



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO COMPOSTO TELURANA RF 07 EM
ENSAIOS NÃO CLÍNICOS**

FELIPE EMANNUEL ALVINO DE JESUS

TERESINA – PIAUÍ

FEVEREIRO/2018

FELIPE EMANNUEL ALVINO DE JESUS

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO COMPOSTO TELURANA RF 07 EM
ENSAIOS NÃO CLÍNICOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

TERESINA – PIAUÍ

FEVEREIRO/2018

FELIPE EMANNUEL ALVINO DE JESUS

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO COMPOSTO TELURANA RF 07 EM
ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa (Orientador)

Departamento de Biologia | *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros

Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante (Examinador Interno)

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas | *Campus* Ministro Petrônio Portella

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (Examinador Interno)

Departamento de Biofísica e Fisiologia | *Campus* Ministro Petrônio Portella

Profa. Dra. Adriana Maria Viana Nunes (Examinador Externo)

Departamento de Biofísica e Fisiologia | *Campus* Ministro Petrônio Portella

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof.^a. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof.^a Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dr. Viriato Campelo

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

Dedico a Deus por nunca me deixar fazer desacreditar que meus sonhos podem se tornar realidade. Aos meus pais pela fé e apoio. À minha irmã pela companhia diária e aos amigos que me ajudaram a colocar os tijolos desse imenso castelo.

AGRADECIMENTOS

É da gratidão que brotam os mais belos frutos, pois quando estamos focados na abundância mais abundância recebemos. Deus sempre me proporcionou caminhos grandiosos e por essa e muitas outras razões toda a minha gratidão será eterna. OBRIGADO Papai do Céu, obrigado por tantas vezes enxugar minhas lágrimas e me levantar quando eu já não acreditava em nada. Tudo o que tenho hoje são dádivas recebidas de Ti.

Aos meus pais, *Terezinha de Jesus Alvino* e *Raimundo Ferreira de Jesus*, por serem meus alicerces e minha razão diária para enfrentar os desafios do mundo.

Aos meus padrinhos *Adonias do Nascimento Silva* e *Maria de Jesus Alvino Silva* por acreditarem em mim e por me proporcionarem a oportunidade de alcançar meus sonhos.

À minha irmã, *Sara Maria Alvino de Jesus*, por se fazer presente em todos os momentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí – UFPI em nome do Coordenador Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira, e aos demais integrantes do corpo docente deste Programa de Pós-Graduação pelo conhecimento transmitido nesses dois anos, em especial à professora *Ana Amélia* pelo acolhimento em seu laboratório de pesquisa.

A Prof.^a Dra. *Adriana Maria*, por ter cedido o composto experimental RF07 para a realização deste trabalho.

Aos incríveis amigos científicos, do Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica, LAPGENIC, de maneira muito especial a *Rosália Tôrres*, *Ag-Anne Melo*, *Antonielly Campinho* e *José Victor* que fizeram meus dias mais felizes e produtivos.

Aos meus amigos da farmácia, em especial *Audinei de Sousa Moura* pelo grande suporte fornecido nessa caminhada.

E por fim ao meu orientador, Prof. Dr. **João Marcelo de Castro e Sousa**, pelo voto de confiança e pela oportunidade de tornar esta etapa realidade.

... a todos, muito obrigado!!!

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGP01 – Linhagem de Adenocarcinoma gástrico

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Adenosine triphosphate (Trifosfato de adenosina)

Bas – Basófilos

CAT - Catalase

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

CuZnSOD – Superóxido dismutase cobre-zinco

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Desoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

EG – Linhagem duplo mutante de *Saccharomyces cerevisiae*, SOD1 Δ CAT1 Δ

EG103 – Linhagem selvagem de *Saccharomyces cerevisiae*, SODWT

EG110 – Linhagem mutante e defectiva de *Saccharomyces cerevisiae*, SOD2 Δ

EG118 – Linhagem mutante e defectiva de *Saccharomyces cerevisiae*, SOD1 Δ

EG133 – Linhagem duplo mutante de *Saccharomyces cerevisiae*, SOD1 Δ SOD2 Δ

EG223 – Linhagem mutante e defectiva de *Saccharomyces cerevisiae*, CAT1 Δ

ENC – Eritrócito normocromático

Eos – Eosinófilos

EPC – Eritrócito policromático

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FD – Frequência de danos

GB – Glóbulos brancos

GV – Glóbulos vermelhos

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

Hb – Hemoglobina

HCM – Hemoglobina corpuscular média

HL-60 – Linhagem de leucemia

Ht – Hematócrito

ID – Índice de danos

IFN – Interferon

IL – Interleucina

Lin – Linfócitos

MN – Micronúcleo

MnSOD – Produto do gene SOD2

Mon – Monócitos

MRC5 – Linhagem de fibroblasto

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Neu – Neutrófilos

NK – Células Natural Killer

PLT – Plaquetas

PR – Palmitato de retinol

RDW – Distribuição de eritrócitos

RF 07 – (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-($\lambda\alpha\mu\beta\delta\alpha$)4-telurapiro[3.5]non-2-il}fenil Metil Éter)

SKMEL-28 – Linhagem de melanoma

SOD – Superóxido dismutase

SOD1 – Superóxido dismutase citoplasmática

SOD1/CAT1 – Duplo mutante (Superóxido dismutase citoplasmática + catalase)

SOD1/SOD2 – Duplo mutante (Superóxido dismutase citoplasmática + Superóxido dismutase mitocondrial)

SOD2 – Superóxido dismutase mitocondrial

TBARS – Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

Te – Telúrio

TeCl₄ – Tetracloreto de telúrio

TFD – Terapia Fotodinâmica

Th1 – Linfócito T helper 1

Th2 - Linfócito T helper 2

UFPI – Universidade Federal do Piauí

VCM – Volume corpuscular médio

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

| | |
|---|----|
| Figura 1. Divisão esquemática do corpo da dissertação | 18 |
| Figura 2. Localização do telúrio na tabela periódica | 20 |
| Figura 3. Estrutura química da Telurana AS-101 | 23 |
| Figura 4. Estrutura química da Telurana – RF 07..... | 24 |
| Figura 05: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em cultura bem como sua visualização em microscópio de varredura | 32 |
| Figura 6. Semeio das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para determinação do potencial oxidante ou antioxidante de compostos | 32 |
| Figura 7: Fotomicrografia de eritrócito policromático micronucleado em medula óssea de <i>Mus Musculus</i> (1000X) | 36 |

CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO CITOTÓXICA, MUTAGÊNICA E ANTITUMORAL DA ORGANOTELURANA RF07

| | |
|---|----|
| Figura 1. Avaliação oxidante da Telurana RF07 (5, 10 e 20 µg/ml) em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pela inibição de crescimento no teste do disco central. RF07. Dados significantes ($p < 0,001$) em ANOVA e testes Tukey's, para ^a comparado com a salina. ^b compara com o CP. | 59 |
| Figura 2. Hemólise de hemácia de ovelha (A) e cachorro (B) | 60 |
| Figura 3: Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT após 72 h de exposição ao composto RF07 em células tumorais de Sarcoma 180. | 61 |
| Figura 4: Avaliação da viabilidade celular em diferentes concentrações da Telurana RF07 em diferentes células tumorais..... | 62 |

CAPÍTULO II - ORGANOTELURANA RF07: PERFIL TÓXICO E GENOTÓXICO EM MODELOS *IN VIVO*

| | |
|---|----|
| Figura 1. Avaliação genotóxica (índice de danos e frequência de danos) do composto Telurana RF07 em células sanguíneas de <i>Mus musculus</i> e a capacidade de reparo dessas células avaliadas em diferentes tempos de exposição..... | 76 |
|---|----|

Figura 2: Variação quantitativa dos tipos de danos (0 – 4) para o teste cometa em células de sangue periférico de *Mus musculus* tratadas com o composto Telurana RF07 em diferentes tempos de exposição (24, 48 e 72h) 77

Figura 3. Perfil fotomicrográfico de células sanguíneas de *M. musculus* expostos ao composto Telurana RF07 através do ensaio cometa evidenciando os tipos de danos e células em apoptose. A: 1µmol/kg; B: 50 µmol/kg; C: 100 µmol/kg. T2: dano tipo 2. T3: dano tipo 3. Ap: apoptose. Coloração por Giemsa. Aumento de 400X..... 78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO CITOTÓXICA, MUTAGÊNICA E ANTITUMORAL DA ORGANOTELURANA RF07

| | |
|---|----|
| Tabela 01. As linhagens de levedura <i>S. cerevisiae</i> que foram utilizadas no estudo..... | 53 |
| Tabela 2: Atividade tóxica do telurana RF07 em diferentes concentrações (µg/ml) por meio do bioensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i> | 56 |
| Tabela 3. Efeito tóxico (TMR) e citotóxico (IM) da telurana RF07 em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> | 58 |

CAPÍTULO II- ORGANOTELURANA RF07: PERFIL TÓXICO E GENOTÓXICO EM MODELOS *IN VIVO*

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Avaliação do percentual de apoptose em células sanguíneas de <i>Mus musculus</i> causada pelo composto Telurana RF07 avaliadas em diferentes tempos de exposição..... | 78 |
| Tabela 2. Avaliação da ação mutagênica e citotóxica do composto Telurana RF07 em células de medula óssea de <i>Mus musculus</i> por meio do teste de micronúcleos (MN)..... | 79 |
| Tabela 3. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de <i>Mus musculus</i> tratados com Telurana RF07 (1, 50 e 100 µmol/Kg). ANOVA- <i>one-way</i> e pós-teste de <i>Tukey</i> . Significância de ^a $p < 0,05$ comparado ao CN; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com CP. Todos comparados em relação ao mesmo parâmetro..... | 80 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | |
| ABSTRACT | |
| INTRODUÇÃO | 16 |
| OBJETIVOS | 19 |
| 2. 1 Geral | 19 |
| 2. 2 Específicos | 19 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 3. 1 Telúrio | 20 |
| 3. 2 Compostos derivados do telúrio | 21 |
| 3.2.1 Organotelurana RF07 | 23 |
| 3. 3 Propriedades farmacológicas do telúrio | 25 |
| 3.3.1 Atividade oxidante | 25 |
| 3.3.2 Inibição de enzimas proteases | 26 |
| 3.3.3 Atividade antimicrobiana | 27 |
| 3.3.4. Atividade antitumoral | 28 |
| 3. 4 Toxicologia do Telúrio | 29 |
| 3. 5 Modelos de estudo para avaliações toxicológicas de compostos químicos | 30 |
| 3.5.1 Bioensaio <i>Allium cepa</i> | 30 |
| 3.5.2 Teste de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 31 |
| 3.5.3 Bioensaios de letalidade em <i>Artemia salina</i> (BSLB) | 33 |
| 3.5.4 Ensaio de viabilidade celular | 34 |
| 3.5.5 Teste de micronúcleos | 35 |
| 3.5.6 Ensaio cometa | 37 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 38 |
| CAPÍTULO I | |
| AVALIAÇÃO CITOTÓXICA, MUTAGÊNICA E ANTITUMORAL DA ORGANOTELURANA RF07 | 47 |
| RESUMO | 48 |
| ABSTRACT | 49 |

| | |
|---|----|
| 1 Introdução | 49 |
| 2 Material e método | 51 |
| 2.1 Síntese e determinação das concentrações da Telurana RF07 | 51 |
| 2.2. Bioensaios de letalidade em <i>Artemia salina</i> (BSLB) | 51 |
| 2.3. Ensaio com células meristemáticas de <i>A. cepa</i> | 52 |
| 2.4 Teste do disco central em <i>S. cerevisiae</i> | 53 |
| 2.4.1 Linhagens de leveduras usadas | 53 |
| 2.4.2 Protocolo experimental | 53 |
| 2.5 Teste de hemólise | 54 |
| 2.6 Cultura primária de S180 | 54 |
| 2.7. Viabilidade celular pelo método do MTT | 53 |
| 2.8 Ensaio de viabilidade celular por Alamar Blue | 55 |
| 2.9 Análise estatística | 56 |
| 3 Resultados | 56 |
| 3.1 Avaliação tóxica da RF07 por meio do teste de <i>A. salina</i> | 56 |
| 3.2 Avaliação toxicogenética de RF07 pelo bioensaio de <i>A. cepa</i> | 57 |
| 3.3. Atividade oxidante do composto Telurana RF07 | 60 |
| 3.4 Avaliação hemolítica <i>in vitro</i> | 60 |
| 3.5 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio MTT | 61 |
| 3.5 Avaliação antitumoral do composto RF07 | 62 |
| 4 Discussão | 63 |
| 5 Conclusão | 66 |
| 6 Referências | 66 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| ORGANOTELURANA RF07: PERFIL TÓXICO E GENOTÓXICO EM MODELOS <i>IN VIVO</i> | 70 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| RESUMO | 71 |
| ABSTRACT | 71 |
| 1 Introdução | 72 |
| 2 Materiais e Métodos | 73 |
| 2.1 Síntese e determinação das concentrações da RF07 | 73 |

| | |
|---|----|
| 2.2 Tratamento dos animais com o composto RF07 | 73 |
| 2.3 Teste cometa em sangue periférico de camundongos <i>Mus musculus</i> | 74 |
| 2.4 Teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos <i>Mus musculus</i> | 75 |
| 2.5 Parâmetros hematológicos e bioquímicos | 75 |
| 2.7 Análise estatística | 76 |
| 3 Resultados | 76 |
| 3.1 Avaliação genotóxica do composto Telurana RF07 | 76 |
| 3.2 Avaliação citotóxica e mutagênica do composto RF07 | 80 |
| 3.3 Avaliação nefrotóxica e hepatotóxica da Telurana RF07 em testes hematológicos e bioquímicos em <i>M. musculus</i> | 77 |
| 4. Discussão | 78 |
| 5 Conclusão | 82 |
| 6 Referências | 82 |
| ANEXOS | 88 |
| ANEXO A - Carta de submissão para a revista Elsevier Editorial System for Toxicology <i>in vitro</i> . | 88 |
| ANEXO B – Carta do Comitê de Ética | 90 |

Avaliação toxicogenética do composto Telurana RF-07 em ensaios não clínicos. FELIPE EMANNUEL ALVINO DE JESUS. Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa. 85p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF, Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2017

RESUMO

O telúrio é um elemento químico que faz parte do grupo 16 da tabela periódica, conhecida por família dos calcogênios. O seu uso e de seus compostos inorgânicos e orgânicos cresceu muito nas últimas décadas, sendo utilizados para pesticidas, sistemas biológicos de detecção, nanopartículas, clusters e nanotubos na medicina, tratamento de sífilis e hanseníase e mais recentemente como coadjuvante em terapias anticâncer. Diante da potencialidade para aplicação biológica apresentada pelos compostos derivados do telúrio e a escassa literatura sobre os efeitos toxicológicos das organoteluranas, objetivou-se no presente estudo avaliar os efeitos toxicogenéticos da Telurana RF07, composto orgânico de telúrio, utilizando diferentes células eucarióticas. A toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade, atividade antitumoral, efeitos oxidativos e genotoxicidade foram avaliados por meio dos ensaios de *Artemia salina*, *Allium cepa* e *Saccharomyces cerevisiae*, bem como testes de viabilidade celular por MTT e Alamar Blue além de avaliar células do sangue periférico de *Mus musculus*, submetidos a doses aguda da Telurana RF07, através do ensaio cometa, teste de micronúcleos e testes hematológicos e bioquímicos. Em *Artemia salina*, *Allium cepa* e *S. cerevisiae*, as concentrações foram de 5, 10 e 20 µg/ml. Nos tratamentos em *Mus musculus*, as doses usadas foram de 1, 50 e 100 µMol/kg. Os resultados mostraram que a Telurana RF07 apresentou efeitos tóxicos em *A. salina* e *A. cepa*, além de causar parada no ciclo celular e mutagenicidade pelo baixos índices mitóticos e alterações cromossômicas observados nas concentrações avaliadas. Ademais, a RF07 não causou hemólise, porém causou citotoxicidade, em baixas concentrações, em todas as linhagens tumorais expostas ao composto. A substância inibiu significativamente o crescimento de linhagens deficientes em defesas antioxidantes o que caracteriza a RF07 como oxidante, o que provavelmente explicaria os efeitos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos em células de sangue periférico e de medula óssea de *Mus musculus*. Por fim, o composto orgânico causou alterações leucocitárias e efeitos hepatotóxicos *in vivo*. Os possíveis mecanismos de ação da RF07 podem ser explicados por estudos prévios com outros compostos inorgânicos ou orgânicos a base de telúrio, no qual mostram a capacidade de ligação ao DNA, ativação de diferentes caspases, indutores de apoptose e inibidores de topoisomerasas. Portanto, a organotelurana RF07 se mostrou tóxica e com potencialidade para atividade antitumoral, necessitando assim de estudos adicionais para determinação de concentrações seguras para sua utilização na biologia e medicina.

Palavras-chave: Telúrio; Organoteluranas, Mutagenicidade, Genotoxicidade, Citotoxicidade.

Toxicogenic evaluation of the compound Telurana RF-07 in non-clinical trials.
FELIPE EMANNUEL ALVINO DE JESUS. Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa. 85p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF, Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2017

ABSTRACT

Tellurium is a chemical element that is part of periodic table group 16, which is known as the chalcogen family. Considering the potential for biological application presented by the compounds derived from tellurium, and the scarce literature, the objective of this study was to evaluate the toxicogenic effects of telurane RF07, an organic compound of tellurium, using different eukaryotic cells. The toxicity, cytotoxicity, mutagenicity, antitumor activity, oxidative effects and genotoxicity were evaluated by the *Artemia salina*, *Allium cepa* and *Saccharomyces cerevisiae* assays as well as the cell viability tests by MTT and Alamar Blue. In addition, it was evaluated the peripheral blood cells of *Mus musculus*, when submitted to acute doses of telurane RF07, through the comet assay, micronucleus test, and hematological and biochemical tests. In the *Artemia salina*, *Allium cepa* and *S. cerevisiae* essays, the concentrations were 5, 10, and 20 µg/ml. In the *Mus musculus* treatments, the doses of telurana RF-07 used were of 1, 50 and 100 µMol/kg. The results showed that the chemical compound in question (Telurana RF07) had toxic effects on *A. salina* and *A. cepa*, besides causing cell cycle stop and mutagenicity due to the low mitotic indexes and chromosomal alterations observed in the 03 evaluated concentrations. In addition, RF07 caused cytotoxicity at low concentrations in all tumor lines exposed to the compound. The substance significantly inhibited the growth of deficient lineages in antioxidant defenses which characterizes RF07 as an oxidant, which would probably explain the genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects in peripheral blood and bone marrow cells of *Mus musculus*. Finally, the organic compound caused myelosuppression and hepatotoxic effects *in vivo*. The possible mechanisms of action of RF07 can be explained by previous studies with other inorganic or organic compounds based on tellurium, in which they show the capacity of DNA binding, activation of different caspases, inducers of apoptosis and inhibitors of topoisomerases. Therefore, organotellurium RF07 showed toxicity and had a potential for antitumor activity, thus requiring additional studies to determine safe concentrations for its use in biology and medicine.

Keywords: Tellurium, Organoteluranes, Mutagenicity; Genotoxicity, Cytotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

O Telúrio (Te) é um semi-metal pertencente a um grupo de elementos conhecidos como calcogênios, podendo se apresentar em diferentes estados de oxidação: telurato (Te^{+6}), telurito (Te^{+4}), telúrio elementar (Te^0) e telureto (Te^{-2}). É encontrado em muitos minérios e se apresenta em maior frequência na forma de teluretos de ouro. No Brasil, a química do telúrio foi introduzida pelo Prof. Reinbolt, que realizou estudos sistemáticos de compostos orgânicos contendo telúrio e sua aplicação como intermediários em síntese orgânica (COMASSETO et al. 1996; ZENI et al., 2003; MASSARDO et al., 2009).

