitatively by visual difference in the growth of the colonies (Supplementary Figure 2).

Supplementary references:

Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protocols* 2, 1084-1104.

Fenech, M., Morley, A.A., 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147, 29-36.

Snyder, R.D., 1998. A review and investigation into the mechanistic basis of the genotoxicity of antihistamines. *Mutat Res* 411, 235-248.

Snyder, R.D., 2000. Use of catalytic topoisomerase II inhibitors to probe mechanisms of chemical-induced clastogenicity in Chinese hamster V79 cells. *Environ Mol Mutagen* 35, 13-21.

Snyder, R.D., McNulty, J., Zairov, G., Ewing, D.E., Hendry, L.B., 2005. The influence of N-dialkyl and other cationic substituents on DNA intercalation and genotoxicity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 578, 88-99.

Snyder, R.D., Streckowski, L., 1999. Enhancement of bleomycin-induced micronucleus formation in V79 cells as a rapid and sensitive screen for non-covalent DNA-binding compounds. *Mutat Res* 444, 181-192.



DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O telúrio é encontrado no ambiente nas formas elementar (Te^0), telureto (Te^{2-}), telurito (TeO_3^{2-}), telurato (TeO_4^{2-}) e formas orgânicas sintéticas como ditelureto de dimetila (CH_3TeCH_3) e o ditelureto de difenila (PhTe)₂.

Devido à ampla utilização deste elemento na indústria e na agricultura a exposição ocupacional ao Te pode ocorrer em indivíduos que trabalham na produção destes materiais. Blackadder e Manderson (1975), demonstraram que trabalhadores expostos a vapores de fusão da liga de cobre-telúrio têm experimentado efeitos adversos. Devido ao fato de que produtos contendo telúrio são descartados em aterros sanitários, a exposição humana através do solo e da água provavelmente irá crescer com o aumento da sua utilização. A acumulação de telúrio em plantas ocorre principalmente nos membros do gênero *Allium*, tendo cebola e alho como os principais representantes, portanto a exposição ao telúrio pela ingestão desses vegetais representa uma possibilidade viável (Larner, 1995). Considerando estas informações, é de extrema importância a determinação da toxicidade associada a compostos telurados e o conhecimento dos seus mecanismos, devido à crescente exposição ambiental e ocupacional a estas substâncias.

Embora compostos contendo telúrio sejam geralmente tóxicos, possuem relevantes efeitos biológicos e farmacológicos. Estudos com compostos organotelurados, como teluretos de diarila, mostraram possivelmente possuir atividade mimética de glutathione peroxidase (para revisão, ver Nogueira, *et al.*, 2004). Assim há um grande interesse nos estudos de investigação destes compostos como agentes quimiopreventivos. Este semi-metal, compartilha características químicas únicas com outro calcogênio, o selênio. Neste sentido, de modo similar a compostos

organoselenados, compostos organotelurados têm sido descritos como citotóxicos e capazes de induzir morte celular por apoptose (Sailer, *et al.*, 2003).

A toxicidade do ditelureto de difenila (DTDF) tem sido investigada em vários estudos *in vivo* e *in vitro*, tal como o trabalho realizado por Meotti *et al.*, (2003) em que foi observado o DTDF sendo o composto mais tóxico entre os organocalcogênios em rim e fígado em modelos murinos. Este composto também é considerado um agente teratogênico, pois causa várias anormalidades morfológicas no desenvolvimento de fetos de ratos (Stangherlin, *et al.*, 2005).

Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa com o DTDF indicaram que este composto foi capaz de causar mutação de alteração de quadro de leitura (*frameshift mutation*) na levedura *S.cerevisiae* e na bactéria *S. typhimurium*, e formação de DSBs em células V79, provavelmente indicando um possível potencial intercalante desta molécula (Degrandi, *et al.*, 2010). Assim, decidiu-se investigar os mecanismos de redução da viabilidade celular pela exposição ao DTDF, avaliando o tipo de morte celular (apoptose/necrose), influência na progressão do ciclo celular e a possível inibição de topoisomerasas.

Primeiramente, foi investigada no Capítulo I a citotoxicidade do DTDF pelo ensaio de MTT, sendo observada uma significativa diminuição da viabilidade celular nas concentrações de 1, 5 e 10 μM de maneira dose-dependente (Fig, 2) . Convém salientar que neste contexto, recentemente Roy e Radej (2011), utilizando o mesmo ensaio mostraram que o DTDF diminui a viabilidade celular em uma faixa de concentração de 0,24 - 250 μM em astrócitos de ratos.

Devido à diminuição da viabilidade celular mostrada anteriormente, foi verificada a ocorrência de apoptose e necrose, pela análise morfológica de coloração diferencial com laranja de acridina e brometo de etídeo. Neste ensaio foi observado um

aumento de apoptose a partir do tempo de 2h nas concentrações 5 μ M e 10 μ M e necrose a partir do tempo de 4h na concentração mais alta. Para confirmar se a morte celular das células tratadas com DTDF estava realmente ocorrendo por apoptose, ensaios baseados em luminescência foram utilizados para a detecção da atividade de caspases 3/7. Nossos resultados confirmaram que a apoptose observada nas células tratadas ocorrem com a ativação de caspases 3/7, sendo mostrado um aumento na atividade da enzima em relação ao aumento da concentração nos tempos de 2h, 4h e 12h, e o pico da atividade da enzima ocorrendo no tempo de 12h.

Estudos recentes têm reforçado a potencial habilidade dos compostos organotelurados de induzir apoptose. Sailer et al.,(1998, 2003, 2004) demonstraram a indução de morte celular por apoptose na linhagem de células promielocíticas humanas (HL-60). Abondanza et al. (2008) encontraram em células HL60 expostas ao composto organotelurado (RT-04) a ativação das enzimas caspases -3, -6, e -9 e um aumento na fragmentação do DNA. Similarmente Frei et al.,(2008) encontraram um significativo aumento na forma ativa de caspase -3 em células Jurkat tratadas com o composto telurado AS 101. Interessantemente, a evidência de um mecanismo pró-apoptótico da ação do DTDF foi mostrado pela redução da fosforilação/atividade de Akt em fatias estriais de animais injetados (Heimfarth, *et al.*, 2012). A via de sinalização PI3K-Akt desempenha um papel crítico na regulação da apoptose e do ciclo celular (Chang, *et al.*, 2003). Akt bloqueia a morte celular tanto por incidir sobre a maquinaria de morte celular quanto através da regulação da expressão de genes envolvidos na morte celular e sobrevivência (Koh, *et al.*, 2004). Zhou et al.,(2000) descreveu que a atividade de Akt pode inibir a ativação das caspases-9 e -3 por modificações pós-traducionais de um fator citosólico *downstream* do citocromo c antes da ativação da caspase-9 (Cardone, *et al.*, 1998). Hayun et al., (2006) mostraram que a atividade de AS101 é exercida por meio de

uma diminuição da ativação da Akt, indução da expressão da proteína p21, o aumento da fosforilação da CDK1 inibitória e redução dos níveis de sobrevivência, levando à indução de apoptose em células de mieloma múltiplo. Portanto, a inibição pelo mecanismo PI3K-Akt, o qual foi descrito para os organotelurados DTDF e AS101 pode ser consistente com o observado insulto apoptótico em células V79.

A maioria das abordagens antiproliferativas utilizadas até o momento são destinadas a perturbar a dinâmica do ciclo celular levando a parada do ciclo celular e apoptose (Evan & Vousden, 2001). Assim, neste trabalho nós decidimos avaliar a interação do DTDF no ciclo celular. Nossos resultados mostraram que este composto provocou um aumento na porcentagem de células na fase S do ciclo celular, nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M. Também foi realizada a análise de da porcentagem de células em sub-G1, mostrando uma resposta dose-dependente, assim sendo um indicativo de morte celular, confirmando nossos resultados de apoptose. Estudos realizados com o organotelurado AS101 mostraram uma parada no crescimento em G2/M e apoptose em células de mieloma múltiplo (Naor, *et al.*, 2012). Consistentemente, os resultados apresentados em Sailer *et al.* (2003) mostram que o DTDF causa parada no ciclo celular nas fases S e G2/M do ciclo celular.

Os nossos resultados indicam que DTDF interfere em processos celulares importantes como replicação do DNA e possivelmente outros relacionados à divisão celular. Neste sentido, a acumulação de células tratadas com DTDF na fase S do ciclo celular está de acordo com o que foi relatado anteriormente para inibidores de topoisomerase I, como por exemplo, a camptotecina que promove danos no DNA, causando parada nas fases S e G2 do ciclo celular (Xiao, *et al.*, 2003). Foi descrito que inibidores de topoisomerase II provocam parada no ciclo celular de mamíferos na fase S, resultando em apoptose (Clark & Slevin, 1987, Barry, *et al.*, 1993, Walsby, *et al.*,

2011). Também tem sido observado que um aumento na sensibilidade a inibidores da topoisomerase II promove um aumento na proporção de células na fase S ou fase G0/G1 (Johnson & Walker, 1999, Bailly, 2012). Curiosamente, os inibidores da topoisomerase II, tais como elipticina, induzem apoptose dependente da translocação e sinalização da Akt em células epiteliais cancerosas de pulmão, sendo que este trabalho mostrou também a parada nas fases S e G2/M do ciclo celular e um aumento das células em sub-G1 o que está de acordo com os nossos resultados (Fang, *et al.*, 2009).

Compostos químicos com topologia planar são frequentemente capazes de se intercalar entre as bases de DNA (Snyder & Arnone, 2002). A intercalação induzida por agentes que promovem genotoxicidade manifesta-se principalmente como mutações de alteração do quadro de leitura em sistemas bacterianos e leveduras e também como clastogenicidade em sistemas de mamíferos (Snyder & Arnone, 2002). Assim essa afirmação está de acordo com (Degrandi *et al.*, 2010), onde foi mostrada uma mutação de alteração no quadro de leitura induzida por DTDF em *S. typhimurium* e *S. cerevisiae* e um aumento de quebras no DNA por ensaio cometa neutro e aumento da frequência de micronúcleos. Por esta razão, foi mostrado no presente trabalho, pelo ensaio de potencialização do efeito da bleomicina, que o DTDF possui um possível potencial intercalante (Capítulo II, Fig. 1A). O ensaio de amplificação do efeito da bleomicina realizado com células V79 foi baseado na observação que a bleomicina se liga e cliva o DNA em maior extensão quando a topologia do sulco menor foi alterada pela ligação de um agente intercalante, podendo assim ser utilizado para identificação de compostos com este tipo de ação (Snyder & Arnone, 2002).

O ensaio indireto de avaliação da inibição de topoisomerase II baseado na formação de MN realizado conforme Snyder e Arnone (2002), evidenciou uma interação do DTDF com a enzima topoisomerase II como do tipo dos chamados

“venenos de topoisomerase” (*poison*) (Capítulo II, Figura 1C). Os venenos de topoisomerase II aumentam os níveis de complexos cliváveis DNA-enzima por interação com a topoisomerase II, e a interface proteína-DNA de uma forma não covalente ou covalente com a modificação da estrutura da proteína e/ou do DNA (McClendon & Osheroff, 2007). Compostos que possuem a ação de “venenos de topoisomerase”, como por exemplo, a doxorubicina, m-amsacrina e a voreloxina têm um potencial de intercalação e esta característica é utilizada principalmente para aumentar a afinidade da topoisomerase II com o complexo de clivagem com o DNA. Esses “venenos” também são capazes de induzir parada do ciclo celular ou apoptose e promover a inibição da proliferação (Hawtin, *et al.*, 2010, Ketron, *et al.*, 2012). Assim, os inibidores da topoisomerase II têm sido utilizados para o tratamento de uma variedade de cânceres, incluindo leucemia, sarcoma, cânceres de pulmão, mama e ovário (Chikamori, *et al.*, 2010).

De modo a determinar a possível interação da topoisomerase 1 e 3 com o DTDF, avaliou-se a resposta de mutantes de *S. cerevisiae* deficientes nestas enzimas (*top1Δ* e *top3Δ*) no tratamento com o DTDF. Desde que foi mostrado que o gene da topoisomerase 1 não é essencial em leveduras (Benedetti, *et al.*, 1993), este modelo biológico, com disrupção no gene que codifica Top1p, tem sido explorado para o estudo de inibidores dessa enzima, tal como a camptotecina, na indução de morte celular, avaliando a sensibilidade desta linhagem mutante na exposição a estes inibidores em relação à linhagem selvagem (Nitiss & Wang, 1988, Bjornsti, *et al.*, 1994, Knab, *et al.*, 1995). Os resultados dos ensaios de sobrevivência demonstram que *top1Δ* apresenta resistência acentuada ao DTDF, possivelmente por esta molécula estar interagindo com a proteína Top1. No entanto, as linhagens *top3Δ* foram mais sensíveis, podendo este fenótipo de sensibilidade estar relacionado com o fato da enzima participar na resolução

da junção Holliday (Valenti, *et al.*, 2012) e possivelmente na reparação por recombinação homóloga (Symington & Gautier, 2011), que é uma das principais vias de reparação de danos causados pelo DTDF (Degrandi, *et al.*, 2010) (Capítulo I, Fig. 5; Capítulo II Fig. 2).

A enzima topoisomerase 1 possui um papel importante na recombinação, transcrição e replicação do DNA. A camptotecina, um conhecido inibidor de topoisomerase 1, estabiliza reversivelmente o complexo de clivagem por interferência com a religação com a fita de DNA clivada (Hertzberg, *et al.*, 1989). Intermediários do complexo de clivagem podem ser convertidos em quebras no DNA irreversíveis devido à colisão desses complexos com a maquinaria de replicação ou de transcrição. Neste sentido, foi mostrado que a forquilha de replicação do DNA colide com o complexo de clivagem onde a topoisomerase 1 está interagindo com a droga, e formando DSBs quando a fita afetada serve como molde para a síntese da fita contínua (líder), evento chamado de *replication fork run-off* (Strumberg, *et al.*, 2000). Esta replicação que induz quebras duplas promove um desencadeamento de uma sinalização de resposta a danos do DNA, incluindo a ativação de proteínas quinases, fosforilação de γ -H2AX, estabilização de p53, reparo no DNA e mecanismos apoptóticos (Furuta, *et al.*, 2003, Sordet, *et al.*, 2003, Pommier, *et al.*, 2006, Huang, *et al.*, 2010).

Outro estudo relacionado à toxicidade genética do DTDF foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa, em que Cruz *et al.* (*In press*) avaliaram o efeito do tratamento com este composto no remodelamento da cromatina e na reparação de DNA, utilizando linhagens da levedura *S. cerevisiae* deficientes em proteínas envolvidas nestes processos.

Nesse estudo, os ensaios de sobrevivência revelaram que Pso2p, apresentou um papel importante na reparação de lesões induzidas pelo DTDF. Isto pode sugerir que o

tratamento com DTDF pode causar a formação de *hairpin capped DSBs*, ou outras estruturas que bloqueiam a forquilha de replicação. Assim, Pso2p pode desenvolver um papel principal no processamento dessas lesões, proporcionando substratos para os mecanismos de reparação de DSBs.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a citotoxicidade do DTDF em leveduras e em células V79, provavelmente sejam devido à habilidade deste composto de interagir com topoisomerase 1 promovendo uma estabilização do complexo de clivagem e, conseqüentemente formação de DSBs durante a replicação. Isto pode levar a parada no ciclo celular na fase S, provocando morte celular ou reparação dos danos, permitindo, desta forma, a sobrevivência celular (Fig. 10).