O telúrio é conhecido como um metaloide não essencial e nocivo e seus efeitos tóxicos em organismos vivos são pouco conhecidos (NOGUEIRA et al., 2004). São raros os casos de intoxicação ocupacional aguda por telúrio. Entretanto, quando ocorrem, os sintomas observados são: dores de cabeça, sonolência, náuseas, alteração da frequência cardíaca, bem como odor característico de alho, na respiração e na urina (TAYLOR, 1996). Mesmo que o átomo de telúrio seja geralmente considerado como um metaloide tóxico, os seus efeitos biológicos e de alguns derivados inorgânicos e orgânicos têm sido estudados apresentando um leque de aplicações interessantes e promissoras em algumas terapias alternativas, a inibição do *Plasmodium falciparum* por alguns compostos derivados do telúrio é um exemplo promissor de um possível tratamento alternativo da malária (CUNHA et al. 2009, MALUF et al., 2015).

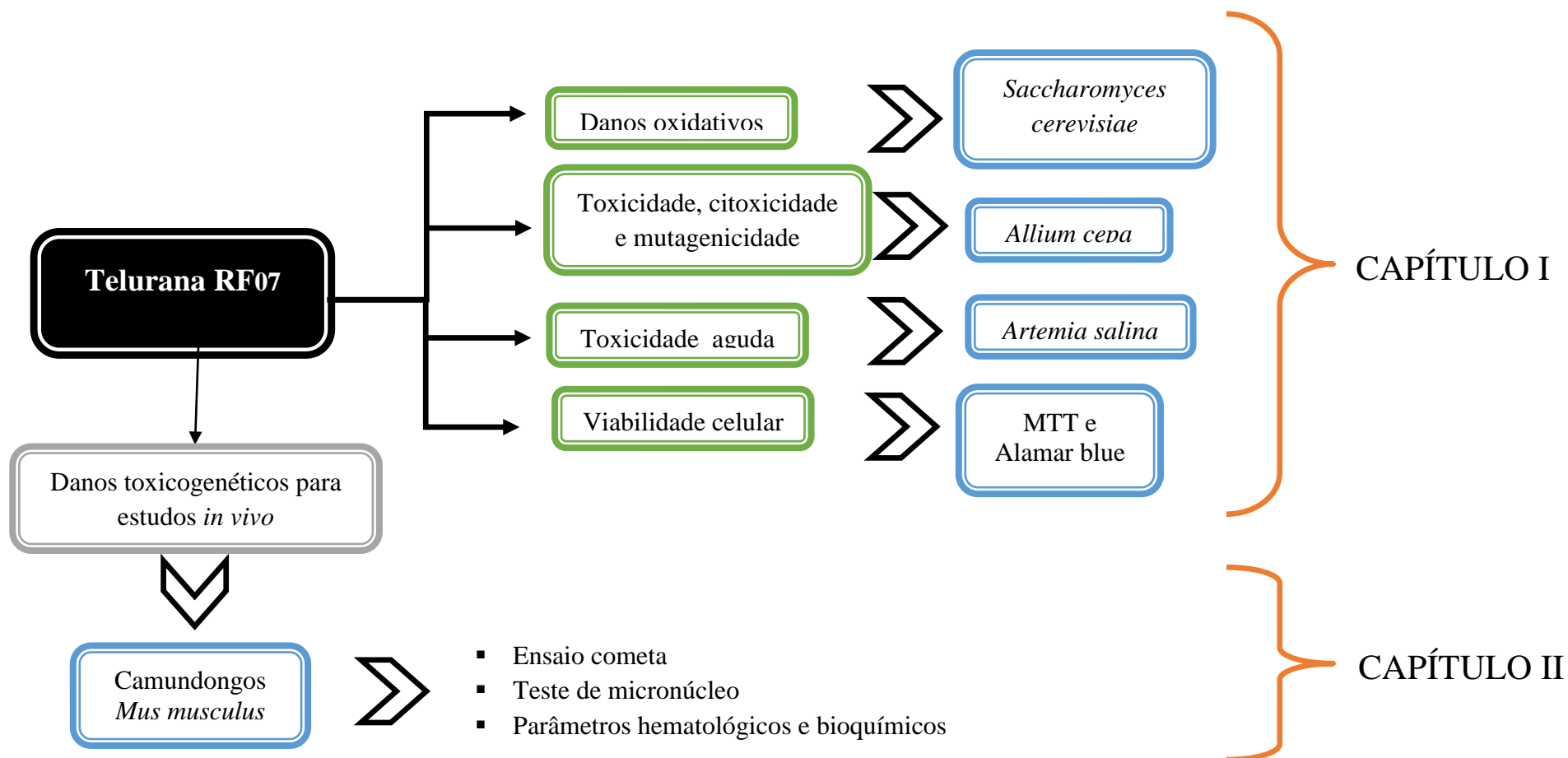
Evidências sugerem que grande parte da atividade biológica dos compostos que apresentam telúrio em sua estrutura está diretamente relacionada às suas interações químicas específicas com tióis endógenos, ou seja, esses compostos têm a capacidade de oxidar os grupamentos sulfidrílicos, podendo inativar enzimas e/ou diminuindo a concentração de moléculas sulfidrílicas (REN et al., 2001; HASSAN et al., 2009).

Os estudos realizados com o composto derivado do telúrio, AS-101 demonstraram atividade imunomoduladora, anti-inflamatória, podendo ainda ser empregados como drogas antitumorais e antivirais (FREI et al., 2008; SREDNI-KENIGSBUCH et al., 2008; HAYUN et al., 2009; FREIDMAN et al., 2009). Foi observado também a proteção e restauração dos neurônios dopaminérgicos em modelos de doença de Parkinson (SREDNI-KENIGSBUCH et al., 2008), e, em combinação com agentes terapêuticos, pode servir como ferramenta para a interação entre as células de mieloma e o

microambiente da medula óssea (HAYUN et al., 2009). Os teluretos são eficientes drogas antitumorais por exercer atividade citotóxica em estudos *in vitro* (ENGMAN et al., 2000; CUNHA et al., 2005; GAY et al., 2010). A organotelurana RF-07 exerce efeito anticonvulsivante (PERSIKE et al., 2008), antifúngico (BARBOSA, JABES, NUNES, 2014); leishmanicida (PIMENTEL et al., 2012) e antimalárica (MALUF et al., 2015).

Diante das promissoras aplicações biológicas apresentadas pelos compostos derivados do telúrio, em especial RF07, e a escassa literatura sobre a toxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade e efeitos oxidativos dos compostos orgânicos, o presente estudo objetivou realizar um perfil toxicogenético do composto RF07 por meio dos ensaios de disco central de *S. cerevisiae*, bioensaio *Allium cepa*, bioensaio de letalidade em *Artemia salina* bem como ação antitumoral com os testes de viabilidade celular por MTT e Alamar Blue além de avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade nas células do sangue periférico e medula óssea de *Mus musculus*, submetidos a doses aguda da telurana, através do ensaio cometa e teste de micronúcleos e ainda avaliação de parâmetros bioquímica e hematológica. Esta dissertação foi estruturada em capítulos (**Figura 1**): Um estudo não-clínico da avaliação dos danos oxidativos, tóxico, citotóxico e genotóxico, hemolítico induzidos pela Telurana RF07 em *S. cerevisiae*, *Allium cepa* e *Artemia salina*, juntamente com os testes de viabilidade celular MTT e Alamar blue e avaliação hemolítica (**Capítulo I**); bem como os danos genotóxicos e mutagênicos da Telurana RF07 em *Mus musculus* através do ensaio do cometa e teste de micronúcleos, respectivamente, além das avaliações hematológicas e bioquímicas (**Capítulo II**).

Figura 1. Divisão esquemática do corpo da dissertação



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos toxicogênicos *in vitro e in vivo* da organotelurana RF07 em modelos celulares eucarióticos e em camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

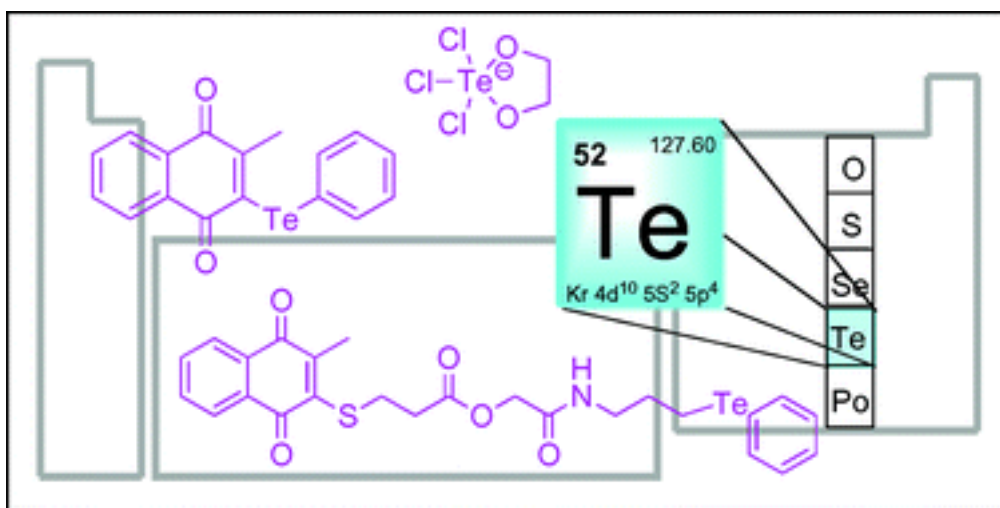
- Avaliar os efeitos oxidantes da organotelurana RF07 em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Verificar os efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos da organotelurana RF07 em *Allium cepa*, *Artemia salina* e hemácias de mamíferos.
- Identificar o potencial antiproliferativo *in vitro* da organotelurana RF07 em células tumorais humanas e murinas;
- Avaliar os efeitos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos da organotelurana RF07 em células de medula óssea e de sangue periférico em camundongos *Mus musculus* por meio dos testes *in vivo* de cometa e micronúcleos;
- Analisar o perfil hematológico da toxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade da organotelurana RF07 em camundongos *Mus musculus*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Telúrio

O telúrio (Te) (**Figura 2**) é um membro não radioativo da família dos calcogênios (grupo 16) que também inclui oxigênio, enxofre e selênio. O nome telúrio tem sua origem no latim "*tellus*", que significa "terra", e foi descoberto por FJ Mueller von Reichenstein em 1782 nas minas de ouro na Transilvânia. Esse semimetal é mais frequentemente encontrado na forma de teluretos de ouro ou em combinação com outros metais (CUNHA, 2009; CHIVERS et al., 2015).

Figura 2. Localização do telúrio na tabela periódica.



Fonte: American Chemical Society (2012).

O telúrio pode ser encontrado na forma de telureto (Te^{-2}), telúrio elementar (Te^0), telurato (Te^{+6}), telurito (Te^{+4}), telurito inorgânico (TeO_3), Telurato (TeO_2) e nas suas formas orgânicas dimetil telureto (CH_3TeCH_3) dependendo do estado de oxidação. O Te é usado na composição de ligas metálicas, borrachas, nas indústrias de microchips e de componentes eletrônicos onde é usada a forma elementar (Te^0) (CUNHA et al., 2009; CHASTEEN et al., 2009; CHIVERS et al., 2015). Também está presente como componente da produção de discos ópticos Blu-ray (PERRIER et al., 2003), na criação de pontos quânticos fluorescentes, que podem ser utilizados como sondas em sistemas biológicos de detecção (DENG et al., 2007, BA LA et al., 2010); na agricultura, como componente de inseticidas, bactericidas e fungicidas (KORMUTAKOVA; KLURCAR;

TURNA, 2000, MASSARDO et al., 2009) e na medicina e eletrônica, como a criação de nanopartículas de telureto, clusters e nanotubos (TIAN et al., 2012).

Adicionalmente, destaca-se a síntese de *nanorods* de telúrio, que são nanoestruturas em formato de bastão utilizados em diagnóstico molecular e terapias direcionadas. Os *nanorods* também apresentam boa compatibilidade hematológica distante dos níveis de toxicidade comumente observados em outras aplicações do telúrio. No entanto, embora demonstrada a ação antioxidante e anticancerígena dos *nanorods* de telúrio, a baixa estabilidade e os complexos métodos sintéticos para construção dessas nanoestruturas têm limitado substancialmente as suas aplicações (HUANG et al., 2016).

Também houve avanços na área farmacológica com os compostos a base de telúrio, apresentando ação anticancerígena (HAYUN et al., 2006 e SREDNI, 2012), antibacteriana (CUNHA; GOUVEA; JULIANO, 2009) e fungicida (BARBOSA; JABES; NUNES, 2014)

3.2. Compostos derivados do Telúrio (Te)

O primeiro composto orgânico de telúrio chamados de organoteluranos hipervalentes (teluranas), foi sintetizado por Friedrich Wöhler em 1840 (QUINES et al., 2013). Desde sua descoberta até a segunda metade do século passado, a química das organoteluranas desenvolveu-se de forma rápida, mas somente a partir de 1870, as propriedades farmacológicas e toxicológicas desses compostos chamaram a atenção dos pesquisadores. As teluranas são compostos artificiais e apresentam em sua estrutura átomos de telúrio ligados a halogênios, átomos de carbono ou a outros calcogênios. A literatura relata que a intoxicação por exposição acidental, ocupacional ou mesmo da tentativa de homicídio ou suicídio com esses compostos é bastante escassa (CUNHA et al., 2005; REZANKA; SINGLER, 2008; NOGUEIRA; ROCHA, 2012;).

O mecanismo toxicológico dos compostos orgânicos pertencentes à família dos calcogênios (O, S, Se, Te e Po) ainda não foi completamente entendido (LACERDA, 2012). No entanto, uma das explicações mais pertinentes reside na ação inibitória sobre várias enzimas através da interação com grupamentos tióis (-SH) de moléculas biologicamente ativas, sendo observado principalmente nos organotelúrios (ANDRADE, 2012). Esses compostos têm a capacidade de oxidar – SH de baixo peso molecular inativando enzimas e/ou diminuindo a concentração de moléculas sulfidrílicas não proteicas (BARBOSA et al., 1998; NOGUEIRA et al., 2003).

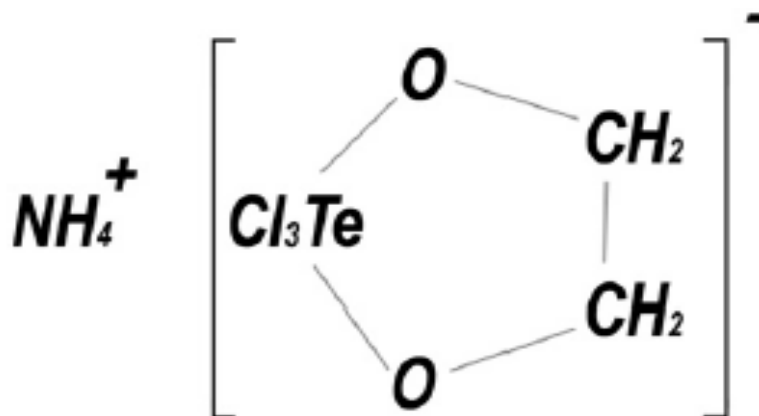
As teluranas se mostraram eficientes na inibição de cisteíno-proteases (Catepsina B). Essa enzima está envolvida no processo de metástase, na invasão tumoral e são produzidas em grandes quantidades por células cancerígenas, mostrando assim, uma alternativa promissora no tratamento do câncer (CUNHA et al., 2005).

Estudos com compostos orgânicos de telúrio mostraram potente ação neurotóxica, através da inibição de uma enzima sulfidrílica (esqualeno monooxigenase), que é importante para a biossíntese do colesterol precursor da bainha de mielina. A inibição da função catalítica causa desmielinização das células de Schwann. Esse mecanismo explica um quadro conhecido como neuropatia induzida por telúrio (LADEN e PORTER, 2001).

Outros estudos reforçam a ação inibitória enzimática desses compostos ao identificarem a capacidade do ditelureto de difenila (PhTe)₂ em inibir a enzima sulfidrílica lactato desidrogenase em diferentes tecidos (LUGOKENSKI et al., 2010). Além disso, em baixas concentrações inibe a Na⁺/K⁺/ATPase, outra importante enzima sulfidrílica na manutenção da atividade neural normal (BORGES; ROCHA; NOGUEIRA, 2005).

Apesar das desvantagens observadas, os compostos orgânicos de telúrio apresentam importantes propriedades farmacológicas, dentre elas atividade anti-inflamatória, imunomoduladora, anti-helmíntica e bactericida, podendo ainda ser empregados como drogas antitumorais e antivirais (SREDNI-KENIGSBUCH, 2008; FRIEDMAN et al., 2009; NOGUEIRA; ROCHA, 2012).

O telurato de tricloro amônio-dioxoetileno-O,O'(AS-101) (**Figura 3**) é uma telurana inorgânica com uma variedade de funcionalidades biológicas: atividade imunomoduladora, auxilia na proteção contra os efeitos deletérios da radioterapia ou da quimioterapia, podendo ser usada também como drogas antitumorais e antivirais. O AS-101 apresentou também uma atividade de inibição do crescimento de parasitas (*Babesia rodhani*) por meio da indução da produção de óxido nítrico além de efeito antioxidante, anti-apoptótico e anti-inflamatório (CUNHA, 2005; OKUN et al., 2007). Esse composto também foi testado em células de melanoma B16 apresentando um efeito irreversível e inibitório sobre a atividade da catepsina B de forma direta promovendo a oxidação do tiól catalítico destas enzimas e indiretamente por meio da via de oxidação dos tióis de cisteína dentro de integrinas específicas. As inibições destas enzimas são dependentes da ausência de agentes redutores pois estes podem suprir a atividade inibitória (CUNHA, 2005; SREDNI, 2012).

Figura 3: Estrutura química da telurana AS-1

Fonte: Halpert et al. (2014).

O telúrio e seus compostos inorgânicos são biologicamente ativos e interagem de forma específica com os organismos. Algumas cepas de bactérias e fungos são capazes de metabolizar os sais de telúrio resultando em uma forma volátil (odor de alho) como forma de defesa liberando no meio no qual se encontram, essa metabolização também pode ocorrer em mamíferos. A administração de sais de telúrio em animais leva à formação de Te^0 e $(\text{H}_3\text{C})_2\text{Te}$ e são eliminados na respiração, urina e suor (CHASTEEN; BENTLEY, 2003). Há compostos orgânicos a base de telúrio capazes de serem seletivamente incorporados às células tumorais e inibirem o sistema tiorredoxina redutase (SHAABAN; AFIF; EL-TAHER, 2009).

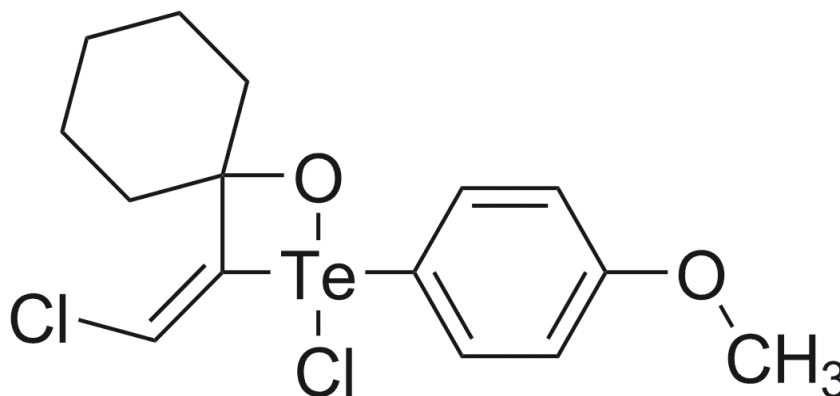
O ditelureto de 3,3'-diaminodifenila e o ditelureto de 4,4'-diisopropildifenila induziram apoptose em cultura de células de leucemia promielocítica humana (linhagem HL-60) em concentrações da ordem de $1 \mu\text{M}$ (SAILER et al., 2003). Efeitos semelhantes puderam ser observados mediante avaliação do efeito citotóxico do ditelureto de 2,2'-dimetoxidifenila e ditelureto de 3,3'-5,5'-tetrametildifenila na mesma linhagem celular (SAILER et al., 2004).