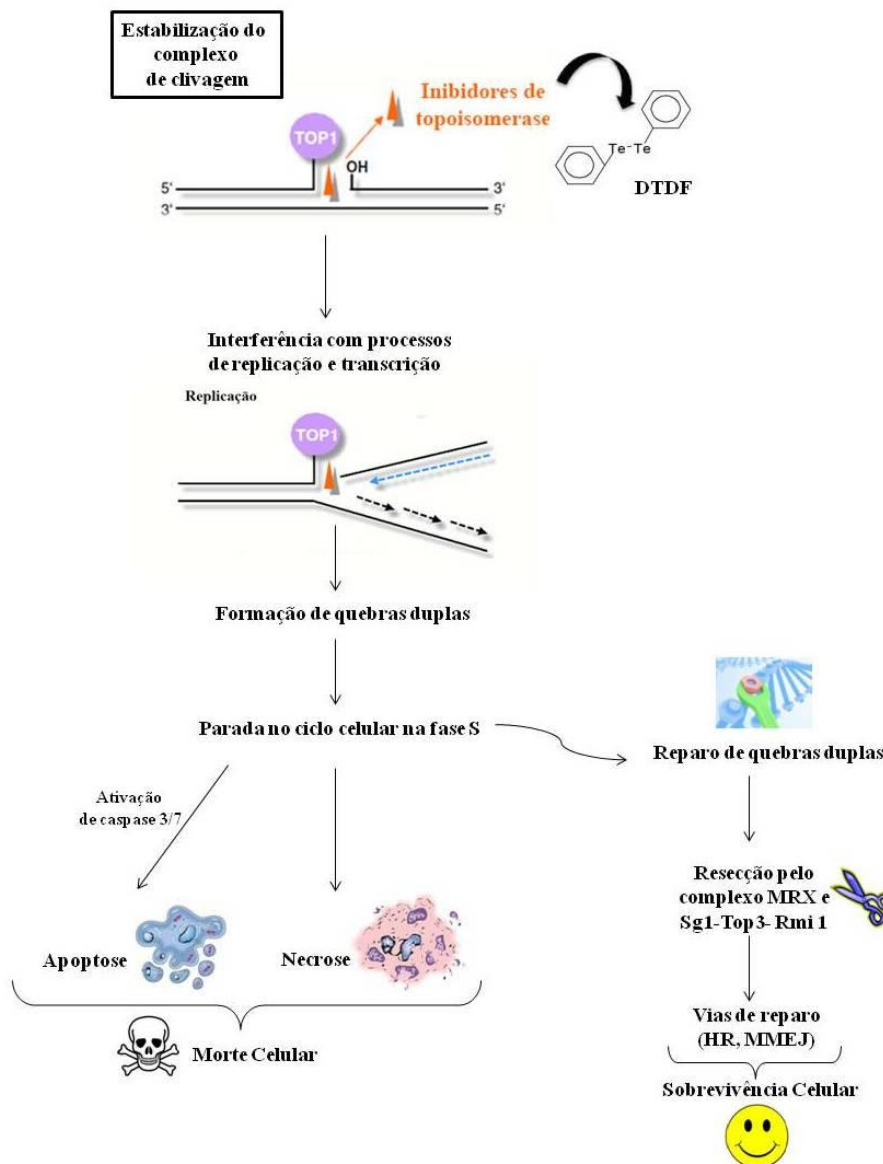


Figura 7. Modelo esquemático representando o mecanismo de ação do DTDF.

Este modelo sugere que esse composto provavelmente interaja com enzima topoisomerase 1 promovendo uma estabilização do complexo de clivagem e, conseqüentemente formação de DSBs durante a síntese da fita descontínua. Assim, pode ocorrer parada no ciclo celular, provocando morte celular ou a reparação dos danos, levando a sobrevivência celular.



CONCLUSÃO

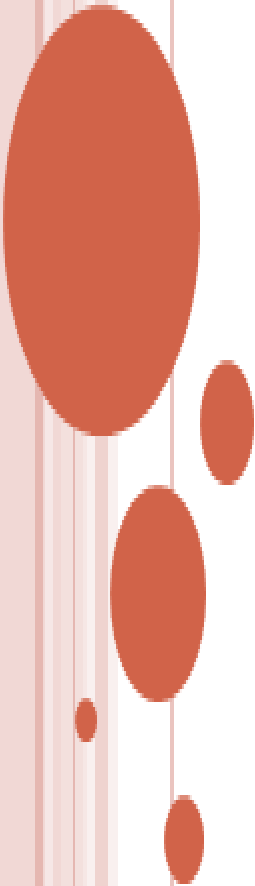
CONCLUSÃO

Devido a poucas informações disponíveis sobre os mecanismos que promovem a redução da viabilidade celular com o DTDF, este trabalho torna-se uma interessante fonte para acrescentar conhecimentos sobre os mecanismos de toxicidade deste composto. Os resultados mostraram que este composto induziu parada no ciclo celular na fase S e morte celular por apoptose ou necrose. O DTDF se mostrou um possível intercalante e inibidor de topoisomerasas. A inibição destas enzimas pode provocar o aumento de DSBs no DNA, interferindo em importantes processos celulares, como replicação e transcrição, levando a parada no ciclo e morte celular.

Conclusões específicas:

1. O ditelureto de difenila apresentou um efeito citotóxico em células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) pelo ensaio de MTT.
2. O DTDF induziu parada no ciclo celular na fase S e um aumento da porcentagem de células em sub-G1 em células V79, indicando morte celular, visto pela citometria de fluxo.
3. A análise morfológica por coloração diferencial das células V79 e o aumento da atividade das caspases 3/7 evidenciaram a ocorrência de morte celular por apoptose e necrose.
4. Resultados referentes ao ensaio de amplificação da bleomicina sugerem que o DTDF possa apresentar efeito intercalante no DNA.

5. Este composto também pode ter ação de “veneno de topoisomerase II”, conforme determinado pelo ensaio de micronúcleos.
6. As linhagens de levedura *S. cerevisiae* deficientes em topoisomerase 1 apresentaram maior resistência ao DTDF.
7. Mutantes em topoisomerase 3 mostraram elevada sensibilidade ao DTDF.
8. A sensibilidade da linhagem de levedura deficiente em Top3p e a tolerância das linhagens duplo mutante *top1Δtop3Δ* e simples mutante *top1Δ* sugerem que a Top3p seja importante na reparação das lesões no DNA provocada pelo DTDF na interação com a Top1p.

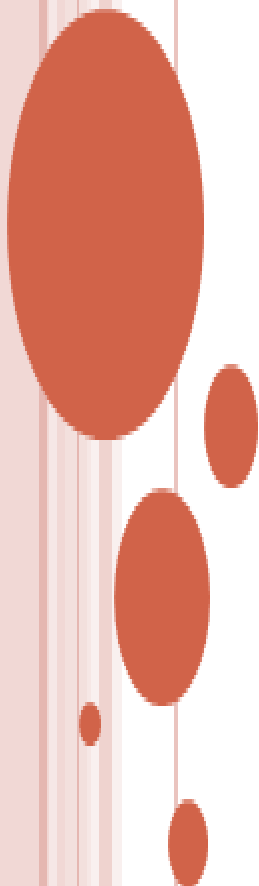


PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

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

1. Promover investigações mais detalhadas a respeito da interação das enzimas topoisomerases com o DTDF. Para tanto, sugere-se estudar a atividade das enzimas topoisomerases I e II por ensaios específicos com kits para essas topoisomerases.
2. Confirmar a formação de quebras duplas em linhagens de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) tratadas com DTDF pela expressão do marcador γ H2AX.
3. Ampliar a investigação do papel do DTDF na indução de apoptose em linhagens celulares tumorais pelas seguintes técnicas: análise da fragmentação do DNA internucleossomal por citometria de fluxo; avaliação das alterações no potencial da membrana mitocondrial com uso de rodamina 123 em citômetro de fluxo; realização medida da atividade da caspase 3/7. Ainda nessa abordagem confirmar se a linhagens celulares normais e tumorais também participam da via extrínseca da apoptose através da medida da atividade da caspase 8.
4. Realizar a avaliação pelo ensaio cometa do potencial genotóxico desse ditelureto em camundongos, determinando os órgãos-alvo.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS:

- Abdel-Aziz MM (2006) Memory switching of germanium tellurium amorphous semiconductor. *Applied Surface Science* **253**: 2059-2065.
- Abe H, Takaoka Y, Chiba Y, *et al.* (2009) Development of valuable yeast strains using a novel mutagenesis technique for the effective production of therapeutic glycoproteins. *Glycobiology* **19**: 428-436.
- Abondanza TS, Oliveira CR, Barbosa CM, *et al.* (2008) Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium(IV) compound RT-04. *Food Chem Toxicol* **46**: 2540-2545.
- Acevedo-Torres K, Fonseca-Williams S, Ayala-Torres S & Torres-Ramos CA (2009) Requirement of the *Saccharomyces cerevisiae* APN1 gene for the repair of mitochondrial DNA alkylation damage. *Environ Mol Mutagen* **50**: 317-327.
- Altmann M & Trachsel H (1994) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* system: a powerful tool to study the mechanism of protein synthesis initiation in eukaryotes. *Biochimie* **76**: 853-861.
- Amarante-Mendes GP B-WE, Brunner T, Green DR. (1998.) In *Cell: A Laboratory Manual*. (Spector DL GR & L L, ed.^eds.), p.^pp. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Avila DS, Gubert P, Palma A, *et al.* (2008) *An organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats.*
- Ba LA, Doring M, Jamier V & Jacob C (2010) Tellurium: an element with great biological potency and potential. *Organic & Biomolecular Chemistry* **8**: 4203-4216.
- Ba LA, Doring M, Jamier V & Jacob C (2010) Tellurium: an element with great biological potency and potential. *Org Biomol Chem* **8**: 4203-4216.
- Bailly C (2012) Contemporary Challenges in the Design of Topoisomerase II Inhibitors for Cancer Chemotherapy. *Chemical Reviews* **112**: 3611-3640.
- Baker NM, Rajan R & Mondragon A (2009) Structural studies of type I topoisomerases. *Nucleic Acids Res* **37**: 693-701.
- Barbosa NBV, Rocha JBT, Zeni G, Emanuelli T, Beque MC & Braga AL (1998) Effect of organic forms of selenium on d-aminolevulinatase from liver, kidney and brain of adults rats. *Toxicol. Appl. Pharm.* **149**: 243-253.
- Barry MA, Reynolds JE & Eastman A (1993) Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res* **53**: 2349-2357.
- Bastiani M, Vidotto MC & Horn F (2005) An avian pathogenic *Escherichia coli* isolate induces caspase 3/7 activation in J774 macrophages. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 133-140.

- Bedard PL & Desmedt C (2010) Doubling back on centromere 17 in early breast cancer. *Lancet Oncol* **11**: 216-217.
- Benedetti P, Fiorani P, Capuani L & Wang JC (1993) Camptothecin resistance from a single mutation changing glycine 363 of human DNA topoisomerase I to cysteine. *Cancer Res* **53**: 4343-4348.
- Beretta GL, Perego P & Zunino F (2008) Targeting topoisomerase I: molecular mechanisms and cellular determinants of response to topoisomerase I inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* **12**: 1243-1256.
- Berger JM (1998) Structure of DNA topoisomerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1400**: 3-18.
- Bjornsti MA, Knab AM & Benedetti P (1994) Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the cytotoxic activity of the antitumor drug camptothecin. *Cancer Chemother Pharmacol* **34 Suppl**: S1-5.
- Blackadder ES & Manderson WG (1975) Occupational absorption of tellurium: a report of two cases. *Br J Ind Med* **32**: 59-61.
- Boles JO, Lebioda L, Dunlap RB & Odom JD (1995) Telluromethionine in structural biochemistry. *SAAS Bull Biochem Biotechnol* **8**: 29-34.
- Boos G & Stopper H (2000) Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. *Toxicol Lett* **116**: 7-16.
- Borges VC, Rocha JB & Nogueira CW (2005) Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. *Toxicology* **215**: 191-197.
- Borges VC, Rocha JB, Savegnago L & Nogueira CW (2007) Repeated administration of diphenyl ditelluride induces hematological disorders in rats. *Food Chem Toxicol* **45**: 1453-1458.
- Borges VC, Savegnago L, Pinton S, Jesse CR, Alves D & Nogueira CW (2008) Vinylic telluride derivatives as promising pharmacological compounds with low toxicity. *Journal of Applied Toxicology* **28**: 839-848.
- Bower JJ, Karaca GF, Zhou Y, Simpson DA, Cordeiro-Stone M & Kaufmann WK (2010) Topoisomerase IIalpha maintains genomic stability through decatenation G(2) checkpoint signaling. *Oncogene* **29**: 4787-4799.
- Bradley MO, Bhuyan B, Francis MC, Langenbach R, Peterson A & Huberman E (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res* **87**: 81-142.
- Braga AL, Silveira CC, Reckziegel A & Menezes PH (1994) ChemInform Abstract: Convenient Preparation of Alkynyl Selenides, Sulfides and Tellurides from

Terminal Alkynes and Phenylchalcogenyl Halides in the Presence of Copper(I) Iodide. *ChemInform* **25**: no-no.

- Burden DA & Osheroff N (1998) Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1400**: 139-154.
- Burke D, Dawson, D. and Stearns, T. (2000) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual (Press CL, ed.^eds.), p.^pp. New York, USA.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, *et al.* (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**: 1318-1321.
- Chang F, Lee JT, Navolanic PM, *et al.* (2003) Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* **17**: 590-603.
- Chasteen TG, Fuentes DE, Tantaleán JC & Vásquez CC (2009) Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiology Reviews* **33**: 820-832.
- Chikamori K, Grozav AG, Kozuki T, Grabowski D, Ganapathi R & Ganapathi MK (2010) DNA topoisomerase II enzymes as molecular targets for cancer chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* **10**: 758-771.
- Clark PI & Slevin ML (1987) The clinical pharmacology of etoposide and teniposide. *Clin Pharmacokinet* **12**: 223-252.
- Collins TR, Hammes GG & Hsieh TS (2009) Analysis of the eukaryotic topoisomerase II DNA gate: a single-molecule FRET and structural perspective. *Nucleic Acids Res* **37**: 712-720.
- Corbett KD & Berger JM (2004) Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **33**: 95-118.
- Cunha RL, Gouvea IE & Juliano L (2009) A glimpse on biological activities of tellurium compounds. *An Acad Bras Cienc* **81**: 393-407.
- Cunha RLOR, Urano ME, Chagas JR, Almeida PC, Bincoletto C, Tersariol ILS & Comasseto JV (2005) Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium(IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **15**: 755-760.
- Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A & Phillips DR (2005) The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life* **57**: 73-81.
- De Silva KGK (1986) Heat resistant superior processing tellurium rubber. *Bulletin of the Rubber Research Institute of Sri Lanka* **22**: 3-4.