3.2.1 Organotelurana RF07

A organotelurana RF-07 (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-($\lambda\alpha\mu\beta\delta\alpha$)4-telurasp[3.5]non-2-il}fenil Metil Éter) (**Figura 4**), também conhecida por organoteluroxetana RF-07 ou simplesmente telurana RF07, é um composto orgânico a

base de telúrio de peso molecular 427,5 g/mol obtido pela reação de p-metoxifenilo Telúrio com 1-etinil-1-ciclo-hexanol em refluxo de benzeno. Dentre suas atividades biológicas, destaca-se as ações antifúngica (BARBOSA; JABES; NUNES, 2014), leishmanicida (PIMENTEL et al., 2012) e antimalárica demonstrada pela potente ação inibitória de cisteína proteases dependentes de cálcio (caspases) em duas cepas de *Plasmodium falciparum* (CQS 3D7 e CQR W2) (MALUF et al., 2015). Essa maquinaria proteolítica é imprescindível para a manutenção da sobrevivência do parasito no meio intracelular, pois é a principal responsável pelo suprimento de aminoácidos, sendo estes assimilados como fonte de nutrientes ou matéria prima para síntese de outros compostos orgânicos necessários à manutenção do microrganismo (LOPES et al., 2010).

Figura 4. Estrutura química da Telurana – RF 07.



Fonte: Persike (2008)

Objetivando verificar se a telurana RF07 poderia modificar o padrão de convulsão, Persike et al. (2008) em seus estudos, administrou o composto antes da pilocarpina. Com isso, conseguiu-se observar que o pré-tratamento bloqueou, significativamente, o comportamento e sinais eletrográficos do estado epilético. A inibição pode ser decorrente não só da modificação de tiol catalítico como acontece com a catepsina B, mas também pela modificação de sítios alostéricos de cisteína (PERSIKE et al., 2008).

Também foi avaliada a atividade antifúngica desse composto, comprovando uma inibição significativa do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* na concentração de 2 μ M, onde a avaliação de hibridação em microarranjos de DNA mostra que a expressão de mais de 400 genes é afetada quando o fungo é exposto ao composto e que o possível

mecanismo pode estar relacionado à inibição na produção de esfingolípídeos (BARBOSA; JABES; NUNES, 2014).

Pimentel et al. (2012) demonstraram em estudos *in vitro* com macrófagos da medula óssea de camundongos albinos Balb/c infectados com amastigotas da *L. (L) chagasi* que a RF07 teve atividade proteolítica específica sobre os substratos, que são moléculas químicas que sofrem ação catalítica de enzimas. O substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC N- [1 - [[5- (diaminometilidenoamino) -1 - [(4-metil-2-oxocromen-7-il)amino]-1-oxopentan-2-il]amino]-1-oxo-3-Fenilpropan-2-il]carbamato foi o único catalisado (hidrólise) por todas as catepsinas do tipo L, B, K, V e S, revelando-se como o principal alvo da RF07 e comum a todas essas catepsinas citadas. As cisteíno peptidases lisossomais K, L e V estão envolvidas no desenvolvimento de doenças como osteoporose, câncer de pele e aterosclerose, respectivamente (PIMENTEL et al.2012).

3.3 Propriedades farmacológicas dos compostos derivados do Telúrio

3.3.1 Atividade oxidante

O estresse oxidativo é desencadeado pelo desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resultando na indução de danos celulares pelas espécies reativas de oxigênio (EROS), porém, pode ser definido também como uma consequência de um aumento da produção de radicais livres e/ou diminuição da atividade fisiológica das defesas antioxidantes contra os radicais livres (POLJSAK; ŠUPUT; MILISAV, 2013). A produção de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico a qual resulta na formação de um mecanismo de defesa antioxidante que tem a finalidade de limitar os níveis intracelulares de radicais livres e controlar a ocorrência de danos decorrentes (BARBOSA et al., 2010).

Há evidências de que o estresse oxidativo pode ser um fator de risco, fazendo parte da fisiopatologia de um grande número de doenças, como a sua causa ou consequência (GRAHAME; SCHLESINGER, 2012). Schiar et al. (2007) sugerem que a geração de radicais livres por compostos a base de telúrio através da oxidação do tiol endógeno induz hemólise *in vitro* em eritrócitos humanos.

O composto (PhTe)₂ provoca um aumento acentuado na formação de TBARS cerebral e redução na atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GR, GPx e TrxR, interagindo com grupos funcionais específicos nessas enzimas, sugerindo um possível

envolvimento do estresse oxidativo no cérebro de camundongos resultando em uma neurotoxicidade evidente (MACIEL et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2004; COMPARSI et al., 2012) Além disso, estudos demonstram que o $(\text{PhTe})_2$ na dose de 0,9 mMol/kg causou diminuição da atividade da superóxido desmutase, provando que a exposição aguda produz dano oxidativo no pulmão de ratos jovens (PINTON et al., 2011).

O $(\text{PhTe})_2$ também pode ocasionar comprometimento da memória de reconhecimento de camundongos por meio da interação entre o sistema glutamatérgico e a atividade da bomba sódio potássio (Na^+/K^+ ATPase). As ações pós-sinápticas do glutamato são rapidamente encerradas por sistemas de absorção, predominantemente em astrócitos. O glutamato é cotransportado com o Na^+ em astrócitos e a concentração intracelular de Na^+ aumenta suficientemente para ativar a Na^+/K^+ ATPase. Conseqüentemente, a inibição na atividade cerebral da bomba sódio potássio pode estar relacionada à inibição da captação de glutamato causando nos camundongos um comprometimento cognitivo após exposição ao $(\text{PhTe})_2$ (STANGHERLIN et al 2009).

3.3.2 Inibição de enzimas proteases

As proteases ou enzimas proteolíticas atuam na hidrólise seletiva de ligações peptídicas. Participam de uma grande variedade de processos fisiológicos, que incluem a reciclagem de proteínas, a digestão, a coagulação sanguínea e cicatrização, a fertilização, a diferenciação e crescimento celular, a sinalização celular, a resposta imunológica e a apoptose (EREZ, FASS e EITAN, 2009).

As subfamílias de catepsinas L e B são avaliadas nos estudos da *Leishmania*, sendo a última expressa em grandes quantidades nas formas amastigotas e estão localizadas em maior quantidade nos megassomos, que são lisossomos diferenciados denominados (LOPES, 2010).

Existem dois possíveis mecanismos para a inativação das proteases por compostos de telúrio, no primeiro o resíduo de tiol da cisteína protease (nucleófilo) se liga ao átomo de telúrio e em seguida ocorre a saída de um átomo de halogênio, formando uma molécula final enzima-inibidor, inativando irreversivelmente a enzima. O segundo mecanismo o composto de telúrio perderia um halogênio, gerando uma espécie carregada positivamente que em seguida reage com o nucleófilo, resultando em uma molécula que inativa a enzima. No entanto, até o momento estas hipóteses não foram confirmadas e o mecanismo ainda continua desconhecido. O que se sabe, é que

apenas um átomo de halogênio é substituído durante a inibição das proteases ou em ensaios empregando o aminoácido cisteína. (ALBECK et al., 1998; CUNHA, 2009)

As teluranas orgânicas (organoteluranas) são inibidores de cisteíno proteases mais potentes do que o AS-101. As organoteluranas têm sido estudadas como inibidores de proteases abrindo a perspectiva de estudá-las em processos associados à atividade dessas enzimas, tais como na angiogênese, em células de melanoma e na indução de apoptose em células tumorais humanas. Também são capazes de inibir a atividade da catepsina B, enzima que apresenta relação direta com a carga parasitária da *Leishmaniose* (ABODANZA et al., 2008; LOPES, 2010).

3.3.3 Atividade antimicrobiana

As organoteluranas também demonstraram uma considerável expressão inibitória sobre enzimas de protozoários do gênero *Leishmania*, que compreende parasitas que se desenvolvem alternadamente em hospedeiros mamíferos e insetos vetores (PIMENTEL et al., 2012). A atividade proteolítica em parasitos desse gênero foi primeiramente reportada em promastigotas de *L. mexicana* e as cisteíno-proteases foram as principais proteases detectadas. Essas proteases têm sido bastante estudadas, pois participam da invasão ao hospedeiro; da assimilação de aminoácidos como fonte nutricional ou para síntese de substâncias orgânicas no metabolismo de proteínas ou peptídeos biologicamente ativos; na diferenciação e no escape ao sistema imune do hospedeiro; ou ainda na resistência do parasito à terapia medicamentosa (MCKERROW et al., 2006, LOPES, 2010).

Foi demonstrado que a organotelurana RT01 foi capaz de apresentar atividade leishmanicida contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (LIMA et al., 2009). Além disso, a organotelurana experimental RF07 foi capaz de inibir a proliferação de *L. (L.) chagasi* em ensaios *in vitro* (macrófagos) e *in vivo* (hamsters), em concentrações não tóxicas para o hospedeiro (PIMENTEL et al., 2012).

Um grupo de compostos derivados do telúrio apresentou significativa inibição de bactérias gram positivas e negativas, evidenciando um potente efeito sobre *P. aeruginosa* (GUPTA; KUMAR e CHADRASHEKHAR, 2005). Foi visto que a telurana inorgânica AS101 tem um efeito significativo contra o vírus do Nilo Ocidental tanto *in vitro* como *in vivo* (INDENBAUM et al., 2012). Em condições aeróbicas, a exposição ao tellurite provocou um estado de estresse oxidativo que prejudica significativamente a

funcionamento da cadeia de transporte eletrônico de *E. coli* (DÍAZ-VÁSQUEZ et al. 2010).

3.3.4. Atividade antitumoral

A atividade antitumoral do iodeto de carbazinina de tiateilura foi observada pela presença de células em ensaios *in vitro*, em que o composto era mais tóxico para as células de colon carcinoma CX-1 do que para a linhagem celular epitelial CV-1. Em testes *in vivo*, a administração prolongou significativamente a sobrevivência de ratos implantados com tumores. A ação de tiotetilocarcocianina nas mitocôndrias foi atribuído pela semelhança dos efeitos bem conhecidos de compostos análogos, como um tiopirilium sal AA1, que é um potente inibidor de hidrólise de ATP mitocondrial (CUNHA et al., 2009).

A aplicação terapêutica como fármacos anti-metastáticos, compostos derivados do telúrio, está associada à inibição da catepsina B e depende da ausência de agentes redutores, uma vez que a presença de tais agentes suprime a inibição. Este fato sugere que os compostos de Te (IV) podem ser eficazes apenas contra a forma extracelular de catepsina B, já que o citoplasma das células contém uma grande quantidade de agentes redutores, como glutatona, cisteína, NADPH, entre outros. Em células normais, catepsina B é armazenada no lisossomo, mas em células cancerosas ocorre um aumento de 4 a 30 vezes na membrana plasmática da superfície celular. Estes fatos indicam que os compostos de Te(IV) podem ser eficazes somente na superfície celular sem interferir com as catepsinas B lisossômicas das células normais (CUNHA et al., 2005)

Os compostos de organotelúrio também são usados na terapia fotodinâmica (PDT). PDT desenvolveu-se como uma terapia alternativa contra o câncer e adquiriu aprovação regulamentar em vários países para carcinomas do pulmão, trato digestivo e trato genitourinário. O princípio desta terapia baseia-se no uso de um agente sensibilizador que é capaz de interagir com a luz produzindo espécies citotóxicas ou uma reação citotóxica em carcinoma tumoral, um oxigênio singlete (O_2) ou superóxido de oxigênio molecular (LEONARD et al., 1999). O agente sensibilizador é geralmente porfirinas, ftalocianinas ou corantes, e pode apresentar uma preferência com células tumorais. O dano induzido por compostos contendo telúrio e selênio foi verificado por mudanças morfológicas pronunciadas nas mitocôndrias a partir de células de glioma humano apresentando-se sensibilizadores mais eficientes do que os outros calcogênios. (CUNHA et al., 2009)

3.4. Toxicologia do Telúrio (Te)

Alguns órgãos como a pele e os rins sofrem ação da toxicidade pelo Te. A toxicidade dos compostos orgânicos de Te pode ser causada pela interação com –SH de moléculas biologicamente ativas. A capacidade desses compostos de oxidar essas moléculas inativa as enzimas e/ou diminui a concentração de moléculas sulfidrilicas não-proteicas (TAYLOR, 1996; NOGUEIRA, 2003).

A neurotoxicidade dos compostos derivados do telúrio está associada ao bloqueio da síntese do colesterol, um antecessor da mielina através da via de inibição da enzima sulfidrilica esqualeno monooxigenase, O resultado desse processo é a desmielinização ou hipomielinização neuronal, que pode ser as possíveis razões das neuropatias (LADEN e PORTER, 2001).

A enzima desidratase do ácido d-aminolevulínico δ -ALA-D apresentam em seu sítio ativo dois resíduos de cisteinil que sofrem oxidação tanto *in vitro* como *in vivo* por compostos derivados de telúrio tornando-as alvos principais desses compostos. A inibição da δ -ALA-D no fígado e cérebro por esse processo foi observado em camundongos após administração aguda e subcrônica de compostos contendo telúrio (MACIEL et.al. 2000; MEOTTI et.al. 2003; NOGUEIRA, et.al. 2003).

O composto $(\text{PhTe})_2$ e seu análogo Disseleneto de difenila $(\text{PhSe})_2$ promovem a inibição da enzima sulfidrilica lactato desidrogenase em tecidos. O $(\text{PhTe})_2$ em baixas concentrações inibe a atividade da Na^+K^+ -ATPase – enzima importante para sustentação da atividade neuronal normal (BORGES et al., 2005; LUGOKENSKI et.al., 2010). Ditelureto de difenila (Ph_2Te_2) modifica o sistema glutamatérgico em cérebro de ratos adultos e em desenvolvimento ao diminuir a captação de glutamato em sinaptossomas (NOGUEIRA et al., 2012; STANGHERLIN et al., 2009; SOUZA et al., 2009).

Segundo Nogueira et al. (2004), a toxicidade do composto $(\text{PhTe})_2$ é dependente da dose administrada e espécie de animal estudada. O dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato apresentou uma toxicidade baixa quando administrado em camundongos (ÁVILA et al., 2006). Em estudos realizados em ratos com doses 12 e 24 mg/kg/semana de AS101 mostrou alterações patológicas oculares e alterações da medula óssea acompanhadas de reduções da contagem de trombócitos (NYSKA et al., 1989).

A exposição aguda ao 3-metil-1-fenil-2-(fenilseleno)oct-2-en-1-ona, um organocalcogênio, induziu toxicidade hepática, e distúrbios hematológicos em ratos

(LACERDA et al., 2012). O seu análogo estrutural, o 3-butil-1-fenil-2-(fenilteluro) oct-en-1-ona inibiu a atividade da enzima creatina quinase, responsável pela conversão de creatina a fosfocreatina, à custa de ATP (ANDRADE et al., 2012). Stangherlin et al. (2009) demonstraram que a exposição subcrônica ao $(\text{PhTe})_2$, através do leite materno pode levar ao estresse oxidativo em estruturas cerebrais de ratos jovens. Além de causar danos cognitivo após a exposição maternal ao TeCl_4 esta toxicidade está intimamente relacionada à dose administrada e espécie animal estudada (NOGUEIRA et al., 2004).

Células cancerosas foram consideradas mais vulneráveis a compostos de telúrio que as células normais em alguns estudos. O Composto (2-TeCD) com pontes de telúrio, um composto de organotelúrio sintético, exibiu tanto a atividade catalítica de GPx como a atividade de inibidor da tiorredoxina redutase (TrxR). Este composto ajuda a sensibilizar células de câncer de mama e cólon humano para TRAIL (receptor de morte) com base em observações de apoptose *in vivo* e *in vitro*, o que melhorou seu potencial terapêutico (LIN et al. 2011).

Outro estudo realizado por Coriat et al., 2011 demonstrou o uso do catalisador organotelúrico LAB027, que previne o crescimento do câncer de cólon nos camundongos. O TeCl_4 se mostrou citotóxico para as linhagens de células tumorais do intestino por meio da diminuição das GSH/GSSG nas linhagens celulares testadas sugerindo que a toxicidade de Te envolve um processo oxidativo. (VIJ e HARDEJ, 2012)

3.5 Modelos de estudo para avaliações toxicológicas de compostos químicos

3.5.1 Bioensaio com *Allium cepa*

O bioensaio *A. cepa* identifica agentes tóxicos no meio ambiente capazes de interagir e gerar danos ao ciclo celular e/ou ao material genético (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SINHA; KUMAR, 2014, BIANCHI; MANTOVANI; MARIN-MORALES, 2016). Nesse sentido, Leme; Marin-Morales (2009) sugerem que esse sistema é seguro ao avaliar os parâmetros de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade. O teste do *Allium cepa* foi usado para o estudo dos efeitos da metildopa (droga antihipertensiva) sobre o ciclo celular de cebola, indicando uma diminuição do índice mitótico em todas as concentrações testadas e também a possível toxicidade da droga.

Outro estudo sobre o potencial clastogênico de Cypermethrim e Fenvalerate (pesticidas), teve boa correlação com o sistema teste de mamíferos. Dentre outras vantagens importantes cabe ressaltar que esse bioensaio apresenta cromossomos

maiores e em menor número ($2n = 16$) (LEME; MARIN-MORALES, 2009), é de baixo custo, confiável e de fácil manuseio (BIANCHI; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2016).

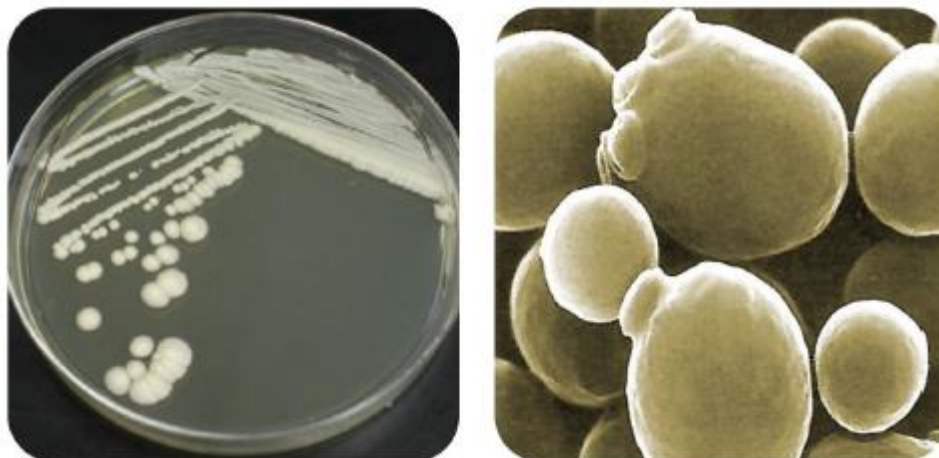
O tamanho médio da raiz (TMR) e o índice mitótico (IM), quando avaliados, determinam a toxicidade e a citotoxicidade de compostos naturais e/ou sintéticos, respectivamente (YILDIZ et al., 2009). Enquanto isso, a genotoxicidade é avaliada pela média total de alterações cromossômicas (AC) resultantes de interferências nas fibras do fuso (efeito aneugênico) como C-metáfases, metáfase com aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, anáfases multipolares, metáfases poliploides, pontes cromossômicas, dentre outras) e/ou a partir de quebras cromossômicas (efeito clastogênico) como pontes cromossômicas e fragmentos cromossômicos (MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011). Em adição, esse bioensaio detecta também micronúcleos (MN) que são estruturas oriundas de quebras cromossômicas ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal (BIANCHI; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2016).