- Degrandi TH, de Oliveira IM, d'Almeida GS, *et al.* (2010) Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* **25**: 257-269.
- Deng Z, Zhang Y, Yue J, Tang F & Wei Q (2007) Green and orange CdTe quantum dots as effective pH-sensitive fluorescent probes for dual simultaneous and independent detection of viruses. *J Phys Chem B* **111**: 12024-12031.
- Deweese JE & Osheroff N (2009) The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res* **37**: 738-748.
- Dun A, Ma X, Wei J & Gan F (2011) Laser-induced grayscale patterning in TeOx thin films. *Materials Chemistry and Physics* **131**: 406-412.
- Ejsing CS, Sampaio JL, Surendranath V, *et al.* (2009) Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2136-2141.
- Engman L, Kandra T, Gallegos A, Williams R & Powis G (2000) Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. *Anticancer Drug Des* **15**: 323-330.
- Evan GI & Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**: 342-348.
- Fang K, Chen SP, Lin CW, Cheng WC & Huang HT (2009) Ellipticine-induced apoptosis depends on Akt translocation and signaling in lung epithelial cancer cells. *Lung Cancer* **63**: 227-234.
- Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* **455**: 81-95.
- Fenech M (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* **600**: 58-66.
- Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protocols* **2**: 1084-1104.
- Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* **2**: 1084-1104.
- Fenech M & Morley AA (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* **147**: 29-36.
- Forsburg SL (2001) The art and design of genetic screens: yeast. *Nat Rev Genet* **2**: 659-668.
- Forterre P & Gadelle D (2009) Phylogenomics of DNA topoisomerases: their origin and putative roles in the emergence of modern organisms. *Nucleic Acids Res* **37**: 679-692.

- Forterre P, Bergerat A & Lopez-Garcia P (1996) The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic archaea. *FEMS Microbiol Rev* **18**: 237-248.
- Forterre P, Gribaldo S, Gabelle D & Serre MC (2007) Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* **89**: 427-446.
- Foury F (1997) Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* **195**: 1-10.
- Frazer AD (1930) TELLURIUM IN THE TREATMENT OF SYPHILIS. *The Lancet* **216**: 133-134.
- Frei GM, Lebenthal I, Albeck M, Albeck A & Sredni B (2007) Neutral and positively charged thiols synergize the effect of the immunomodulator AS101 as a growth inhibitor of Jurkat cells, by increasing its uptake. *Biochem Pharmacol* **74**: 712-722.
- Frei GM, Kremer M, Hanschmann KM, Krause S, Albeck M, Sredni B & Schnierle BS (2008) Antitumour effects in mycosis fungoides of the immunomodulatory, tellurium-based compound, AS101. *British Journal of Dermatology* **158**: 578-586.
- Frei GM, Kremer M, Hanschmann KM, Krause S, Albeck M, Sredni B & Schnierle BS (2008) Antitumour effects in mycosis fungoides of the immunomodulatory, tellurium-based compound, AS101. *Br J Dermatol* **158**: 578-586.
- Friedman M, Bayer I, Letko I, *et al.* (2009) Topical treatment for human papillomavirus-associated genital warts in humans with the novel tellurium immunomodulator AS101: assessment of its safety and efficacy. *Br J Dermatol* **160**: 403-408.
- Furuta T, Takemura H, Liao ZY, *et al.* (2003) Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* **278**: 20303-20312.
- Gabelle D, Filee J, Buhler C & Forterre P (2003) Phylogenomics of type II DNA topoisomerases. *Bioessays* **25**: 232-242.
- Gajkowska B, Smialek M, Ostrowski RP, Piotrowski P & Frontczak-Baniewicz M (1999) The experimental squalene encephaloneuropathy in the rat. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* **51**: 75-80.
- Gewirtz D (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology* **57**: 727-741.
- Gibson TA & Goldberg DS (2009) Reverse engineering the evolution of protein interaction networks. *Pac Symp Biocomput* 190-202.
- Gimenez-Abian JF & Clarke DJ (2003) Replication-coupled topoisomerase II templates the mitotic chromosome scaffold? *Cell Cycle* **2**: 230-232.

- Goodrum JF (1998) Role of organotellurium species in tellurium neuropathy. *Neurochem Res* **23**: 1313-1319.
- Hassan W, Ibrahim M, Nogueira CW, Braga AL, Deobald AM, Mohammadzai IU & Rocha JB (2009) Influence of pH on the reactivity of diphenyl ditelluride with thiols and anti-oxidant potential in rat brain. *Chem Biol Interact* **180**: 47-53.
- Hawtin RE, Stockett DE, Byl JA, *et al.* (2010) Voreloxin is an anticancer quinolone derivative that intercalates DNA and poisons topoisomerase II. *PLoS One* **5**: e10186.
- Hayun M, Saida H, Albeck M, Peled A, Haran-Ghera N & Sredni B (2009) Induction therapy in a multiple myeloma mouse model using a combination of AS101 and melphalan, and the activity of AS101 in a tumor microenvironment model. *Exp Hematol* **37**: 593-603.
- Hayun M, Naor Y, Weil M, *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.
- Heimfarth L, Reis KP, Loureiro SO, de Lima BO, da Rocha JB & Pessoa-Pureur R (2012) Exposure of young rats to diphenyl ditelluride during lactation affects the homeostasis of the cytoskeleton in neural cells from striatum and cerebellum. *Neurotoxicology*.
- Herrero E, Ros J, Belli G & Cabisco E (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 1217-1235.
- Hertzberg RP, Caranfa MJ & Hecht SM (1989) On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry* **28**: 4629-4638.
- Huang TH, Chen HC, Chou SM, Yang YC, Fan JR & Li TK (2010) Cellular processing determinants for the activation of damage signals in response to topoisomerase I-linked DNA breakage. *Cell Res* **20**: 1060-1075.
- Irons DJ (2009) Logical analysis of the budding yeast cell cycle. *J Theor Biol* **257**: 543-559.
- Iwase K, Tatsuishi T, Nishimura Y, Yamaguchi JY, Oyama Y, Miyoshi N & Wada M (2004) Cytometric analysis of adverse action of diphenyl ditelluride on rat thymocytes: cell shrinkage as a cytotoxic parameter. *Environ Toxicol* **19**: 614-619.
- Johnson DG & Walker CL (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 295-312.
- Kalechman Y, Shani A, Dovrat S, Whisnant JK, Mettinger K, Albeck M & Sredni B (1996) The antitumoral effect of the immunomodulator AS101 and paclitaxel (Taxol) in a murine model of lung adenocarcinoma. *J Immunol* **156**: 1101-1109.