3.5.2 Teste de *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 5) é uma levedura eucarionte e em razão da sua similaridade genética, bioquímica e funcional com alguns organismos é utilizada como modelo em estudos de processos fundamentais para manutenção da vida. (MENACHO-MARQUEZ; MURGUÍA, 2007). São usadas como modelos de pesquisa para análise de atividades tóxicas e/ou oxidantes em várias substâncias por serem de fácil manuseio e de multiplicação celular rápida (HOSTETTER; OSBORN; DE ROSE, 2012).

No teste de *S. cerevisiae* são utilizadas linhagens saudáveis ou mutadas em suas defesas antioxidantes. São comumente utilizadas na avaliação da atividade de composto diante de mecanismos de defesa antioxidante destes organismos (OLIVEIRA et al., 2014). Como todos os aeróbios, a *S. cerevisiae* apresenta uma diversidade de mecanismos de defesa contra danos oxidativos, como atividades enzimáticas, presença de antioxidantes, sequestradores de metais e alguns mecanismos de reparação (BROZMANOVÁ et al., 2001; HENRIQUES et al., 2001).

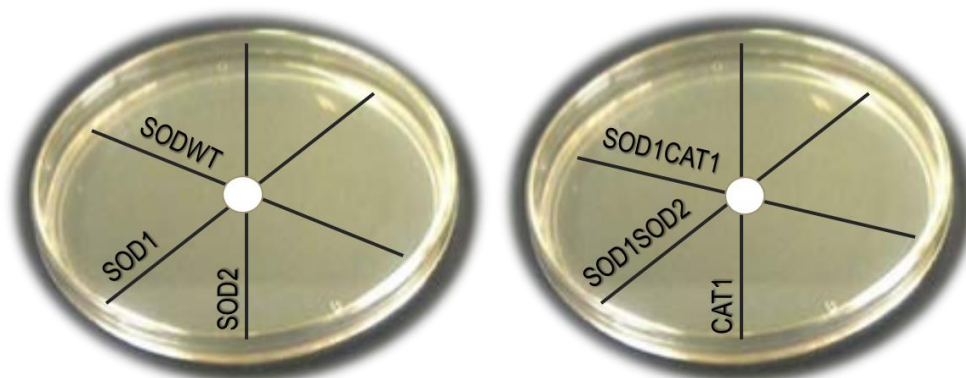
Figura 05: *Saccharomyces cerevisiae* em cultura bem como sua visualização em microscópio de varredura.



Fonte: ZIRPEL et al., (2015)

As linhagens das leveduras são semeadas em meios de cultura sólidos (Figura 6). As linhagens correspondem: EG118 - mutada em laboratório para torna-se deficiente no sistema enzimático quanto à enzima superóxido dismutase citoplasmática (gene *SOD1*); EG110 - não apresenta a *SOD* mitocondrial (gene *SOD2*); EG133 - mutada para ausência das duas enzimas (*SODΔ1* e *SODΔ2*); EG223 - provida de defesa antioxidante para a enzima catalase (*CATΔ1*) e EG103 (*SODWT*) corresponde à linhagem selvagem, apresentando as duas enzimas tanto mitocondrial como citoplasmática.

Figura 6: Semeio das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* para determinação do potencial oxidante ou antioxidante de compostos.



Fonte: Carvalho (2017)

Em testes realizados por Massardo et al., (2009) foi observado em microscópio eletrônico de transmissão que o telurite (TeO_2) sofreu redução quando colocado em células cultivadas de *S. cerevisiae* mostraram escurecimento do meio, provavelmente devido ao telúrio elementar (Te0), produto da redução, formando grandes depósitos ao longo da parede celular e pequenos precipitados tanto no citoplasma como nas mitocôndrias.

3.5.3 Bioensaio de letalidade em *Artemia salina*

Este ensaio foi proposto por Michael e colegas de trabalho em 1959 e foi posteriormente adotado por laboratórios como um método para a estimativa preliminar da toxicidade. Por causa da rapidez, conveniência e baixo custo este ensaio se torna atraente para avaliações toxicológicas. O manuseio em laboratório é simples e barato e é favorecido pela flexibilidade do organismo para fontes de nutrientes, tolerância à temperatura e salinidade, fácil manipulação e alta capacidade reprodutiva. Os resultados dos testes podem ser respostas "binárias" (vivas ou mortas), enzimológicos (biomarcadores enzimáticos), fisiológico (taxas de consumo de oxigênio) ou reprodutivo (por exemplo, saída reprodutiva). *Artemia* pode ser usada sozinha como uma única espécie de teste em estudos toxicológicos ou combinados com várias outras espécies em estudos mais amplos (NUNES et al., 2006; RAJABI et al., 2015).

A avaliação de citotoxicidade é indispensável para considerar a utilização de um composto químico seguro. Compostos sintéticos são quase sempre tóxicos em altas doses. Portanto, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido de um composto químico. O ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de pesquisa não estão preparados para a realização de ensaios biológicos (RUIZ et al., 2005). Esta metodologia se popularizou como bioensaio principalmente a partir da década de 90 (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

O teste de toxicidade com esse microcrustáceo possui uma boa correlação com testes de toxicidade aguda oral *in vivo* (PARRA et al., 2001), quanto em linhagem de células humanas (CARBALLO et al., 2002). O ensaio determina valores de concentração letal média (CL_{50}), em $\mu\text{g/mL}$, de compostos e extratos, sendo que inúmeras substâncias ativas conhecidas apresentam citotoxicidade por este teste (MEYER et al., 1982).

3.5.4 Ensaios de viabilidade celular

O reagente Alamar Blue (resazurina) quando sofre redução é convertido em um composto fluorescente (resorufin). É amplamente aceito que esta redução da resazurina à resorufina ocorre dentro das células vivas pelas enzimas redutoras e, portanto, a fluorescência/absorbância é diretamente proporcional à quantidade de células metabolicamente ativas, ou seja, é um corante usado para medir a viabilidade das células (MUNSHI; TWINING; DAHL, 2014)

As células podem induzir a redução do meio ou reduzir enzimaticamente o Alamar Blue intracelularmente, uma vez que foi encontrada fluorescência no citoplasma e no núcleo. De todas as redutases, as diaforases foram identificadas como as enzimas mais susceptíveis de ser responsável pela redução da resazurina no sêmen (ZALATA et al., 2004). Portanto, as diaforases são bons candidatos para se responsabilizar pela redução da resazurina em resorufin. No entanto, qualquer outra redutase, como a NADH desidrogenase (EC 1.6.99.3) também pode usar a resazurina como um acceptor de elétrons, como mostrado *in vitro* (O'BRIEN et al., 2000).

O MTT é um método que analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula, baseado na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. A solução amarela do MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo (SKEHAN et al., 1990).

O ensaio Alamar blue e MTT são de alta qualidade e são adequados para o rastreio de alto rendimento (HTS) para identificar compostos citotóxicos independentemente do mecanismo subjacente e classe química, e são uma ferramenta eficaz para classificar os compostos com base na sua potencial citotoxicidade intrínseca. No entanto, o ensaio azul de alamar é homogêneo, proporciona uma ligeira vantagem de maior sensibilidade, na medida em que podem detectar densidades celulares tão baixas quanto 200 células/poço. As análises do MTT são colorimétricas, enquanto que no Alamar blue pode ser medida usando a detecção colorimétrica ou de fluorescência. MTT não é um produto solúvel, de modo que as células devem ser lisadas para solubilizar o sal de formazan antes da medição da absorvância. O Alamar blue não requer lise

celular, permitindo o monitoramento cinético das mesmas amostras em diferentes pontos de tempo. (HAMID et al., 2004).

3.5.5 Teste de Micronúcleo (MN) em *Mus musculus*

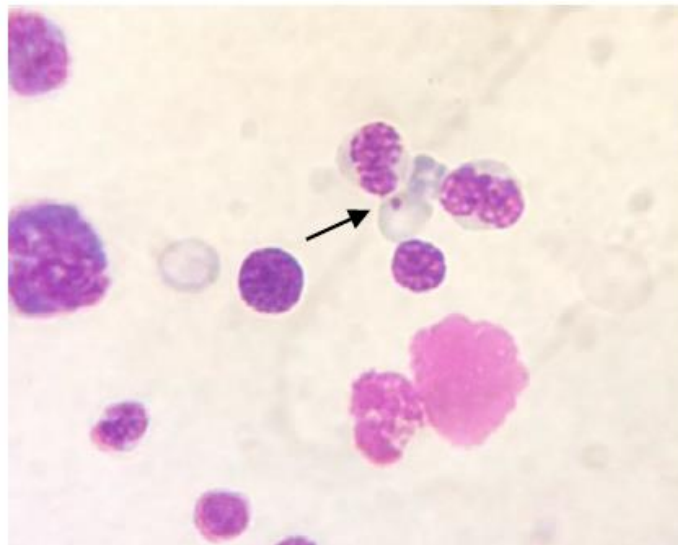
Ensaio com células de roedores vêm apresentando benefícios em relação aos outros, entre as quais podem ser citadas sensibilidade, custo e confiabilidade. Esses testes podem ser feitos em qualquer população de células, desde que esteja passando constantemente por divisão, sendo a medula óssea de mamíferos umas das regiões mais adequadas, visto que as células levam de 22 a 24 horas para completar um ciclo de divisão (HEDDLE, 1973).

Para roedores como *Mus musculus*, o teste de micronúcleo é um dos mais utilizados. Este teste em medula óssea é de fácil manuseio, e está sempre à procura de detectar e quantificar a ação mutagênica ou anti-mutagênica de agentes indutores, tendo uma grande aceitação pelas agências internacionais e instituições governamentais como uma importante bateria de testes a procura de registros de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001).

O teste de micronúcleo se fundamenta na ocorrência de quebras cromossômicas ou falhas na ligação de cromossomos ao fuso, de modo que, o processo de maturação destas células, quando ocorre a expulsão do núcleo, esta não faz de modo integral, permanecendo no citoplasma estruturas resultantes destes eventos os micronúcleos. O teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos de roedores é utilizado para avaliação do potencial de um dado agente em induzir danos cromossômicos (MEIRELES et al., 2013; SANTOS, 2015).

Os micronúcleos (MN) são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que, durante a divisão celular, falham em se ligar às fibras do fuso e, assim, não são incluídos no núcleo das células filhas (Figura 7). Detectam, portanto, a ação de agente aneugênicos e de agentes clastogênicos. Em eritrócitos apresentam forma arredondada e medem cerca de 1/10 a 1/5 do diâmetro do eritrócito (RIBEIRO, 2003).

Figura 7: Fotomicrografia de eritrócito policromático micronucleado em medula óssea de *Mus Musculus* (1000X).



Fonte: Santos, 2015.

O teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos (PCE), que são eritrócitos jovens, foi pioneiramente proposto por Schmid, Matter e Von Ledebuir (1971) e posteriormente modificado por Heddle (1973). Assim, na condução do teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos, é fundamental conhecer a dinâmica de maturação de linhagem que origina os eritrócitos. A primeira célula da linhagem eritroblástica, formada a partir da célula indiferenciada, é o pró-eritroblasto. Este, após quatro divisões origina os eritroblastos, que passam por uma só divisão e dão origem às células nas quais o núcleo é expulso e que se diferenciam primeiramente em eritrócitos policromáticos e, posteriormente, em eritrócitos normocromáticos (NCE) (HOLLAND et al., 2008; VASQUEZ et al., 2010)

O teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongos apresenta muitas vantagens, como: micronúcleos são observados em células de intérfase, dispensando procedimentos de cultura; O teste é realizado baixo custo: A análise é simples e as estruturas são facilmente identificadas; O teste detecta a ação de agentes aneugênicos e clastogênicos. Adicionalmente à genotoxicidade, o teste de micronúcleo propicia também a avaliação da citotoxicidade de uma dada substância através do cômputo da relação $PCE/PCE+NCE$ (VILAR et al., 2008)

3.5.6 Ensaio de cometa

O ensaio cometa vem sendo uma técnica importante no campo de pesquisa para a avaliação de mecanismos genéticos, processos relacionados com danos no DNA e reparação subjacentes. Esta técnica pode ser utilizada como uma técnica sensível para avaliar os danos de DNA induzidos por condições de estresse (SANTOS; POURRUT; OLIVEIRA, 2015).

O ensaio cometa tradicionalmente utiliza suspensões de células, que são incorporados em agarose sobre uma lâmina e levada ao microscópio. As células são expostas a lise por exposição a soluções de detergente e sal elevado (AZQUETA; LORENZO; COLLINS, 2009) possibilitando a remoção de membranas e componentes celulares solúveis, deixando um DNA nucleóide super-enrolado (AZQUETA et al., 2011). Depois de realizada a eletroforese, os fragmentos de DNA migram para o ânodo, formando a cauda do cometa, onde a quantidade de quebras na cadeia é em geral proporcional à quantidade de DNA na cauda, respectivamente, para o DNA remanescente na cabeça (HOVHANNISYAN, 2010).

É um ensaio com alta sensibilidade para detectar genotoxicidade, significando que ele pode detectar ampla variedade de compostos com potencial genotóxico desconhecido e que o ensaio pode também detectar um nível baixo de genotoxicidade de compostos genotóxicos já conhecidos (KAWAGUCHI et al., 2010).

Os linfócitos periféricos são uma ótima escolha para análises deste teste, pois já se encontram no sangue e não precisam da ação de enzimas ou de processo mecânico para seu isolamento, processos estes que podem causar danos adicionais ao DNA. A obtenção é fácil e em grande quantidade, não sendo necessária a realização de cultura celular, o fato de as células estarem quase todas na mesma fase do ciclo e por refletirem o estado do organismo como um todo (BRIANEZI et al., 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABODANZA, T. S. et al. Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL-60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium (IV) compound RT-04. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2540-2545, 2008.
- ALBECK, A. et al. Tellurium compounds: selective inhibition of cysteine proteases and model reaction with thiols. **Inorganic Chemistry**, v. 37, p. 1704-1712, 1998.
- ANDRADE, R. B. Kinetic studies on the inhibition of creatine kinase activity by 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-en-one in the cerebral cortex of rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3468-3474, 2012.
- ÁVILA, D. S.; BEQUE, M. C.; FOLMER, V.; BRAGA, A. L.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C. W.; SOARES, F. A. A.; ROCHA, J. B. T. Diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate: an organotellurium compound with low toxicity. **Toxicology**, v. 224, p. 100-107, 2006.
- AZQUETA, A.; LORENZO, Y.; COLLINS, A. R. In vitro comet assay for DNA repair: a warning concerning application to cultured cells. **Mutagenesis**, v.4, p. 379-81, 2009.
- AZQUETA, A.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, p. 41-45, 2011.
- BA LA, et al. Tellurium: an element with great biological potency and potential. **Rev. Organic e Biomolecular chemistry**, v. 8, p. 4203-4216, 2010.
- BARBOSA, D. A.; JABES, D. L.; NUNES, L. R. Validação dos dados de microarray de *Paracoccidioides brasiliensis* exposto à telurana RF-07 por RT-PCR. **Anais do VIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Mogi das Cruzes**, 2014.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BARBOSA, N. B. V. Effect of organic forms selenium on aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 149, p. 243-253, 1998.
- BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475-483, 2016.
- BORGES, V. C.; ROCHA, J. B.; NOGUIRA, C. W. Effect of diphenyl diselenide, dipheyliditelluride and ebselen on cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats. **Toxicology**, v. 215, p. 191-197, 2005.

BRIANEZI, GABRIELLI, CAMARGO, JOÃO LAURO VIANA DEMIOT, HÉLIO AMANTE. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, 2009.

BROZMANOVÁ J, et al. Increased DNA double strand breakage is responsible for sensitivity of the *pso3-1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to hydrogen peroxide. **Mutat Res.** v.485 n.4 p.345-55, 2001.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 17, 2002.

CARVALHO, R.M. **Efeitos do palmitato de retinol sobre os danos toxicogénicos de antineoplásicos em estudos não clínicos.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Piauí. 172p. 2017.

CHASTEEN TG AND BENTLEY R. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. **Chem Rev** v.103.p. 1–26. 2003

CHASTEEN, T. G. et al. Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. **Microbiology**, v. 33, p. 820-832, 2009.

CHIVERS T.; LAITINEN R.S. Tellurium: a maverick among the chalcogen. **Chem. Soc. Rev.** v.44. p. 1725-1739, 2015.

CHOY, W.N. Regulatory genetic toxicology test. in: n.n. (ed), genetic toxicology and a cancer risk assessment. **Marcel dekker, inc**, v. 3. p. 93-113, 2001.

COMASSETO, JOÃO V., MENEZES, PAULO H. STEFANI, HELIO A. et al. Addition of hydrogen halides to acetylenic selenides. Synthesis of 1-halo-1-selenoalkenes. **Tetrahedron**, v. 52, p. 9687-9702, 1996.

COMPARSI, B., MEINERZ, D. F., FRANCO, J. L., POSSER, T., DE SOUZA PRESTES, A., STEFANELLO, S. T., DOS SANTOS, D. B., WAGNER, C., FARINA, M., ASCHNER, M., DAFRE, A. L. E ROCHA, J. B. T. Diphenyl ditelluride targets brain selenoproteins in vivo: inhibition of cerebral thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in mice after acute exposure. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 370, p. 173-182, 2012.

CORIAT, R., MARUT, W., LECONTE, M., BA, L.B., VIENNE, A., CHEREAU, C. ALEXANDRE, J., WEILL, B., DOERING, M., JACOB, C., NICCO, C.,BATTEUX . The organotelluride catalyst LAB027 prevents colon cancer growth in the mice. **Cell Death Dis.** v. 2, p. e191. 2011.

CUNHA, R. L. O. R.; GOUVEA, I. E.; JULIANO, L. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 393-407, 2009.

CUNHA, R. L. O. R.; URANO, M. E.; CHAGAS, J. R.; ALMEIDA, P. C.; BINCOLETTI, C.; TERSARIOLB, I. L. S.; COMASSETO, J. V. Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium (IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 755–760, 2005.

DENG, Z. et al. Green and Orange CdTe quantum dots as effective pH-sensitive fluorescent probes for dual simultaneous and independent detection of viruses. **The Journal Physical Chemistry**, v. 111, p. 12024-12031, 2007.

DÍAZ-VÁSQUEZ, WALDO A., ABARCA-LAGUNAS, MARÍA J. CORNEJO, FABIÁN A. et al. Tellurite-mediated damage to the Escherichia coli NDH-dehydrogenases and terminal oxidases in aerobic conditions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 566, p. 67-75, 2010.

ENGMAN, L.; KANDRA, T.; GALLEGOS, A.; WILLIAMS, R.; POWIS, G. Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. **Anticancer Drug Design**, v. 15, p. 323-330, 2000.

EREZ, E; FASS, D.; EITAN, B. How intramembrane protease bury hydrolytic reaction in membrane. **Nature**. v.459, p.371-378, 2009.

FREI, G. M.; KREMER, M.; HANSCHMANN, K. M.; KRAUSE, S.; ALBECK, M.; SREDNI, B.; SCHNIERLE, B. S. Antitumour effects in mycosis fungoides of the immunomodulatory, tellurium-based compound, AS101. **British Journal of Dermatology**, v. 158, p. 578-586, 2008.

FRIEDMAN, M.; BAYER, I.; LETKO, I.; DUVDEVANI, R.; ZAVARO-LEVY, O.; RON, B.; ALBECK, M.; SREDNI, B. Topical treatment for human papillomavirus-associated genital warts in humans with the novel tellurium immunomodulator AS101: assessment of its safety and efficacy. **British Journal of Dermatology**, v. 160, p. 403-408, 2009.

GAY, B.M.; LUCHESE, C.; NOGUEIRA, C. W.; WENDLER, P.; MACEDO, A.; DOS SANTOS, A. A. Antioxidant effect of functionalized alkyl-organotellurides: a study in vitro. **Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry**, v. 25, p. 467-475, 2010.

GRAHAME, T. J.; SCHLESINGER, R. B. Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease. **Particle and fibre toxicology**, v. 9, p. 21, 2012.

GUPTA D.S.P.K.; KUMAR Y.; CHADRASHEKHAR T.G. Antibacterial activity of some unsymmetrical diorganotellurium(IV) dichlorides. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 42. p. 398-400, 2005

HALPERT, G. E SREDNI, B. The effect of the novel tellurium compound AS101 on autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, p. 1230-1235, 2014.

HAMID, R, ROTSHTEYN, YRABADI, L et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 703-710, 2004.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2014.

HASSAN, W.; IBRAHIM, M.; NOGUEIRA, C. W.; BRAGA, A. L.; DEOBALD, A. M.; MOHAMMADZAI, I. U.; ROCHA, J. B. Influence of pH on the reactivity of diphenyl ditelluride with thiols and anti-oxidant potential in rat brain. **Chemico-Biological Interaction**, v. 15, p. 47-53, 2009.

HAYUN, MICHAL, NAOR, YANIVWEIL, MERAV et al. The immunomodulator AS101 induces growth arrest and apoptosis in Multiple Myeloma: Association with the Akt/Survivin pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1423-1431, 2006.

HAYUN, MICHAL, SAIDA, HAGARALBECK, MICHAEL et al. 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. **Experimental Hematology**, v. 37, p. 593-603, 2009.

HEDDLE, J. A. D. **Rarid in vitro test for chromosomal damage mutat.** res. 18, p.187- 190, 1973.

HENRIQUES, J.A.P.; DAFRÉ, A.L.; PICADA, J.N.; MARIS, A.F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI, L.A.; Barros, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. v.1, p. 227-252, 2001.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BAONASSI, S; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S; AND FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project prospective on current status and knowledge gaps. **Mutat. Res.**, v.659, p.93-108. 2008.

HOSTETTER, A. A; OSBORN, M. F.; DE ROSE, V. J. Characterization of RNA-Pt Adducts Formed from Cisplatin Treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Chem Biol**, v. 7 p. 218–225, 2012.

HOVHANNISYAN, G. G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. **Molecular cytogenetics**, v. 3, p. 17, 2010.

HUANG, W. et al. Facile One-Pot synthesis of Tellurium Nanorods as antioxidant and anticancer agents. **Chemistry an Asian Journal**, v. 11, p. 2301-2311, 2016.

INDENBAUM V.; BIN H.; MAKARIVSKY D.; WEIL M.; SHULMAN L.; ALBECK M.;SREDNI B.; MENDELSON E. In vitro and in vivo activity of AS101 against West Nile virus (WNV). **Virus Research**, v.166(1-2), p.68-76, 2012.

KAWAGUCHI, S.; NAKAMURA, T.; YAMAMOTO, A.; HONDA, G.; SASAKI, Y. F. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity. **Journal of nucleic acids**, 2010.

KORMUTAKOVA, R.; KLUCAR, L.; TURNA, J. DNA sequence analysis of the tellurite-resistance determinant from clinical strain of *Escherichia coli* and identification of essential genes. **Biometals**, v. 13, p. 135-139, 2000

LACERDA, D. S. Acute administration of the organochalcogen 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)octa-2-1-one induces biochemical and hematological disorders in male rats. **Cell Biochemistry Function**, v. 30, p. 351-319, 2012.

LADEN, B. D.; PORTER, T. D. Inhibition on human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. **Journal Lipid Research**, v. 42, p. 235-240, 2001.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. v. 682, p. 71-81. 2009.

LEONARD KA, NELEN MI, SIMARD TP, DAVIES SR, GOLLNICK SO, OSEROFF AR, GIBSON SL, HILF R, CHEN LB AND DETTY MR. Synthesis and evaluation of chalcogenopyrylium dyes as potential sensitizers for the photodynamic therapy of cancer. **J Med Chem** v.42, p.3953–3964, 1999.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, p. 158-163, 2006.

LIMA, C. B. C.; ARRAIS S.; WAGNER W.C.; RODRIGUES R.L.O. A Novel Organotellurium Compound (RT-01) as a New Antileishmanial Agent. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. 3, p. 213, 2009.

LIN, T., DING, Z., LI, N., XU, J., LUO, G., LIU, J., SHEN, J. 2-Tellurium-bridged β -cyclodextrin, a thioredoxin reductase inhibitor, sensitizes human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 induction and NF- κ B suppression. **Carcinogenesis** v.32. p. 154–167.2011.

LOPES, R. E. S. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, p. 1541-1548, 2010.

LUGOKENSKI, T. H. Inhibition effect of ebselen on lactate dehydrogenase activity from mammals: a comparative study with diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. **Drug Chemistry and Toxicology**, v. 34, p. 66-76, 2010

MACIEL, E. N., BOLZAN, R. C.BRAGA, A. L. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect α -aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 310-319, 2000.

MALUF, S. E. C. et al. Hypervalent organotellurium compounds as inhibitors of *P. falciparum* calcium dependent cysteine proteases. **Parasitology International**, v. 65, p. 21-22, 2015.

- MASSARDO, D. R. et al. Effects of tellurite on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomaterials**, v. 22, p. 1089-1094, 2009
- MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, p. 13-18, 2011.
- MCKERROW, J. H., et al. "Proteases in parasitic diseases." **Annual Review Pathology Mechanism**, v. 1, p. 497-536, 2006.
- MEIRELES, J.R.C.; OLIVEIRA, S.V.; COSTA-NETO, A.O. AND CERQUEIRA, E.M.M. Genotoxic and cytotoxic effects of testosterone cypionate (deposteron®). **Mutat. Res.**, **753**, 72–75, 2013.
- MENACHO-MÁRQUEZ M, MURGUÍA JR. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. **Clin Transl Oncol** 9:221-228.2007.
- MEOTTI, F. C.; BORGES, V. C.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T.; NOGUEIRA, C. W. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 9-16, 2003.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.
- MUNSHI, SOUMYABRATA, TWINING, ROBERT C.DAHL, RUSSELL. Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: Potential for false positives. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 70, n. 2, p. 195-198, 2014.
- NOGUEIRA, C. W. Organochalcogens effects on aminolevulinate dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology**, v. 191, p. 169-178, 2003.
- NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. The chemistry of organic selenium and tellurium compounds. PATAI'S Chemistry of functional groups **Brazilian Journal of Chemistry**, v.26, n. 8 e a p. 1533-1541, 2012.
- NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Brazilian Journal of Chemistry**, v. 104, p. 6255-6285, 2004.
- NUNES BS, CARVALHO FD, GUILHERMINO LM, VAN STAPPEN G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environ Pollut.** v.62, p.144:453, 2006.
- NYSKA A, WANER T, PIRAK M, ALBECK M, SREDNI B. Toxicity study in rats of a tellurium based immunomodulating drug, AS-101: a potencial drug for AIDS and cancer patients. **Arch Toxicol** v.63, p.386-393, 1989.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, England, v. 267, n. 17, p. 5421-6. Sep. 2000.

- OKUN, E. et al. The organotellurium compound ammonium trichloro (dioxoethylene-0,0') tellurate enhances neuronal survival and improves functional outcome in an ischemic stroke model in mice. **Journal of Neurochemistry**, v.102, p. 1232-1241, 2007.
- OLIVEIRA, M. B.; PRADO, A. H.; BERNEGOSI, J.; SATO, C. S.; BRUNETTI, I. L.; SCARPA, M. A. Topical Application of Retinyl Palmitate-Loaded Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Skin Aging. **BioMed Research International**, 2014.
- PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.
- PERRIER, R. et al. Dual-level inorganic write-once blu-ray disc. **Japanese Journal of Applied Physics**, v. 42, p. 5634-5637, 2003
- PERSIKE, D. S., CUNHA, R. L. O. R., JULIANO, L., SILVA, I. R., ROSIM, F. E., VIGNOLI, T., DONA, F., CAVALHEIRO, E. A. E FERNANDES, M. J. D. S. Protective effect of the organotelluroxetane RF-07 in pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurobiology of Disease**, v. 31, n. 1, p. 120-126, 2008.
- PIMENTEL, I. A. S. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Activity of an Organic Tellurium Compound on *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **PLoS ONE**, n. 13, v. 7, p. 251-259 2012.
- PINTON, SIMONE, LUCHESE, CRISTIANECURTE STANGHERLIN, ELUZA et al. Acute exposure to diphenyl ditelluride causes oxidative damage in rat lungs. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 521-526, 2011.
- POLJSAK, B.; ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative medicine and cellular longevity**. p.1-11. 2013
- QUINES, C. B. et al. Phenylethynyl-butyltellurium inhibits the sulfhydryl enzyme Na⁺, K⁺-ATPase: An effect dependent on the tellurium atom. **Biological Trace Elements Research**, v.12 p. 421-427, 2013.
- RAJABI S.; RAMAZANI, A.; NAJI H. M. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. DARU. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, 2015
- REN, X.; XUE, Y.; ZHANG, K.; LIU, J.; LUO, G.; ZHENG, J.; MU, Y.; SHEN, J. A novel dicyclodextrinyl ditelluride compound with antioxidant activity. **FEBS Letters**, v. 507, p. 377-380, 2001
- REZANKA, T.; SINGLER, K. Biologically active compounds of semi-metals. **Phytochemistry**, v. 69, p. 585-606. 2008.

- RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA, p.355, 2003.
- RUIZ, A. L. T. G.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; FARIA, A. D.; AMARAL, M. C. E.; SERRANO, D. R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, p. 98-102, 2005
- SAILER B. L.; LILES N. S.; DICKERSON S.; CHASTEEN T.G. Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (H-60) cell line. **Toxicol in Vitro**. v.77, p. 30-36, 2003.
- SAILER B. L.; LILES N. S.; DICKERSON S.; SUMNERS S.; CHASTEEN T.G. Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. **Toxicol In Vitro**.v.18, p. 475-482, 2004.
- SANTOS, C. L. V.; POURRUT, B.; DE OLIVEIRA, J. M. P. F. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. **Frontiers in genetics**, v. 6, 2015.
- SANTOS, N. N. C. **Avaliação da genotoxicidade e da citotoxicidade de produtos utilizados na terapia pulpar de dentes decíduos com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos e do ensaio cometa em linfócitos humanos**. Feira de Santana/Bahia, 2015.
- SCHIAR, VIVIANE PATRÍCIA P., DOS SANTOS, DANÚBIA B.LÜDTKE, DIOGO S. et al. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 1, p. 139-145, 2007.
- SHAABAN, E. R.; AFIF, N.; EL-TAHER, A. Effect on film thickness on microstructure parameters and optical constants of CdTe thin films, **Journal of Alloys and Compounds**, v. 482, p. 400-404, 2009.
- SINHA, V. S., KUMAR, N. Assessment of mito-inhibitory and genotoxic effects of two organophosphate pesticides in the root tip cells of *Allium cepa* L. **Annals Plant Sciences**, v. 5, p. 699-703, 2014.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.
- SOUZA A., LUCHESE C.; SANTOS N. J.; NOGUEIRA, C. Antioxidant effect of a novel class of telluroacetilene compounds: Studies in vitro and in vivo. **Life Sciences**, v.84(11-12), pp.351-357, 2009.
- SREDNI B. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. **Seminars in Cancer Biology**. v. 22. p. 60– 69. 2012.

SREDNI-KENIGSBUCH, D. et al. The novel tellurium immunomodulator AS101 inhibits interleukin-10 production and p38 MAPK expression in atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v. 50, p. 232-235, 2008.

STANGHERLIN E.C. et al. Exposure to diphenyl ditelluride, via maternal milk, causes oxidative stress in cerebral cortex, hippocampus and striatum of young rats. **Arch Toxicol**. 83:485–491, 2009.

TAYLOR, A. Biochemistry of tellurium. **Biological Trace Element Research**, v. 55, p. 231-239, 1996.

TIAN, C. Y. et al. Amplified quenching of electro chemiluminescence from CdS sensitized TiO₂ nanotubes by CdTe-carbon nanotube composite for detection of prostate protein antigen in serum. **Analytic**, v. 137, p. 3070-3075, 2012

VASQUEZ, M. Z., Combining the *in vivo* comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis**. v. 25, n. 2, p. 287-99, 2010.

VIJ P. HARDEJ D. Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non-transformed human colon cells. **Environ Toxicol Pharmacol**. 34 ,768–782, 2012.

VILAR, J. B.; FERREIRA, F. L.; FERRI, P. H.; GUILLO, L.A.; CHEN-CHEN, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal Of Biology**, v. 68, p. 41-7, 2008

YILDIZ, M., CİĞERCI, İ. H., KONUK, M., FATİH FIDAN, A. E TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 934-938, 2009.

ZALATA, AA, AH AHMED, SSR ALLAMANENI, FRANK COMHAIRE, AND A AGARWAL. Relationship Between Acrosin Activity of Human Spermatozoa and Oxidative Stress. **Asian Journal of Andrology** v.6. p.313–318. 2004.

ZENI, G.; BRAGA, A. L.; STEFANI, H. A. Palladium-catalyzed coupling of sp²-hybridized tellurides. **Accounts of Chemical Research**, v. 10, p. 731-738, 2003.

ZIRPEL, B. STEHLE, F. KAYSER, O. Production of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid from cannabigerolic acid by whole cells of *Pichia (Komagataella) pastoris* expressing Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa*. **Biotechnology Letters**. v. 1, p. 1869–1875. 2015.

Capítulo I

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA, MUTAGÊNICA E ANTITUMORAL DA
ORGANOTELURANA RF07**

Artigo submetido na revista **Toxicology in vitro**. Qualis B1 para Farmácia.

Avaliação citotóxica, mutagênica e antitumoral da organotelurana RF07

Felipe Emmanuel Alvino de Jesus¹, Octávio Augusto de Carvalho Maia¹, Rosália Maria Tôres de Lima¹; Ag-Anne Pereira Melo de Meneses¹; José Victor de Oliveira Santos¹; Antonielly Campinho¹, Adriana Maria Viana Nunes², Anderson Nogueira Mendes², Débora Caroline do Nascimento Rodrigues³; José Roberto de Oliveira Ferreira^{3,4}, Felipe Pantoja Mesquita⁵; Maria Elisabete Amaral de Moraes⁵; Raquel Carvalho Motenegro⁵; Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{3,6}; Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante^{1,6}, João Marcelo de Castro e Sousa¹.

1 Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica – LAPGENIC; Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí. 64.049-550, Brasil.

2 Departamento de Biofísica e Fisiologia. Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí. 64.049-550, Brasil.

3 Departamento de Biofísica e Fisiologia. Laboratório de Cancerologia Experimental. Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí. 64.049-550, Brasil.

4 Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas. 57010-382, Maceió, Brasil.

5 Departamento de fisiologia e farmacologia, Núcleo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, 64430-270. Brasil.

6 Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e Biotecnologia. Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí. 64.049-550, Brasil.

RESUMO

O telúrio (Te) é um elemento químico, com características intermediárias entre os metais e não-metais, razão pela qual é classificado como um semi-metal ou metaloide. Estudos prévios mostram que os compostos orgânicos a base de telúrio apresentam efeitos tóxicos e potencialidade como antineoplásicos. Assim, o presente estudo avaliou o potencial tóxico, citotóxico, mutagênico, oxidativo, hemolítico e antitumoral da organotelurana RF07 em diferentes bioensaios, tais como *Artemia salina*, *Allium cepa*, *Saccharomyces cerevisiae* e viabilidade com MTT e Alamar blue. As linhagens celulares utilizadas foram o Sarcoma 180, HL-60 (leucemia), AGP01 (adenocarcinoma gástrico), SKMEL-28 (melanoma) e MRC5 (fibroblasto normal). Foram utilizadas as concentrações de 5, 10 e 20 µg/ml de RF07 para as avaliações toxicogenéticas. Os resultados mostraram um efeito tóxico da RF07 demonstrada pela baixa DL50 em *A. salina* bem como uma diminuição significativa do crescimento radicular em *A. cepa*. A citotoxicidade do composto foi observada nas 03 concentrações avaliadas através dos baixos índices mitóticos quando comparados ao controle negativo. RF07 provocou mecanismos clastogênicos/aneugênicos em células vegetais pela indução de micronúcleos, c-metáfases, pontes e perdas cromossômicas. A organotelurana em questão não apresentou efeitos hemolíticos, porém, apresentou efeito antitumoral pela diminuição da viabilidade das células tumorais analisadas nos testes de MTT e Alamar blue em concentrações micromolares. Os efeitos toxicogenéticos apresentados podem estar relacionados com os mecanismos oxidativos do RF07 observados em *S. cerevisiae*. Diante desses resultados e das várias aplicações da RF07, ressalta-se a importância dos estudos toxicológicos para que o uso da Telurana RF-07 em novas terapias sejam feitas de maneira mais segura e eficiente.

Palavras-chave: Semi-metal; Toxicidade; Genotoxicidade; Antineoplásicos; Alterações cromossômicas.

ABSTRACT

Tellurium (Te) is a chemical element with intermediate characteristics between metals and nonmetals, which is why it is classified as a semi-metal or metalloid. Previous studies have shown that organic compounds based on tellurium have toxic effects and potential as antineoplastic agents. Thus, the current study evaluated the toxic, cytotoxic, mutagenic, antitumor and oxidative potential of organotellurium RF07 in different bioassays, such as *Artemia salina*, *Allium cepa*, *Saccharomyces cerevisiae* and the viability with MTT and Alamar blue tests. The cell lines used were Sarcoma 180, HL-60 (leukemia), AGP01 (gastric adenocarcinoma), SKMEL-28 (melanoma), and MRC5 (normal fibroblast). RF07 concentrations of 5, 10 and 20 µg/ml were used for toxicogenic evaluations. The toxic effect of RF07 was demonstrated by the low LD50 in *A. salina*, as well as a significant decrease of root growth in *A. cepa*. The compound cytotoxicity was observed at the 03 concentrations assessed through the low mitotic indexes, when compared to the negative control. RF07 provoked clastogenic/aneugenic mechanisms in plant cells by the induction of micronuclei, c-metaphases, bridges and chromosomal losses. The organotellurium in question has also presented antitumor effect by reducing the viability of the tumor cells analyzed in the tests of MTT and Alamar blue in micromolar concentrations. The toxicogenic effects presented may be related to the RF07 oxidative mechanisms observed in *S. cerevisiae*. In view of these results and the several RF07 applications, it is emphasized the importance of toxicological studies which will allow the use of RF-07 telurane in new therapies with more security and efficiency.

Keywords: Semi-metal; Toxicity; Genotoxicity; Antineoplastic agents; Chromosomal alterations.

1 Introdução

O telúrio (Te) é um elemento químico classificado como um semi-metal ou metaloide (BA et al., 2010; OGRA, 2017). Seus compostos orgânicos e inorgânicos, ao longo de muitos anos foram considerados como substâncias químicas não essenciais para a vida humana, uma vez que a sua ausência no organismo não compromete o metabolismo celular e não provoca deficiências funcionais, tendo em vista que não há registros desse metaloide em proteínas humanas (REZANKA; SIGLER, 2008, BA et al., 2010).