- Kalkbrenner T, Arnold A & Tans SJ (2009) Internal dynamics of supercoiled DNA molecules. *Biophys J* **96**: 4951-4955.
- Kalweit S, Utesch D, von der Hude W & Madle S (1999) Chemically induced micronucleus formation in V79 cells--comparison of three different test approaches. *Mutat Res* **439**: 183-190.
- Karki R, Thapa P, Kang MJ, *et al.* (2010) Synthesis, topoisomerase I and II inhibitory activity, cytotoxicity, and structure-activity relationship study of hydroxylated 2,4-diphenyl-6-aryl pyridines. *Bioorg Med Chem* **18**: 3066-3077.
- Kaur P, Yousuf S, Ansari M, Ahmad A & Islam F (2003) Dose- and duration-dependent alterations by tellurium on lipid levels. *Biological Trace Element Research* **94**: 259-271.
- Keenan PO, Knight AW, Billinton N, *et al.* (2007) Clear and present danger? The use of a yeast biosensor to monitor changes in the toxicity of industrial effluents subjected to oxidative colour removal treatments. *J Environ Monit* **9**: 1394-1401.
- Ketron AC, Denny WA, Graves DE & Osheroff N (2012) Amsacrine as a topoisomerase II poison: importance of drug-DNA interactions. *Biochemistry* **51**: 1730-1739.
- Kim RA & Wang JC (1989) Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* **208**: 257-267.
- Klinner U & Schafer B (2004) Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 201-223.
- Knab AM, Fertala J & Bjornsti MA (1995) A camptothecin-resistant DNA topoisomerase I mutant exhibits altered sensitivities to other DNA topoisomerase poisons. *J Biol Chem* **270**: 6141-6148.
- Koh SH, Kim SH, Kwon H, *et al.* (2004) Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt and GSK-3 mediated cytoprotective effect of epigallocatechin gallate on oxidative stress-injured neuronal-differentiated N18D3 cells. *Neurotoxicology* **25**: 793-802.
- Kormutakova R, Klucar L & Turna J (2000) DNA sequence analysis of the tellurite-resistance determinant from clinical strain of *Escherichia coli* and identification of essential genes. *Biometals* **13**: 135-139.
- Laden BP & Porter TD (2001) Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *Journal of Lipid Research* **42**: 235-240.
- Laden BP, Tang Y & Porter TD (2000) Cloning, Heterologous Expression, and Enzymological Characterization of Human Squalene Monooxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **374**: 381-388.

- Lafon A, Chang CS, Scott EM, Jacobson SJ & Pillus L (2007) MYST opportunities for growth control: yeast genes illuminate human cancer gene functions. *Oncogene* **26**: 5373-5384.
- Lakhani SA, Masud A, Kuida K, *et al.* (2006) Caspases 3 and 7: Key Mediators of Mitochondrial Events of Apoptosis. *Science* **311**: 847-851.
- Larner AJ (1995) How does garlic exert its hypocholesterolaemic action? The tellurium hypothesis. *Medical hypotheses* **44**: 295-297.
- Le Meur N & Gentleman R (2008) Modeling synthetic lethality. *Genome Biol* **9**: R135.
- Leon LG, Rios-Luci C, Tejedor D, *et al.* (2010) Mitotic arrest induced by a novel family of DNA topoisomerase II inhibitors. *J Med Chem* **53**: 3835-3839.
- Liu IF, Annamalai T, Sutherland JH & Tse-Dinh YC (2009) Hydroxyl radicals are involved in cell killing by the bacterial topoisomerase I cleavage complex. *J Bacteriol* **191**: 5315-5319.
- Liu X, Kramer JA, Swaffield JC, Hu Y, Chai G & Wilson AG (2008) Development of a highthroughput yeast-based assay for detection of metabolically activated genotoxins. *Mutat Res* **653**: 63-69.
- Lorenz DR, Cantor CR & Collins JJ (2009) A network biology approach to aging in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1145-1150.
- Maciel EN, Bolzan RC, Braga AL & Rocha JB (2000) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* **14**: 310-319.
- Massardo DR, Pontieri P, Maddaluno L, De Stefano M, Alifano P & Del Giudice L (2009) Effects of tellurite on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals* **22**: 1089-1094.
- McClendon AK & Osheroff N (2007) DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res* **623**: 83-97.
- McCue PP & Phang JM (2008) Identification of human intracellular targets of the medicinal Herb St. John's Wort by chemical-genetic profiling in yeast. *J Agric Food Chem* **56**: 11011-11017.
- Menacho-Marquez M & Murguia JR (2007) Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol* **9**: 221-228.
- Menotta M, Pierleoni R, Amicucci A, *et al.* (2006) Characterization and complementation of a Fus3/Kss1 type MAPK from *Tuber borchii*, TBMK. *Mol Genet Genomics* **276**: 126-134.

- Meotti FC, Borges VC, Zeni G, Rocha JBT & Nogueira CW (2003) Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicology Letters* **143**: 9-16.
- Meotti FC, Borges VC, Zeni G, Rocha JB & Nogueira CW (2003) Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett* **143**: 9-16.
- Michael McClain R, Wolz E, Davidovich A & Bausch J (2006) Genetic toxicity studies with genistein. *Food and Chemical Toxicology* **44**: 42-55.
- Miller-Fleming L, Giorgini F & Outeiro TF (2008) Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnol J* **3**: 325-338.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G & Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**: 185-229.
- Minotti G, Recalcati S, Menna P, Salvatorelli E, Corna G & Cairo G (2004) Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. *Methods Enzymol* **378**: 340-361.
- Moretto MB, Funchal C, Zeni G, Rocha JBT & Pessoa-Pureur R (2005) Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. *Toxicology* **210**: 213-222.
- Moretto MB, Boff B, Franco J, *et al.* (2007) $(45)\text{Ca}(2+)$ influx in rat brain: effect of diorganylchalcogenides compounds. *Toxicol Sci* **99**: 566-571.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.
- Muñiz Álvarez JL, García Calzón JA & López Fonseca JM (2005) Electrochemistry of diphenylditelluride at the hanging mercury drop electrode in a protic medium. *Journal of Colloid and Interface Science* **287**: 592-596.
- Mustacchi R, Hohmann S & Nielsen J (2006) Yeast systems biology to unravel the network of life. *Yeast* **23**: 227-238.
- Naor Y, Hayun M, Sredni B & Don J (2012) Multiple signal transduction pathways are involved in G(2)/M growth arrest and apoptosis induced by the immunomodulator AS101 in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*.
- Neuman KC (2010) Evolutionary twist on topoisomerases: conversion of gyrase to topoisomerase IV. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 22363-22364.
- Newman RA, Osborn S & Siddik ZH (1989) Determination of tellurium in biological fluids by means of electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-mass spectrometry (ETV-ICP-MS). *Clin Chim Acta* **179**: 191-196.

- Nishiuchi K, Kitaura H, Yamada N & Akahira N (1998) Dual-Layer Optical Disk with Te--O--Pd Phase-Change Film. *Japanese Journal of Applied Physics* **37**: 2163-2167.
- Nitiss J & Wang JC (1988) DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7501-7505.
- Nitiss JL (2009) Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **9**: 338-350.
- Nogueira CW & Rocha JBT (2009) Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *PATAI'S Chemistry of Functional Groups*, ed. ^eds.), p. ^pp. John Wiley & Sons, Ltd.
- Nogueira CW, Zeni G & Rocha JBT (2004) Organoselenium and Organotellurium Compounds: Toxicology and Pharmacology. *Chemical Reviews* **104**: 6255-6286.
- Nogueira CW, Rotta LN, Perry ML, Souza DO & da Rocha JB (2001) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res* **906**: 157-163.
- Nyska A, Waner T, Pirak M, Albeck M & Sredni B (1989) Toxicity study in rats of a tellurium based immunomodulating drug, AS-101: a potential drug for AIDS and cancer patients. *Arch Toxicol* **63**: 386-393.
- Ogra Y, Kobayashi R, Ishiwata K & Suzuki KT (2008) Comparison of distribution and metabolism between tellurium and selenium in rats. *J Inorg Biochem* **102**: 1507-1513.
- Osada Y, Kumagai T, Masuda K, Suzuki T & Kanazawa T (2005) Mutagenicity evaluation of *Schistosoma* spp. extracts by the umu-test and V79/HGPRT gene mutation assay. *Parasitol Int* **54**: 29-34.
- Osborn MJ & Miller JR (2007) Rescuing yeast mutants with human genes. *Brief Funct Genomic Proteomic* **6**: 104-111.
- Ouyang Y, Xu Q, Mitsui K, Motizuki M & Xu Z (2009) Human trehalase is a stress responsive protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **379**: 621-625.
- Parrella E & Longo VD (2008) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* to study mitochondrial dysfunction and disease. *Methods* **46**: 256-262.
- Parsons AB, Geyer R, Hughes TR & Boone C (2003) Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation. *Prog Cell Cycle Res* **5**: 159-166.
- Pena-Castillo L & Hughes TR (2007) Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? *Genetics* **176**: 7-14.