Esse elemento químico compõe basicamente dois tipos de compostos, os inorgânicos e os orgânicos ou organotelúricos. Os primeiros caracterizam-se pela presença de pelo menos uma ligação telúrio-carbono na sua estrutura, tendo como destaque o telurite (O_3Te^{2-}) com ação antibacteriana (CUNHA; GOUVEA; JULIANO,

2009), bem como a telurana inorgânica AS101 (telurato de tricolor amônio dioxoetileno O-O') com ação protetora contra apoptose promovida por homocisteína (OKUN et al., 2007); ação antiviral (Papiloma Vírus Humano) (FRIEDMAN; BAYER; LETKO, 2009) e ação antitumoral devido a sua ação inibitória em proteases, como a catepsina B, que está vinculada a invasão tumoral, metástase e angiogênese (SREDNI et al., 2012).

Já os compostos orgânicos apresentam diferentes classes, como os hipervalentes, do qual faz parte a organotelurana RF-07 (4-{2-Cloro-3-[clorometilideno]-1-oxa-2-($\lambda\mu\beta\delta\alpha$)4-teluraspiro[3.5]non-2-il}fenil Metil Éter), também conhecida por organoteluroxetana RF-07. Organotelurana RF07 apresenta algumas atividades farmacológicas interessantes tais como ação antiepilética (PERSIKE et al., 2008); antifúngica (BARBOSA, JABES, NUNES, 2011); leishmanicida (PIMENTEL et al., 2012) e antimalárica (MALUF et al., 2015). Além disso, estudos prévios mostram o potencial dos compostos organotelúricos como agentes antineoplásicos através da inibição de fatores cruciais para a produção de IL-10, atuando nas vias antitumorais. Esta inibição muda o equilíbrio das respostas de linfócitos Th2 para Th1, aumentando produção de IL-2 e IFN por células imunes, levando a um aumento da atividade de células NK e um aumento da citotoxicidade tumoral (PIOVAN et.al. 2011; SDRINE, 2012).

Não existem estudos mais específicos sobre a toxicidade da organotelurana RF07 bem como dos outros compostos orgânicos hipervalentes, a base de telúrio (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA 2004 e 2012; CUNHA et al., 2009). Desta forma, são necessários estudos toxicológicos para avaliações citotóxicas e genotóxicas desses compostos já que os mesmos possuem atividades farmacológicas interessantes para uso racional na biologia e medicina. Assim, o presente estudo avaliou o potencial toxicogênico da RF07 em *Artemia salina*, *Allium cepa* e em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, além de avaliar a atividade antiproliferativa/antitumoral desse composto diante de células tumorais humanas utilizando os ensaios de MTT e Alamar Blue.

2. Materiais e métodos

2.1 Síntese e determinação das concentrações da RF07

A síntese e a caracterização da RF-07 foram realizadas no Centro de Ciências Naturais e Humanas (Universidade Federal do ABC, Santo André, São Paulo) e estão descritas a seguir. O Composto RF-07 foi sintetizado pela reação do tricloreto de p-metoxifenil telúrio com 1-etinil-1-ciclohexanol em refluxo de benzeno, como descrito por Zeni et al. (1999). Após a preparação, o produto RF-07 foi inicialmente purificado por cristalização fracionada e, em seguida, repurificado por recristalização para a utilização nos ensaios biológicos. O produto e todos os reagentes utilizados para a síntese foram caracterizados por técnicas de espectroscopias como infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{125}Te e análise elementar (C, H, N). Essas técnicas garantem tanto a identidade quanto a pureza do composto utilizado.

Devido ao isolamento recente do composto químico bem como da escassez de trabalhos toxicológicos, foram utilizadas as concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ baseadas em estudos anteriores com outras organoteluranas na literatura.

2.2 Bioensaio de letalidade em *Artemia salina*

A avaliação da toxicidade em náuplios de *A. salina* foi realizada segundo metodologia descrita por Meyer (1982) e McLaughlin; Rogers (1998). Inicialmente, foram preparados 500 mL de uma solução sintética de sal marinho (30 g/L: NaCl 77,23%, MgSO_4 9,62%, MgCl 7,13%, CaCl_2 3,32%, KCl 2,11% e NaHCO_3 0,59%), a qual foi posteriormente adicionada água mineral não clorada na proporção 1:1 (água marinha artificial) para incubação dos ovos de *A. salina* (10 mg/L) obtidos comercialmente. Estes foram mantidos a 25 °C, com aeração constante, durante 24 h para favorecer a eclosão das larvas (náuplios). Para o ensaio, foram colocados, em triplicata, dez exemplares de náuplios em tubos de ensaio em um volume total de 10 mL de água marinha artificial com 500 μL das concentrações de 3,25, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$. O grupo controle negativo foi representado apenas por água marinha e o controle positivo recebeu dicromato de potássio (50 $\mu\text{g/mL}$). Após os períodos de 24 e 48h, foi realizada a contagem do número de náuplios sobreviventes.

A definição da toxicidade do extrato foi baseada nas escalas de toxicidade de McLaughlin et al. (1993), de acordo com a escala, os valores de concentração letal

(CL)₅₀ > 1000 µg/ml considerou-se não tóxico; entre 500 a 1000 µg/ml considerou-se baixa toxicidade; moderada toxicidade para CL₅₀ entre 100 a 500 µg/ml e, finalmente, muito tóxico quando a CL₅₀ foi inferior 100 µg/ml.

2.3 Ensaio com células meristemáticas de *A. cepa*

Os bulbos com as raízes até 2 cm de comprimento foram colocados nas soluções de tratamento da RF07, previamente diluídos em tampão fostato salina (Phosphate Buffered Saline, PBS) e Dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL. Para verificar a atividade tóxica, citotóxica e mutagênica da RF07, foram realizados 3 tratamentos com cinco repetições (bulbos) cada, onde cada tratamento foi exposto a uma das concentrações citadas da RF07. Além disso, também foi avaliado o tratamento que foi exposto ao DMSO 5%, utilizado como o veículo de solubilização da RF07 mais PBS utilizado como veículo de diluição. Como controle negativo (CN) foi utilizada água destilada e como controle positivo (CP) sulfato de cobre (0,6 µg/mL).

Após o período de exposição (72 h), as pontas das raízes (meristemas) foram removidas e fixadas em Carnoy (3:1, etanol: ácido acético) por 6-8 h, à temperatura ambiente, e estocadas a -20° C, até o momento de confecção das lâminas. Para a confecção das lâminas, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada de 5 min cada e hidrolisadas (HCl 1N, 10 min.). Após a hidrólise, as raízes foram novamente lavadas em água destilada e transferidas para frascos de vidro âmbar, contendo o Reativo de Schiff, onde permaneceram em local escuro, por 2 h. Após esse período, as raízes foram lavadas, até a total retirada do reativo, transferidas para lâminas, onde foram esmagadas em uma gota de carmim acético 2%. As lâminas foram avaliadas, utilizando o microscópio óptico (400 x). Foram avaliadas 1000 células por repetição, totalizando 5.000 células por tratamento. Nesse estudo, foram realizadas a avaliação da toxicidade, do efeito citotóxico e da mutagenicidade.

A toxicidade das três concentrações da RF07 e dos controles foi avaliada a partir do tamanho médio das raízes (Tamanho médio da raiz, TMR) em milímetros de cada bulbo. A citotoxicidade (Índice mitótico, IM) e a mutagenicidade (alterações cromossômicas, AC) foram avaliadas pela contagem de 5.000 células meristemáticas (unidade experimental: 1000 células/ lâmina; total de 5 lâminas por tratamento) em microscópio de luz DM 500 (400x). A genotoxicidade inclui alterações resultantes de efeitos aneugênicos (C-metáfases, metáfase com aderências cromossômicas, perdas

cromossômicas, anáfases multipolares e metáfases poliploides) ou efeitos clastogênicos (fragmentos cromossômicos, pontes cromossômicas e outras alterações). Adicionalmente, a presença ou não de MN, os quais podem ser resultantes de efeitos aneugênicos ou clastogênicos, também foi avaliada juntamente com as outras alterações cromossômicas (MAZZEO et al., 2011).

2.4 Teste do disco central em *S. cerevisiae*

2.4.1 Linhagens de leveduras usadas

Seis linhagens de leveduras foram utilizadas para avaliar a atividade oxidante do composto químico RF07. A linhagem selvagem utilizada não apresentava nenhuma mutação nas enzimas de defesa contra substâncias oxidativas, enquanto que as outras cinco linhagens selecionadas apresentavam defeitos em pelo menos uma enzima antioxidativa. A linhagem EG118 é mutada na enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD – produto do gene SOD1), a EG110 é mutada na SOD mitocondrial (MnSOD – produto do gene SOD2); a EG133 possui uma mutação em duas enzimas a SOD1 e SOD2; a EG223 mutada em CAT1 e EG mutada em SOD1 e CAT1 (Tabela 01).

Tabela 1. As linhagens de levedura *S. cerevisiae* que foram utilizadas no estudo.

| DESCRIÇÃO | GENÓTIPO | ORIGEM |
|--------------------|--|-------------------------|
| EG103 (SODWT) | MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+ | Edith Gralla, L Angeles |
| EG118 (Sod1Δ) | sod1:URA3 todos os outros marcadores como EG103 | Edith Gralla, L Angeles |
| EG110 (Sod2Δ) | sod2:TRP1 todos outros marcadores como EG103 | Edith Gralla, L Angeles |
| EG133 (Sod1ΔSod2Δ) | sod1:URA3 sod2:TRP1 duplo mutante/todos outros marcadores como EG103 | Edith Gralla, L Angeles |
| EG223 (Cat1Δ) | EG103, exceto cat1:TRP1 | Edith Gralla, L Angeles |
| EG (Sod1ΔCat1Δ) | EG103, exceto sod:URA3 e cat1:TRP1 | Edith Gralla, L Angeles |

Fonte: Adaptado de Oliveira et al., (2014)

2.4.2 Protocolo experimental

Os experimentos foram realizados através do teste do disco central em *S. cerevisiae*. As linhagens foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de Bacto-peptona, 2% de glucose) a 28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária, de acordo com Oliveira et al., (2014). Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem das placas de Petri em um movimento

contínuo, para ambos os lados da placa, contendo em seu centro um disco de papel de filtro estéril, ao qual foi acrescentado, nas distintas placas, 10 µL das concentrações 5, 10 e 20 µg/mL da telurana RF07 para realização do tratamento. Para correlação estatística com o resultado do grupo teste, um grupo controle foi utilizado sendo 10 µL de uma solução contendo H₂O₂ (10 mMol) utilizado como controle positivo. Após 48 h de incubação em estufa a 37°C, os halos de inibição de crescimento das linhagens, em milímetros, foram mensurados desde a margem do disco de papel-filtro até o início do crescimento celular.

Os valores tabelados e submetidos à análise estatística variaram de 0 mm (crescimento completo) a 40 mm (ausência de crescimento), que corresponde à medida do raio da placa de Petri. Todos os testes foram realizados em duplicata.

2.5 Teste de hemólise

Para a avaliação da atividade hemolítica utilizou-se eritrócitos de cachorro e ovelhas (Comitê de Ética, Univesidade Federal do Piauí, (022/2015), coletado com anticoagulante (EDTA). Foram adicionados 50 µL de eritrócitos diluídos em PBS na placa de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 150 µl do composto químico, em diferentes concentrações (2 a 0,125 mg/mL). A placa de 96 poços foi incubada por 1 h a 37 °C. Após as placas foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para avaliação da hemólise utilizando espectrofotômetro a um comprimento de onda de 550 nm. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem.

2.6 Cultura primária de Sarcoma 180

As células de S180 foram mantidas na cavidade peritoneal de camundongos (Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí, #167/16,). Após 10 dias da inoculação, o líquido ascítico, contendo células tumorais, foi removido por punção na cavidade abdominal de um animal. Em seguida, as células de S180 foram contadas em câmara de Neubauer (4×10^6 células/mL) e incubadas em meio de cultura RPMI 1640 (1 mM/L L-glutamina GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], suplementado com

10% (v/v) de soro bovino fetal e 1% (p/v) de penicilina/estreptomicina), mantidas em estufa a 37°C, por 72h, concomitantemente com as substâncias teste e controles para posterior avaliação de viabilidade celular.

2.7 Viabilidade celular pelo método do MTT

O ensaio consistiu em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (Mosmann, 1983), permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas. As células tumorais foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de $0,8 - 1 \times 10^6$ células/mL. A telurana RF07 a partir de uma concentração de 100 µg/ml foi incubada durante 68 horas juntamente com as células. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação, foi adicionado 20 µL da solução de MTT (5 mg/ mL) e foi reincubada durante 4 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi descartado e as placas cuidadosamente armazenadas protegidas da luz, e deixadas overnight para secar completamente. Posteriormente, o precipitado foi ressuscitado em 100 µL de álcool isopropílico. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm. As amostras foram testadas em diluição seriada, em triplicata. As CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50 % do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (CI 95%) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0.

2.8 Ensaio de viabilidade celular por Alamar Blue

As linhagens celulares utilizadas foram a HL-60 (leucemia), AGP01 (adenocarcinoma gástrico), SKMEL-28 (melanoma) e MRC5 (fibroblasto normal). Todas as células foram semeadas em placas de 96 poços (cinco mil células por poço) e mantidas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas para permitir a adesão celular. Findado o tempo, as células foram tratadas por 72 horas com a curva concentração-resposta para determinar o CI₅₀ da substância em estudo nas seguintes concentrações: 0 µM, 0,001 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM e 10 µM da telurana RF07. Ao final do tempo de tratamento, foi adicionada a solução de Alamar Blue (proporção

de 1:20) na placa, e após 3 horas de incubação na estufa as placas foram mensuradas no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 465/540 nm. Os valores de fluorescência de três experimentos independentes foram analisados no programa estatístico GraphPad Prism 5.01 para determinar o CI50 através da regressão não linear, seguindo a equação: $Y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + 10^{((\log \text{IC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$.

2.9 Análise estatística

A análise dos resultados foi realizada pela análise de variância One-way e Two-way (ANOVA) seguido do por Tukey como Post hoc teste, utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego Califórnia U.). Os valores de $p < 0.05$ e $p < 0.001$ foram utilizados como valores de significância.

3 Resultados

3.1 Avaliação tóxica da RF07 por meio do teste de *A. salina*

Todas as concentrações testadas (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,15 $\mu\text{g/mL}$) promoveram significantes percentuais de mortalidade ($p < 0,05$) quando comparado com o controle negativo, com taxas de letalidades de 90,00, 76,6, 66,6, 70,0, 53,3, 46,6% respectivamente, após 48 h. Observaram-se ainda nos tempos de exposição avaliados um comportamento dose-dependente. Os valores de concentração letal foram 15,02 e 5,43 $\mu\text{g/ml}$ para 24 e 48h, respectivamente. Utilizando a classificação de toxicidade de McLaughlin et al. (1993), a RF07 apresentou alta toxicidade ($100 < \mu\text{g/ml}$). Não foi observada mortalidade significativa para o veículo utilizado quando comparado ao CN (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade tóxica do Telurana RF07 em diferentes concentrações ($\mu\text{g/ml}$) por meio do bioensaio de letalidade em *Artemia salina*.

| Concentrações | % de mortalidade de náuplios | |
|--|------------------------------|---------------------------|
| | 24 h | 48 h |
| CN (solução salina) | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| 0,05% DMSO | 3.3 ± 0.5 | 3.33 ± 0,5 |
| CP (KDCr, 16 μM) | 50.0 ± 5.7 ^{ab} | 56.6 ± 0.5 ^{ab} |
| 100 $\mu\text{g/ml}$ | 76,6 ± 5.7 ^{ab} | 90,00 ± 6.6 ^{ab} |
| 50 $\mu\text{g/ml}$ | 63.3 ± 5.7 ^{ab} | 76.6 ± 4.4 ^{ab} |
| 25 $\mu\text{g/ml}$ | 50.0 ± 0.0 ^{ab} | 66.6 ± 4.4 ^{ab} |
| 12.5 $\mu\text{g/ml}$ | 56.6 ± 5.7 ^{ab} | 70.0 ± 6.6 ^{ab} |
| 6.25 $\mu\text{g/ml}$ | 43.3 ± 5.7 ^{ab} | 53.3 ± 4.4 ^{ab} |
| 3.15 $\mu\text{g/ml}$ | 40.0 ± 10.0 ^{ab} | 46.6 ± 4.4 ^{ab} |
| CL₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) | 15.02 | 5.43 |
| IC | 10.14 – 22,25 | 3.53 – 8.34 |
| r ² | 0.86 | 0.87 |

Valores são as médias e desvio padrão, ^ap <0.05 comparado com o CN, ^bp <0.05 comparado com DMSO; Anova one way, com pós teste de Tukey. Cada concentração foi executada com três tubos (10 náuplios vivos / tubo); CL₅₀: Concentração letal 50% em $\mu\text{g/ml}$. IC: Intervalo de confiança; r²: Determinação de coeficiente.

3.2. Avaliação toxicogenética de RF07 pelo bioensaio de *A. cepa*

As três concentrações foram tóxicas, pois apresentaram redução significativa do TMR quando comparadas ao CN e ao DMSO 5% após 72 h de exposição. Além disso, na maior concentração (20 $\mu\text{g/mL}$), houve redução significativa do TMR em relação ao CP, confirmando o seu elevado efeito tóxico nessa concentração. O TMR tratado com o veículo (DMSO 5%), não apresentou diferença significativa em relação ao CN e ainda apresentou média significativa em relação ao CP, evidenciando a não toxicidade (Tabela 03). A nível celular, as três concentrações avaliadas foram citotóxicas, apresentando redução significativa do IM quando comparadas com o CN e o DMSO 5% após 72 h. Observou-se uma relação inversamente proporcional entre o aumento das concentrações da RF07 e a redução do IM. O IM das células meristemáticas de *A. cepa* quando expostas ao DMSO 5% foi estatisticamente maior quando comparado ao CP, evidenciando ausência de citotoxicidade. A análise estatística de cada fase do ciclo celular evidenciou que houve aumento significativo das médias da intérfase com o aumento das concentrações da RF07 quando comparados ao CN. No entanto, na medida em que houve aumento das concentrações da RF07, reduziram-se as médias da prófase,

metáfase, anáfase e telófase de forma significativa quando comparadas ao CN (Tabela 3).

No que diz respeito à média total das alterações cromossômicas (AC) observou-se que as duas concentrações (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) da RF07 demonstraram significativa mutagenicidade quando comparada ao CN e ao DMSO 5%. Essas mesmas concentrações mostraram-se menos mutagênicas quando comparada ao CP. Ressalta-se que o DMSO 5% não apresentou efeitos genotóxicos quando comparado ao CN. Dentre as AC observadas individualmente nas concentrações mutagênicas, MN, C-metáfase, pontes e perdas cromossômicas foram estatisticamente significativas em relação ao CN. (Tabela 4).