- Pennacchia C, Blaiotta G, Pepe O & Villani F (2008) Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. *Journal of Applied Microbiology* **105**: 1919-1928.
- Perocchi F, Mancera E & Steinmetz LM (2008) Systematic screens for human disease genes, from yeast to human and back. *Mol Biosyst* **4**: 18-29.
- Perrier R, Anciant R, Armand MF & Lee Y (2003) Dual-level inorganic write-once blue-ray disc. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Short Notes & Review Papers* **42**: 5634-5637.
- Petraghani N (1995) *Comprehensive Organometallic Chemistry II*. Pergamon Press, Exeter, UK
- Pommier Y (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* **6**: 789-802.
- Pommier Y (2009) DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem Rev* **109**: 2894-2902.
- Pommier Y, Barcelo JM, Rao VA, *et al.* (2006) Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **81**: 179-229.
- Ramadan SE, Razak AA, Ragab AM & el-Meleigy M (1989) Incorporation of tellurium into amino acids and proteins in a tellurium-tolerant fungi. *Biol Trace Elem Res* **20**: 225-232.
- Rampakakis E, Gkogkas C, Di Paola D & Zannis-Hadjopoulos M (2010) Replication initiation and DNA topology: The twisted life of the origin. *J Cell Biochem* **110**: 35-43.
- Remondo C, Cereda V, Mostböck S, Sabzevari H, Franzusoff A, Schlom J & Tsang K-Y (2009) Human dendritic cell maturation and activation by a heat-killed recombinant yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) vector encoding carcinoembryonic antigen. *Vaccine* **27**: 987-994.
- Rezanka T & Sigler K (2008) Biologically active compounds of semi-metals. *Phytochemistry* **69**: 585-606.
- Řezanka T & Sigler K (2008) Biologically active compounds of semi-metals. *Phytochemistry* **69**: 585-606.
- Rigobello MP, Gandin V, Folda A, *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.
- Roman SS, Nava A, Favero AM, Weis SN, Zeni G, Rocha JBT & Nogueira CW (2007) Diphenyl ditelluride effect on embryo/fetal development in mice: Interspecies differences. *Toxicology* **231**: 243-249.

- Roman SS, Nava A, Favero AM, Weis SN, Zeni G, Rocha JB & Nogueira CW (2007) Diphenyl ditelluride effect on embryo/fetal development in mice: interspecies differences. *Toxicology* **231**: 243-249.
- Rosa RM, Sulzbacher K, Picada JN, Roesler R, Saffi J, Brendel M & Henriques JA (2004) Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. *Mutat Res* **563**: 107-115.
- Rothenberg ML (1997) Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann Oncol* **8**: 837-855.
- Roy S & Hardej D (2011) Tellurium tetrachloride and diphenyl ditelluride cause cytotoxicity in rat hippocampal astrocytes. *Food Chem Toxicol* **49**: 2564-2574.
- Sailer BL, Liles N, Dickerson S & Chasteen TG (2003) Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Arch Toxicol* **77**: 30-36.
- Sailer BL, Liles N, Dickerson S, Sumners S & Chasteen TG (2004) Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicol In Vitro* **18**: 475-482.
- Sailer BL, Barrasso AM, Valdez JG, Cobo JM, D'Anna JA & Crissman HA (1998) Reduction in the radiation-induced late S phase and G2 blocks in HL-60 cell populations by amiloride, an efficient inhibitor of the Na⁺/H⁺ transporter. *Cancer Res* **58**: 413-420.
- Sandoval J, Levêque P, Gallez B, Vásquez C & Buc Calderon P (2010) Tellurite-induced oxidative stress leads to cell death of murine hepatocarcinoma cells. *Biometals* **23**: 623-632.
- Santos DB, Schiar VPP, Paixão MW, *et al.* (2009) Hemolytic and genotoxic evaluation of organochalcogens in human blood cells in vitro. *Toxicology in Vitro* **23**: 1195-1204.
- Santos DB, Schiar VP, Ribeiro MC, *et al.* (2009) Genotoxicity of organoselenium compounds in human leukocytes in vitro. *Mutat Res* **676**: 21-26.
- Scansetti G (1992) Exposure to metals that have recently come into use. *Science of The Total Environment* **120**: 85-91.
- Schiar VP, Dos Santos DB, Paixao MW, Nogueira CW, Rocha JB & Zeni G (2009) Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: a possible involvement of reactive oxygen species. *Chem Biol Interact* **177**: 28-33.
- Schiar VPP, dos Santos DB, Paixão MW, Nogueira CW, Rocha JBT & Zeni G (2009) Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: A possible involvement of reactive oxygen species. *Chemico-Biological Interactions* **177**: 28-33.

- Schneider K, Kromer JO, Wittmann C, Alves-Rodrigues I, Meyerhans A, Diez J & Heinzle E (2009) Metabolite profiling studies in *Saccharomyces cerevisiae*: an assisting tool to prioritize host targets for antiviral drug screening. *Microb Cell Fact* **8**: 12.
- Schoeffler AJ & Berger JM (2008) DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q Rev Biophys* **41**: 41-101.
- Schoner D, Kalisch M, Leisner C, *et al.* (2008) Annotating novel genes by integrating synthetic lethals and genomic information. *BMC Syst Biol* **2**: 3.
- Sciandrello G, Mauro M, Caradonna F, Catanzaro I, Saverini M & Barbata G (2010) Acrylamide catalytically inhibits topoisomerase II in V79 cells. *Toxicol In Vitro* **24**: 830-834.
- Seiple L, Jaruga P, Dizdaroglu M & Stivers JT (2006) Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast. *Nucleic Acids Res* **34**: 140-151.
- Shaaban ER, Afify N & El-Taher A (2009) Effect of film thickness on microstructure parameters and optical constants of CdTe thin films. *Journal of Alloys and Compounds* **482**: 400-404.
- Shibasaki S, Maeda H & Ueda M (2009) Molecular display technology using yeast--arming technology. *Anal Sci* **25**: 41-49.
- Shin JS, Kang KA, Kim ES, *et al.* (2008) Cytoprotective activity of anaphenone against oxidative stress-induced apoptosis in V79-4 lung fibroblast cells. *Cell Biol Int* **32**: 1099-1107.
- Siddik ZH & Newman RA (1988) Use of platinum as a modifier in the sensitive detection of tellurium in biological samples. *Anal Biochem* **172**: 190-196.
- Smart DJ, Halicka HD, Schmuck G, Traganos F, Darzynkiewicz Z & Williams GM (2008) Assessment of DNA double-strand breaks and gammaH2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. *Mutat Res* **641**: 43-47.
- Snyder RD (1998) A review and investigation into the mechanistic basis of the genotoxicity of antihistamines. *Mutat Res* **411**: 235-248.
- Snyder RD (2000) Use of catalytic topoisomerase II inhibitors to probe mechanisms of chemical-induced clastogenicity in Chinese hamster V79 cells. *Environ Mol Mutagen* **35**: 13-21.
- Snyder RD & Streckowski L (1999) Enhancement of bleomycin-induced micronucleus formation in V79 cells as a rapid and sensitive screen for non-covalent DNA-binding compounds. *Mutat Res* **444**: 181-192.
- Snyder RD & Diehl MS (2000) The bleomycin amplification assay in V79 cells predicts frameshift mutagenicity of intercalative agents. *Mutagenesis* **15**: 203-205.

- Snyder RD & Arnone MR (2002) Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using the V79 in vitro micronucleus assay. *Mutat Res* **503**: 21-35.
- Snyder RD & Gillies PJ (2003) Reduction of genistein clastogenicity in Chinese hamster V79 cells by daidzein and other flavonoids. *Food Chem Toxicol* **41**: 1291-1298.
- Snyder RD, McNulty J, Zairov G, Ewing DE & Hendry LB (2005) The influence of N-dialkyl and other cationic substituents on DNA intercalation and genotoxicity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **578**: 88-99.
- Soares DG, Poletto NP, Bonatto D, Salvador M, Schwartzmann G & Henriques JA (2005) Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways. *Biochem Pharmacol* **70**: 59-69.
- Sordet O, Khan QA, Kohn KW & Pommier Y (2003) Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **3**: 271-290.
- Sredni-Kenigsbuch D, Shohat M, Shohat B, Ben-Amitai D, Chan C-C & David M (2010) The novel tellurium immunomodulator AS101 inhibits interleukin-10 production and p38 MAPK expression in atopic dermatitis. *Journal of dermatological science*.
- Sredni B, Caspi RR, Klein A, *et al.* (1987) A new immunomodulating compound (AS-101) with potential therapeutic application. *Nature* **330**: 173-176.
- Sredni B, Kalechman Y, Albeck M, *et al.* (1990) Cytokine secretion effected by synergism of the immunomodulator AS101 and the protein kinase C inducer bryostatin. *Immunology* **70**: 473-477.
- Sredni B, Caspi RR, Lustig S, *et al.* (1988) The biological activity and immunotherapeutic properties of AS-101, a synthetic organotellurium compound. *Nat Immun Cell Growth Regul* **7**: 163-168.
- Srivastava RC, Srivastava R, Srivastava TN & Jain SP (1983) Effect of organotellurium compounds on the enzymatic alterations in rats. *Toxicol Lett* **16**: 311-316.
- Stangherlin EC, Rocha JB & Nogueira CW (2009) Diphenyl ditelluride impairs short-term memory and alters neurochemical parameters in young rats. *Pharmacol Biochem Behav* **91**: 430-435.
- Stangherlin EC, Ardais AP, Rocha JB & Nogueira CW (2009) Exposure to diphenyl ditelluride, via maternal milk, causes oxidative stress in cerebral cortex, hippocampus and striatum of young rats. *Arch Toxicol* **83**: 485-491.
- Stangherlin EC, Favero AM, Zeni G, Rocha JB & Nogueira CW (2005) Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. *Toxicology* **207**: 231-239.

- Strumberg D, Pilon AA, Smith M, Hickey R, Malkas L & Pommier Y (2000) Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol Cell Biol* **20**: 3977-3987.
- Sturgeon CM, Kemmer D, Anderson HJ & Roberge M (2006) Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnol J* **1**: 289-298.
- Sun X, Wong JR, Song K & Chen LB (1996) Anticarcinoma activity of a novel drug, 3-ethyl-3'-methyl-thiatelluracarbo-cyanine iodide (Te), a tellurium-containing cyanine targeted at mitochondria. *Clinical Cancer Research* **2**: 1335-1340.
- Symington LS & Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* **45**: 247-271.
- Taylor A (1996) Biochemistry of tellurium. *Biol Trace Elem Res* **55**: 231-239.
- Tian C-Y, Zhao W-W, Wang J, Xu J-J & Chen H-Y (2012) Amplified quenching of electrochemiluminescence from CdS sensitized TiO₂ nanotubes by CdTe-carbon nanotube composite for detection of prostate protein antigen in serum. *Analyst* **137**: 3070-3075.
- Toews AD, Roe EB, Goodrum JF, Bouldin TW, Weaver J, Goines ND & Morell P (1997) Tellurium causes dose-dependent coordinate down-regulation of myelin gene expression. *Brain research. Molecular brain research* **49**: 113-119.
- Tomicic MT & Kaina B (2012) Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1835**: 11-27.
- Tyan Y-S, Preuss DR, Vazan F & Marino J (1986) Laser recording in tellurium suboxide thin films. *J. Appl. Phys* **59**.
- Valente AX, Roberts SB, Buck GA & Gao Y (2009) Functional organization of the yeast proteome by a yeast interactome map. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1490-1495.
- Valenti A, De Felice M, Perugino G, Bizard A, Nadal M, Rossi M & Ciaramella M (2012) Synergic and opposing activities of thermophilic RecQ-like helicase and topoisomerase 3 proteins in Holliday junction processing and replication fork stabilization. *J Biol Chem* **287**: 30282-30295.
- Vasconcellos MC, Rosa RM, Machado MS, *et al.* (2007) Genotoxicity of 15-deoxygoyazensolide in bacteria and yeast. *Mutat Res* **631**: 16-25.
- Viard T & de la Tour CB (2007) Type IA topoisomerases: a simple puzzle? *Biochimie* **89**: 456-467.

- Vij P & Hardej D (2012) Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non-transformed human colon cells. *Environ Toxicol Pharmacol*.
- Vologodskii A & Rybenkov VV (2009) Simulation of DNA catenanes. *Phys Chem Chem Phys* **11**: 10543-10552.
- von der Hude W, Kalweit S, Engelhardt G, *et al.* (2000) In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - Results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **468**: 137-163.
- Walsby EJ, Coles SJ, Knapper S & Burnett AK (2011) The topoisomerase II inhibitor voreloxin causes cell cycle arrest and apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with cytarabine. *Haematologica* **96**: 393-399.
- Walsby EJ, Coles SJ, Knapper S & Burnett AK (2011) The topoisomerase II inhibitor voreloxin causes cell cycle arrest and apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with cytarabine. *Haematologica* **96**: 393-399.
- Wu CY, Bird AJ, Chung LM, Newton MA, Winge DR & Eide DJ (2008) Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* **9**: 370.
- Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S & Zhang H (2003) Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* **278**: 21767-21773.
- Yamada T, Jung DY, Sawada R, Matsuoka A, Nakaoka R & Tsuchiya T (2008) Effects intracerebral microinjection and intraperitoneal injection of [60]fullerene on brain functions differ in rats. *J Nanosci Nanotechnol* **8**: 3973-3980.
- Yan M, Zhang Y, Xu K, Fu T, Qin H & Zheng X (2011) An in vitro study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. *Toxicology* **282**: 94-103.
- Yarema MC & Curry SC (2005) Acute tellurium toxicity from ingestion of metal-oxidizing solutions. *Pediatrics* **116**: e319-321.
- Yu L, He K, Chai D, Yang C & Zheng O (1993) Evidence for telluroamino acid in biological materials and some rules of assimilation of inorganic tellurium by yeast. *Anal Biochem* **209**: 318-322.
- Zeni G, Braga AL & Stefani HA (2003) Palladium-Catalyzed Coupling of sp²-Hybridized Tellurides. *Accounts of Chemical Research* **36**: 731-738.
- Zeni G, Ludtke DS, Panatieri RB & Braga AL (2006) Vinylic tellurides: from preparation to their applicability in organic synthesis. *Chem Rev* **106**: 1032-1076.
- Zhang R, Kang KA, Piao MJ, *et al.* (2008) Eckol protects V79-4 lung fibroblast cells against gamma-ray radiation-induced apoptosis via the scavenging of reactive

oxygen species and inhibiting of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway. *Eur J Pharmacol* **591**: 114-123.

Zhou H, Li XM, Meinkoth J & Pittman RN (2000) Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol* **151**: 483-494.