Tabela 3. Efeito tóxico (TMR) e citotóxico (IM) da telurana RF07 em células meristemáticas de *Allium cepa*.

| Tratamento | Concentração | TE (h) | TMR (mm) | Fases do ciclo celular | | | | | IM (%) |
|------------|--------------|--------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | | | | Intérfase | Prófase | Metáfase | Anáfase | Telófase | |
| CN | - | 72 | 65 ± 5,0 | 493,4 ± 17,0 | 409 ± 9,1 | 39,4 ± 3,8 | 29,8 ± 3,1 | 27,6 ± 2,8 | 50,6 ± 1,7 |
| CP | 0,006 mg/mL | | 20,0 ± 2,6 ^a | 892 ± 20,1 ^a | 43 ± 6,9 ^a | 29 ± 4,1 | 19 ± 4,9 | 17 ± 3,1 | 10,8 ± 3,1 ^a |
| DMSO 5% | - | | 46 ± 5,9 ^c | 554,8 ± 30,8 ^{ac} | 386,0 ± 31,2 ^c | 22,8 ± 6 | 14,4 ± 1,7 | 22,0 ± 2,8 | 44,5 ± 3,1 ^c |
| RF07 | 5 µg/mL | | 13,0 ± 4,6 ^{ab} | 789,2 ± 18,9 ^{abc} | 186,0 ± 22,6 ^{abc} | 7,6 ± 2,9 ^a | 5,6 ± 2,6 ^a | 11,6 ± 4,5 | 21,1 ± 1,8 ^{ab} |
| | 10 µg/mL | | 18,0 ± 6,4 ^{ab} | 791,4 ± 19,5 ^{abc} | 202,2 ± 18,9 ^{abc} | 4,8 ± 1,6 ^{ac} | 0,8 ± 0,6 ^a | 0,8 ± 0,6 ^a | 20,8 ± 1,9 ^{ab} |
| | 20 µg/mL | | 6,0 ± 1,2 ^{abc} | 949,6 ± 2,7 ^{abc} | 49,8 ± 2,7 ^{ab} | 0,2 ± 0,3 ^{abc} | 0,2 ± 0,3 ^a | 0,2 ± 0,3 ^{ab} | 5,1 ± 0,3 ^{ab} |

CN: Controle negativo (Água destilada). **CP:** Controle positivo (CuSO₄: Sulfato de cobre). **TE:** Tempo de exposição. **TMR:** Tamanho Médio da Raiz (milímetros). **IM:** Índice Mitótico. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. One-way ANOVA para TMR e Two-way ANOVA para fases do ciclo celular com pós-teste de Tukey. Valores de significância (p < 0,05), ^acomparado ao CN; ^bcomparado ao DMSO; ^ccomparado ao CP. (p < 0,05).

Tabela 4. Efeito mutagênico da telurana RF07 em células meristemáticas de *Allium cepa*.

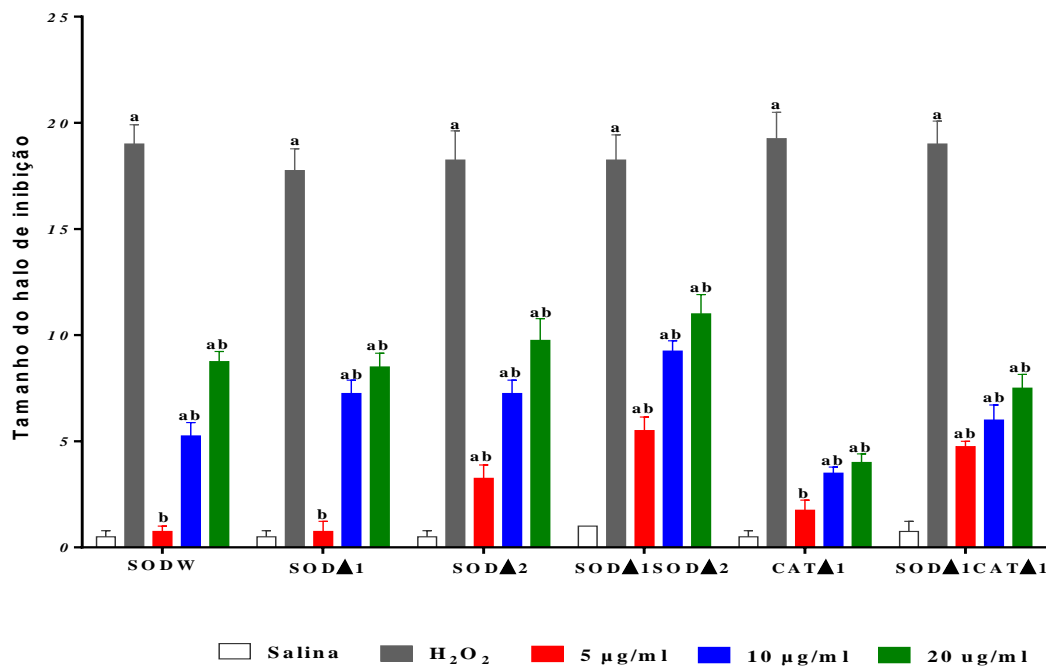
| Tratamento | Concentração | TE (h) | Alterações cromossômicas (AC) | | | | | Total de AC |
|------------|--------------|--------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| | | | Micronúcleo | C-metáfase | Ponte Cromossômica | Perda Cromossômica | Atraso Cromossômico | |
| CN | - | 72 h | 0,6 ± 0,3 ^c | 0,8 ± 0,2 | 0,6 ± 0,2 | 0,4 ± 0,4 | 0,4 ± 0,3 | 2,8 ± 1,2 |
| CP | 0,006 mg/mL | | 8,0 ± 2,4 ^a | 6,6 ± 1,6 ^a | 3,8 ± 0,9 ^a | 8,2 ± 2,5 ^a | 11,2 ± 2,6 ^a | 37,8 ± 1,9 ^a |
| DMSO 5% | - | | 0,2 ± 0,2 ^c | 0,6 ± 0,2 ^c | 0,2 ± 0,1 ^c | 0,0 ± 0,0 ^c | 0,0 ± 0,0 ^c | 1,0 ± 0,7 ^c |
| RF07 | 5 µg/ml | | 9,4 ± 0,7 ^{ab} | 6,5 ± 0,6 ^{ab} | 2,8 ± 0,4 ^{ab} | 4,0 ± 0,8 ^{ab} | 1,2 ± 0,3 ^c | 23,9 ± 2,5 ^{abc} |
| | 10 µg/ml | | 4,6 ± 0,6 ^{abc} | 3,8 ± 1,4 ^{ab} | 3,6 ± 1,0 ^{ab} | 4,2 ± 1,1 ^{ab} | 2,4 ± 0,3 ^{bc} | 18,6 ± 0,4 ^{abc} |
| | 20 µg/ml | | 1,3 ± 0,9 ^c | 0,2 ± 0,3 ^c | 1,0 ± 0,7 ^c | 0,0 ± 0,0 ^c | 0,6 ± 0,7 ^c | 3,1 ± 0,7 ^c |

CN: Controle negativo (Água destilada). **CP:** Controle Positivo (CuSO₄: Sulfato de cobre). **TE:** Tempo de exposição. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. Two-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Valores de significância (p < 0,05), ^acomparado ao CN; ^bcomparado ao DMSO; ^ccomparado ao CP.

3.3 Atividade oxidante do composto Telurana RF07

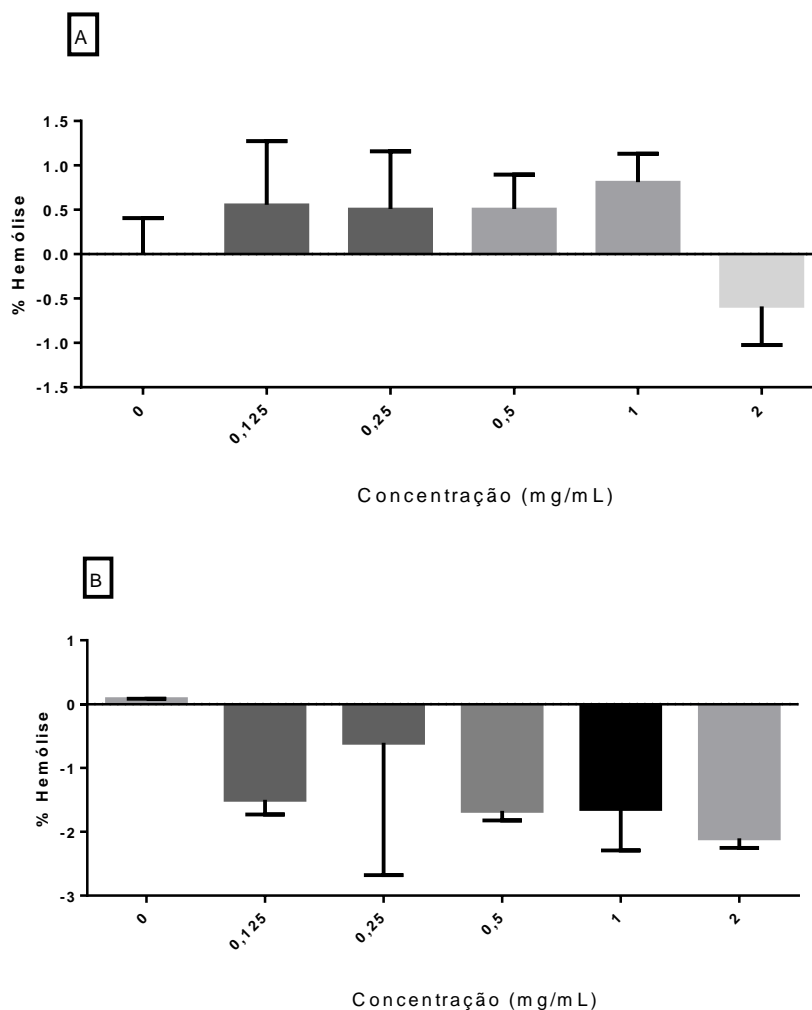
A Telurana RF07 nas maiores concentrações (10 e 20 $\mu\text{g/ml}$) promoveu dano oxidativo em todas as linhagens testadas mostrando que o composto provoca danos ao DNA nuclear e mitocondrial para todas as linhagens analisadas quando comparados com o controle negativo ($p < 0,001$). Entretanto, a concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ apresentou esse efeito oxidativo apenas nas linhagens SOD2, SOD1SOD2 e CAT1CAT1. Quando comparadas com o peróxido, a RF07 não apresentou efeito oxidativo estatisticamente igual (Figura 01).

Figura 1: Avaliação oxidante da Telurana RF07 (5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$) em *Saccharomyces cerevisiae* pela inibição de crescimento no teste do disco central. RF07. Dados significantes ($p < 0,001$) em ANOVA e testes Tukey's, para ^a comparado com a salina. ^b compara com o CP.



3.4 Avaliação hemolítica *in vitro*

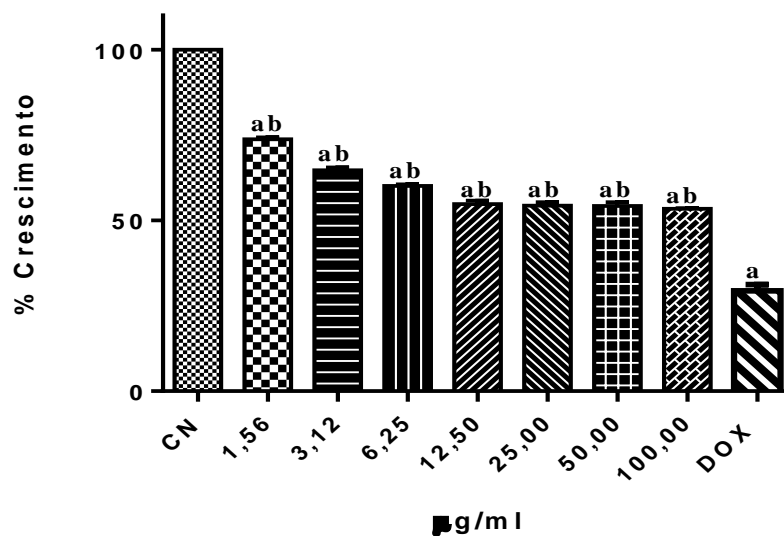
Realizou-se a avaliação hemolítica em células animais *in vitro* e observou-se que a organotelurana RF07 não apresentou capacidade de lisar as células analisadas (Figura 2).

Figura 2: Hemólise de hemácia de ovelha (A) e cachorro (B).

3.4 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio MTT

A RF07, nas concentrações testadas, assim como a Dox (2 $\mu\text{g/mL}$) interferiram, significativamente, na viabilidade celular das células tumorais de S180 quando comparados ao controle negativo indicando, assim, efeitos citotóxicos nessas células tumorais. (Figura 3). O CI_{50} foi de 73,45 $\mu\text{g/ml}$ e o intervalo de confiança de 42,9 a 127,9 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 3: Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT após 72 h de exposição ao composto RF07 em células tumorais de Sarcoma 180.

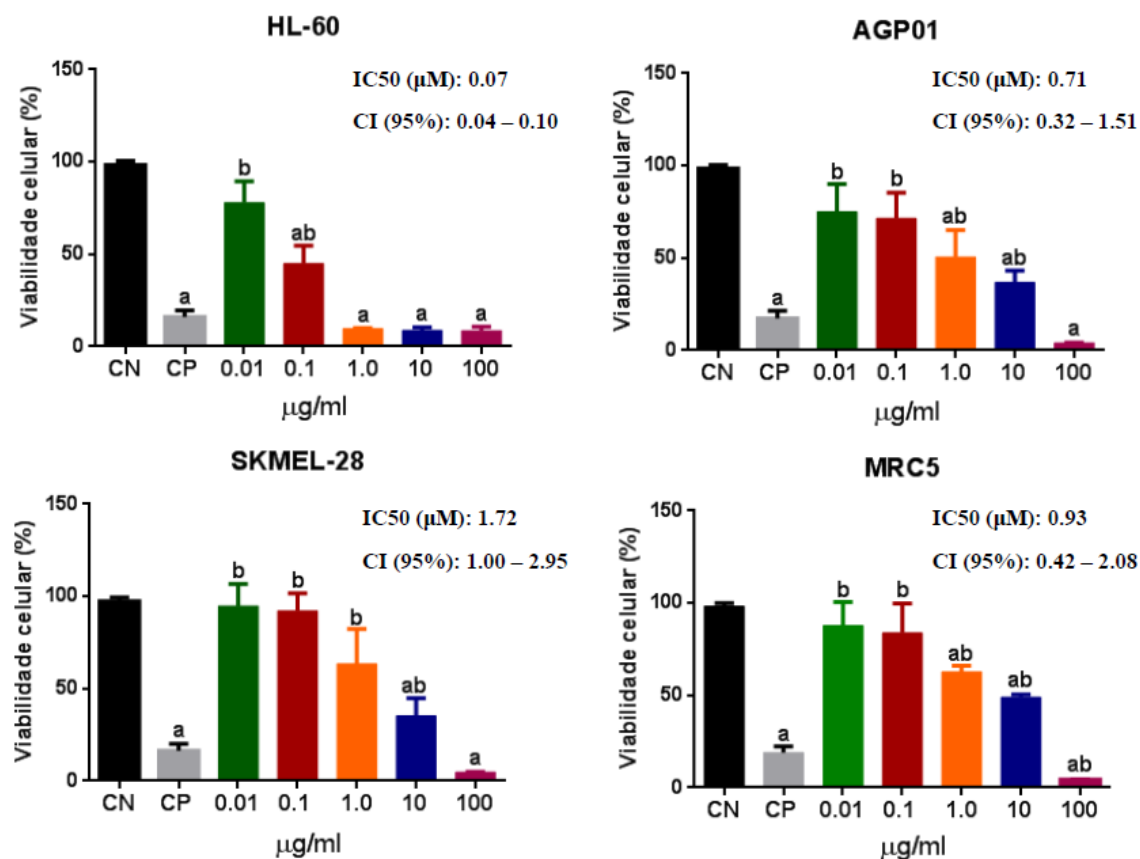


Valores representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. CP: Dox (Doxorrubicina) (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo CN. ^b $p < 0,05$ comparado ao CP

3.5 Avaliação antitumoral do composto RF07

Os resultados apontam que a RF07 apresentou efeitos citotóxicos em todas as linhagens celulares avaliadas. Observou-se um CI_{50} de 0,01 μM ; 0,71 μM ; 1,72 μM ; 0,93 μM nas linhagens HL-60, AGP01, SKMEL-28 e MRC5, respectivamente. Em todas as linhagens testadas, A RF07 causou aumento da mortalidade celular nas linhagens tumorais (AGP01, HL-60 e SKMEL-28) com valores estatisticamente significantes quando comparados ao controle negativo em concentrações micromolares apresentando um eficiente efeito antitumoral (Figura 4).

Figura 4: Avaliação da viabilidade celular em diferentes concentrações da Telurana RF07 em diferentes células tumorais.



Valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. CN: células não tratadas. CP: Doxorubicina a 2 $\mu\text{g/mL}$. ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo CN e ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo CP.

4. Discussão

A busca constante por novos compostos químicos com atividade farmacológica despertou o interesse dos pesquisadores pelos compostos orgânicos de telúrio a partir da década de 70 devido as suas propriedades toxicológicas e farmacológicas (NOGUEIRA E ROCHA, 2012). Porém, as organoteluranas, como a RF07, ainda possuem poucos estudos em relação a sua toxicidade e seu possível potencial antineoplásico.

A exposição dos náuplios de *Artemia salina* a Telurana RF07 demonstrou sensibilidade a presença desse composto diante do organismo, causando mortalidade acentuada o que caracteriza uma significativa toxicidade. Esse bioensaio funciona através da inibição no desenvolvimento embrionário, por meio das propriedades ovicidas e larvicidas dos agentes testados neste sistema (MANILAL et al. 2009). Maciel e colaboradores (2000) afirmam que derivados inorgânicos e alguns derivados orgânicos de telúrio foram altamente tóxicos em testes realizados no sistema nervoso central de camundongos, pois estes se mostraram potentes inibidores da esqualeno

monooxigenase, ocasionando uma redução efetiva na velocidade da biossíntese do colesterol, resultando na desmielinização dos nervos periféricos.

A atividade tóxica da Telurana RF07 observada no bioensaio de *Artemia* foi reforçada também pelos estudos Stangherlin et al., (2008) onde afirmaram que moléculas orgânicas contendo telúrio além de possuírem um potencial tóxico elas podem causar teratogenia em fetos de ratos, causando hidrocefalia, edemas, alterações nas medidas corporais fetais, efeitos tóxicos para a mãe, além de provocar altas taxas de mortalidade pré e pós-natais. Em outro estudo foi observado que a exposição materna ao ditelureto de difenila durante o período de amamentação alterou as tendências comportamentais de seus filhotes (STANGHERLIN et al., 2009).

Os efeitos toxicológicos da RF07 foram também reforçados pelo teste de *Allium cepa* onde a toxicidade (TMR) e a citotoxicidade (IM) observados foram dose-dependente para todas as concentrações analisadas. A inibição do crescimento de raiz pela RF07 pode ser explicada através da redução significativa do IM nas concentrações avaliadas. Possivelmente, o efeito tóxico observado pode estar relacionado com o acúmulo da Telurana testada, uma vez que os compostos a base de telúrio são acumulados de forma similar à via metabólica do selênio (Se), como observados em brócolis, mostarda da índia e alho (ANAN et al., 2013). Adicionalmente, identificou-se também a capacidade desses vegetais superiores em transformar compostos a base de Te pela enzima telurocisteína em um aminoácido contendo Te, denominado ácido teluroamino, que apresenta toxicidade desconhecida (ANAN et al., 2013). Possivelmente, a RF07 e/ou seus metabólitos podem estar associados com os efeitos tóxicos e citotóxicos observados nas células meristemáticas de *A. cepa*. Os dados observados no presente estudo sugerem uma possível explicação quanto ao efeito tóxico em *A. cepa* e conseqüentemente em animais diante da boa correlação desse sistema teste com outros modelos *in vivo* (ANAN et al., 2013).

Além da atividade citotóxica do composto também foram observados efeitos mutagênicos nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. Dentre as AC significativas causadas pela RF07, as c-metáfases confirmam a interferência da RF07 na montagem, estabilização e/ou inativação de fibras do fuso mitótico, caracterizando uma atividade aneugênica dessa substância (LEME e MARIN- MORALES, 2009; BIANCHI et al., 2015). Além disso, a RF07 interferiu com erros na segregação que levaram ao surgimento de perdas cromossômicas. As pontes cromossômicas significativas sugerem que a RF07 promoveu ciclos de quebra-fusão-ponte, representando, juntamente com os

micronúcleos observados, uma atividade clastogênica da RF07 (LEME e MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES et al., 2011).

O modelo de resposta citotóxica em *S.cerevisiae*, através do teste de inibição de crescimento é uma estratégia simples e muito sensível para avaliação do efeito biológico de substâncias naturais e sintéticas em tratamentos diversos (ROSA et al., 2007). Corroborando com efeitos oxidativos em células de levedura observados neste estudo, análises realizadas com o composto ditelureto de difenila (PhTe)₂ modificou a atividade de enzimas antioxidantes pela redução da atividade da CAT, SOD, GR, GPx e TrxR em tecido cerebral. A exposição aguda a oxidantes, tais como RF07, geralmente pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como resultados de uma resposta adaptativa, o que conseqüentemente reduz o dano. O (PhTe)₂ demonstrou também ser capaz de oxidar resíduos tiólicos em eritrócitos humanos e cérebro de ratos (HASSAN et al., 2008; SCHIAR et al., 2009; BARBOSA; JABES; NUNES, 2012).

A citotoxicidade observada nos ensaios de viabilidade celular por MTT corroboram com os estudos de Pimentel e colaboradores (2012), na qual demonstraram em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos infectados com a forma amastigota da *Leishmaniose chagasi*, que após 96 horas do tratamento com a RF07, a citotoxicidade avaliada também por MTT, evidenciou a capacidade do composto em inibir 50% da viabilidade dos macrófagos na dose de 5,39 nM e ainda capacidade de inibir 90% dos macrófagos (concentração inibitória-IC90) na dose de 17,90 nM.

Vij e Hardej (2012) também demonstraram a citotoxicidade de compostos orgânicos e inorgânicos de telúrio em cultura de células gastrointestinais, que diminuíram a viabilidade celular. Além disso, estudos realizados com as teluranas orgânicas (RF05, RF07 e RF19) demonstraram a citotoxicidade de RF07 (10 µM) e de RF19 (100 µM), que causaram hemólise em eritrócitos e células endoteliais da veia umbilical humana (MALUF et al., 2015), corroborando com os resultados encontrados no presente estudo para o teste de alamar blue, porém divergindo com os resultados de hemólise encontrado no presente trabalho. Os efeitos antiproliferativos induzidos pela RF07 em células tumorais apresentados neste estudo também foram encontrados em outros compostos a base de telúrio. SREDNI et al. (2012) avaliando a substância AS101, composto inorgânico de telúrio, encontrou ação antitumoral devido a sua ação inibitória em proteases, como a catepsina B, que está vinculada a invasão tumoral, metástase e angiogênese. Células cancerosas foram consideradas mais vulneráveis aos compostos de telúrio que as células normais em alguns estudos. O Composto (2-TeCD) com pontes de

telúrio, composto organotelúrio sintético, exibiu tanto a atividade catalítica de Glutathione peroxidase GPx como a atividade de inibidor da tiorrexina redutase (TrxR). Este composto ajudou a sensibilizar células de câncer de mama e cólon humano para TRAIL (receptor de morte) com base em observações de apoptose *in vivo* e *in vitro*, o que melhorou seu potencial terapêutico (LIN et al. 2011).

A mortalidade dos microcrustáceos, os efeitos citotóxicos e mutagênicos em células vegetais bem como os efeitos antiproliferativos induzidos pela RF07 podem estar implicados pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROS), danos oxidativos e/ou efeitos pro-oxidativos, causados pelo composto nas células analisadas como observados no teste de *S. cerevisiae*, culminando assim, em mutações cromossômicas, paradas do ciclo celular e conseqüentemente em morte celular (ABONDANZA et al., 2008; LOPES, 2010).

5. Conclusão

A Telurana RF07 apresentou alta toxicidade em células animais, além de efeitos citotóxicos e mutagênicos em células vegetais. Ademais apresentou atividade antitumoral em cultura primária de S180, AGP01, HL-60 e SKMEL-28 de forma similar aos efeitos de um quimioterápico (Doxorrubicina) bastante utilizado em tratamentos oncológicos. Esses efeitos da Telurana RF07 possivelmente estão associados ao estresse oxidativo mostrados em leveduras, ocasionando, assim, as mutações cromossômicas, parada do ciclo celular e morte celular observadas no presente estudo para o composto químico estudado.

6 Referências bibliográficas

ABONDANZA T.S., OLIVEIRA C.R., BARBOSA C.M.V., PEREIRA F.E.G., CUNHA R.L.O.R., CAIRES A.C.F., COMASSETO J.V., QUEIROZ M.L.S., VALADARES M.C., BINCOLETTO C. Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL-60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium (IV) compound RT-04. **Food and Chemical. Toxicology**, v.46, p. 2540-2545, 2008.

ANAN, Y. et al. Speciation and identification of tellurium-containing metabolites in garlic, *Allium sativum*. **Metallomics**, v. 5, p. 1215-1224, 2013.

BA LA, et al. Tllurium: an elemento with great biological potency and potential. **Rev. Organic e Biomolecular chemistry**, v. 8, p. 4203-4216, 2010.

BARBOSA, D. A.; JABES, D. L.; NUNES, L. R. Validação dos dados de microarray de *Paracoccidioides brasiliensis* exposto à telurana RF-07 por RT-PCR. **Anais do VIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Mogi das Cruzes**, 2014.

BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue cultur. **Science Direct**, v. 36, p. 102-111, 2015.

CUNHA, R. L. O. R.; GOUVEA, I. E.; JULIANO, L. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n.3, p. 393-407, 2009

FRIEDMAN, M.; BAYER, I.; LETKO, I.; DUVDEVANI, R.; ZAVARO-LEVY, O.; RON, B.; ALBECK, M.; SREDNI, B. Topical treatment for human papillomavirus-associated genital warts in humans with the novel tellurium immunomodulator AS101: assessment of its safety and efficacy. **British Journal of Dermatology**, v. 160, p. 403-408, 2009

HASSAN, W.; IBRAHIM, M.; NOGUEIRA, C. W.; BRAGA, A. L.; DEOBALD, A. M.; MOHAMMADZAI, I. U.; ROCHA, J. B. Influence of pH on the reactivity of diphenyl ditelluride with thiols and anti-oxidant potential in rat brain. **Chemico-Biological Interaction**, v. 15, p. 47-53, 2009.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation**, v. 7934, p.1-11, 2009.

LIN, T., DING, Z., LI, N., XU, J., LUO, G., LIU, J., SHEN, J. 2-Tellurium-bridged β -cyclodextrin, a thioredoxin reductase inhibitor, sensitizes human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 induction and NF- κ B suppression. **Carcinogenesis** v.32. p. 154–167.2011

LOPES, R. E. S. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, p. 1541-1548, 2010

MACIEL, E. N., BOLZAN, R. C. BRAGA, A. L. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect α -aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 310-319, 2000.

MALUF, S. E. C. et al. Hypervalent organotellurium compounds as inhibitors of *P. falciparum* calcium dependent cysteine proteases. **Parasitology International**, v. 65, p. 21-22, 2015.

MANILAL A., S. SUJITH, K. G. SEGHAL, J. SELVIN, C. SHAKIR. Cytotoxic potentials of red alga, *laurenciabrandenii* collected from the Indian coast. **Global Journal of Pharmacology**. v 3, p. 90-94, 2009.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, p. 13-18, 2011.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug information journal*, v. 32, n. 2, p. 513-524, 1998.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. ***Planta Medica***. v. 45, p. 31-34. 1982.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological. Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. The chemistry of organic selenium and tellurium compounds. PATAI'S Chemistry of functional groups ***Brazilian Journal of Chemistry***, v.26, n. 8 e a p. 1533-1541, 2012.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. ***Brazilian Journal of Chemistry***, v. 104, p. 6255-6285, 2004.

OGRA, Yasumitsu. Biology and toxicology of tellurium explored by speciation analysis. ***Metallomics***, [s.l.], v. 9, n. 5, p.435-441, 2017

OKUN, E. et al. The organotellurium compound ammonium trichloro (dioxoethylene-0,0') tellurate enhances neuronal survival and improves functional outcome in an ischemic stroke model in mice. ***Journal of Neurochemistry***, v.102, p. 1232-1241, 2007.

OLIVEIRA, G. L. S.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; DE ALENCAR, M.V.O.B.; GOMES-JÚNIOR, A.L.; SOUZA, A.A.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; FREITAS, R.M. Evaluation of antioxidante capacity of the aqueous extract of *Cynarascolymus L.* (Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. ***African Journal of Pharmacy and Pharmacology***, v. 7, n. 5, p. 136-147, 2014

PERSIKE, Daniele Suzete et al. Protective effect of the organotelluroxetane RF-07 in pilocarpine-induced status epilepticus. ***Neurobiology Of Disease***, [s.l.], v. 31 p.120-126, 2008

PIMENTEL, I. A. S., PALADII C.S., KATZI S., JUDICE W.A.S., CUNHA L. O. R., BARBIÉRI L.C. *In Vitro* and *In Vivo* Activity of an Organic Tellurium Compound on *Leishmania (Leishmania) chagasi*. ***PLoS ONE***, n. 13, p. 251-259, 2012.

PIOVAN, L., ALVES, M. F., JULIANO, L., BRÖMME, D., CUNHA, R. L. E ANDRADE, L. H. Structure-activity relationships of hypervalent organochalcogenanes as inhibitors of cysteine cathepsins V and S. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry***, n. 6, p. 2009-2014, 2011.

REZANKA, T.; SINGLER, K. Biologically active compounds of semi-metals. ***Phytochemistry***, v. 69, p. 585-606. 2008.

ROSA RM, HOCH NC, FURTADO GV, SAFFIJ, HENRIQUES JAP. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. ***Mutation Research*** v.633, p. 35-45, 2007.

SCHIAR VP, DOS SANTOS DB, PAIXÃO MW, NOGUEIRA CW, ROCHA JB, ZENI G. Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: a possible involvement of reactive oxygen species. **Chem. Biol. Interact.** v.177, p. 28-33, 2009.

SREDNI B. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. **Seminars in Cancer Biology.** v. 22. p. 60– 69. 2012.

STANGHERLIN E C, ROCHA J B, NOGUEIRA CW. Diphenyl ditelluride impairs short term memory and alters neurochemical parameters in young rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.91, p. 430–435, 2009.

STANGHERLIN E.C.; ROCHA J.B.T.; NOGUEIRA C.W. Diphenyl ditelluride impairs short-term memory and alters neurochemical parameters in young rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 2008.

VIJ P. HARDEJ D. Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non-transformed human colon cells. **Environ Toxicol Pharmacol.** v.34,p.768–782, 2012.

ZENI, G., CHIEFFI, A., CUNHA, R. L. O. R., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., STEFANI, H. A. E COMASSETO, J. V. Addition Reaction ofp-Methoxyphenyltellurium Trichloride to 3-Hydroxy Alkynes. **Organometallics**, n. 4, p. 803-806, 1999.

Capítulo II

**ORGANOTELURANA RF07: PERFIL TÓXICO E GENOTÓXICO EM
MODELOS *IN VIVO***

Artigo a ser submetido na revista **JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY**. Revista Qualis B1 para Farmácia

Organotelurana RF07: Perfil tóxico e genotóxico em modelos *in vivo*

Felipe Emannuel Alvino de Jesus¹, Octávio Augusto de Carvalho Maia¹, Rosália Maria Tôrres de Lima¹; Ag-Anne Pereira Melo de Meneses¹; José Victor de Oliveira Santos¹; Antonielli Campinho¹, Adriana Maria Viana Nunes², Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{3,4}, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante^{1,4}, João Marcelo de Castro e Sousa¹.

1 Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica – LAPGENIC; Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí. 64.049-550, Brasil.

2 Departamento de Biofísica e Fisiologia. Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí. 64.049-550, Brasil.

3 Departamento de Biofísica e Fisiologia. Laboratório de Cancerologia Experimental. Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí. 64.049-550, Brasil.

4 Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e Biotecnologia. Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí. 64.049-550, Brasil.

Email para correspondência: j.marcelo@ufpi.edu.br

RESUMO

Este estudo avaliou os possíveis efeitos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos da Telurana RF-07 nas concentrações de 1, 50 e 100 $\mu\text{mol/kg}$ em camundongos *Mus musculus*, por meio do ensaio cometa, teste de micronúcleos, testes hematológicos e bioquímicos em células não tumorais de sangue periférico e medula óssea. Animais saudáveis, do sexo feminino, receberam a administração por via intraperitoneal da substância testada. Foi feita a retirada de sangue da cauda dos animais nos tempos de 24h, 48h e 72h e, posteriormente, os animais foram eutanasiados para a retirada da medula óssea nos ossos femurais. A Telurana RF-07 induziu aumentos significativos do índice e frequência de danos, efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos pelo aumento de micronúcleos, assim como apresentaram citotoxicidade pela indução de apoptoses, interferência sobre a relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos em células de medula óssea de *Mus musculus* saudáveis bem como pela promoção de mielossupressão e hepatotoxicidade. Mais estudos são necessários para que doses seguras sejam encontradas e o composto possa ser usado em novas terapias.

Palavras-chave: Telurana RF-07; Efeitos toxicológicos; Genotoxicidade; Apoptoses

ABSTRACT

This study evaluated the possible genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of Telurane RF-07 at concentrations of 1, 50 and 100 $\mu\text{mol / kg}$ in *Mus musculus* mice, by means of the comet assay, micronucleus test, hematological and biochemical tests in non-tumor cells of peripheral blood and bone marrow. Female healthy animals received intraperitoneal administration of the tested substance. Blood was withdrawn from the animals' tail at 24h, 48h and 72h, and later the animals were euthanized for bone marrow removal in the femoral bones. Telurane RF-07 induced significant increases in index and frequency of damage, clastogenic and / or aneugenic effects due to the increase of micronuclei, as well as cytotoxicity by induction of apoptosis, interference on polyromatic and normochromatic erythrocytes in bone marrow cells of *Mus musculus* as well as the promotion of myelosuppression and hepatotoxicity. More

studies are needed so that safe doses are found and the compound can be used in new therapies.

Keywords: Telurane RF-07; Toxicological effects; Genotoxicity; Apoptosis

1 Introdução

O telúrio é um semimetal não radioativo pertencente à família dos calcogênios grupo 16 da tabela periódica. Em razão de suas propriedades, a aplicação do telúrio é bastante conhecida nas metalúrgicas fazendo parte da composição de ligas metálicas, painéis solares e alguns tipos de discos magnéticos (CUNHA et. al. 2009; CHIVERS, LAITINEN 2015; OGRA 2017). Os compostos derivados do telúrio podem ser divididos em dois grupos de acordo com o estado de oxidação. Um primeiro é formado por derivados divalentes que são representados por compostos análogos aos álcoois e tióis. O segundo compreende um grupo maior formado por compostos hipervalentes com estado de oxidação de +4 e +6, é neste último que está presente as organoteluranas ou apenas teluranas (CUNHA et al.,2009).

Os derivados do telúrio apresentam uma grande quantidade de atividades biológicas, o composto AS-101 desenvolve uma atividade imunomoduladora por meio da inibição da função de alguns subtipos de linfócitos e integrinas leucocitárias específicas, também induz a produção de IL-2 e promove ainda a restauração das células de regulação do sistema imune. Além de apresentar atividade anticancerígena (SREDNI 2012; HALPERT e SREDNI et.al. 2014). Foi observado também em outros grupos de compostos derivados do telúrio a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana (HALPERT e SREDNI 2014), podem também inibir seletivamente as enzimas cisteíno protease (PERSIKE et al. 2008; CUNHA et.al. 2009).

A organotelurana RF-07 é um composto orgânico que contém o telúrio em sua estrutura, este composto apresenta atividades biológicas interessantes, as quais destacam-se atividade leishmanicida (PIMENTEL et al., 2012) antifúngica (BARBOSA; JABES; NUNES, 2014), e antimalárica demonstrada através da ação inibitória de cisteína proteases em cepas de *Plasmodium falciparum* (MALUF et al., 2015).

A toxicologia do telúrio é pouco conhecida, em casos de intoxicação aguda os sintomas observados foram: dores de cabeça, sonolência, alteração na frequência cardíaca, enjoo, espiração e urina com forte odor. As teluranas apresentam uma

atividade sobre os tiós e em razão disso pode induzir a formação de poros na membrana interna das mitocôndrias influenciando diretamente na morte celular promovendo diminuição da viabilidade, caracterizando uma citotoxicidade (CUNHA et al., 2009; VIJ et al., 2012; QUINES 2013). Frente aos achados da RF07 identificados na literatura e aos possíveis efeitos que venham a ser descobertos, considera-se fundamental conhecer o potencial toxicológico desse composto, o presente estudo avaliou o potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico da telurana RF-07 por meio do ensaio cometa, teste de micronúcleos e parâmetros hematológicos e bioquímicos em camundongos *Mus musculus*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Síntese e determinação da concentração da RF07

A síntese e a caracterização da RF-07 foram realizadas no Centro de Ciências Naturais e Humanas (Universidade Federal do ABC, Santo André, São Paulo) e estão descritas a seguir. O Composto RF-07 foi sintetizado pela reação do tricloreto de p-metoxifenil telúrio com 1-etinil-1-ciclohexanol em refluxo de benzeno, como descrito por Zeni et al. (1999). Após a preparação, o produto RF-07 foi inicialmente purificado por cristalização fracionada e, em seguida, repurificado por recristalização para a utilização nos ensaios biológicos. O produto e todos os reagentes utilizados para a síntese foram caracterizados por técnicas de espectroscopias como infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{125}Te e análise elementar (C, H, N). Essas técnicas garantem tanto a identidade quanto a pureza do composto utilizado.

As concentrações (1 $\mu\text{Mol/kg}$, 50 $\mu\text{Mol/kg}$ e 100 $\mu\text{Mol/kg}$) utilizada nos ensaios foram determinadas a partir das doses administradas em camundongos para avaliação tóxica de compostos derivados de telúrio realizado por Meotti et al. (2003).

2.2 Tratamento dos animais com o composto RF07

Os experimentos *in vivo* foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA 039/17). Foram utilizados para os experimentos 25 camundongos (*Mus musculus*), da linhagem Swiss, albinos, fêmeas, pesando entre 25 a 30 g, com aproximadamente 2 meses de idade,

provenientes do Biotério Central. Os animais foram mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a 22 ± 1 °C, com livre acesso à ração tipo pellets (Purina®) e água, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas cada. Os animais foram divididos em 5 grupos com 5 animais em cada grupo e submetidos a dose aguda em concentrações diferentes (1, 50 e 100 $\mu\text{Mol/kg}$). Foram utilizados DMSO a 0.5% como controle negativo e ciclofosfamida a 20 mg/kg como controle positivo. Os tempos de exposição utilizados foram 24, 48 e 72h.

2.3. Teste cometa em sangue periférico de camundongos *Mus musculus*

A telurana RF-07 foi administrada via intraperitoneal. Após cada tempo de tratamento (24, 48 e 72h), 0,5 ml de sangue periférico caudal foi retirado de cada animal. O teste cometa foi realizado segundo Hartmann et al., (2003) para avaliação de danos genotóxicos em sangue periférico obtido por meio de punção caudal de camundongos *Mus musculus*. Alíquotas de 10 μl das amostras de sangue periférico foram misturados com uma fina camada de agarose “low melting” 0,75% (90 μl) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%, foram cobertas com lamínulas (24 x 60 mm), e mantidas em temperatura ambiente até a solidificação. Retirou-se a lamínula e mergulhou-se a lâmina em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) a 4°C e protegida da luz, por 72 horas. Em seguida, realizou-se a corrida de eletroforese com a solução de eletroforese (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13), sob banho de gelo para a manutenção da temperatura em torno de 4°C, por 20 minutos, para o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios alcalino-lábeis. A eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA, por 20 minutos na presença de luminárias com baixo comprimento de onda. Posteriormente, as lâminas foram retiradas da cuba de eletroforese e mergulhadas na solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos; e expostas por 10 minutos, à solução fixadora (Ácido tricloroacético 15%, Sulfato de zinco heptahidratado 5%, e Glicerol 5%). Após secas, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa à 10% e lavadas com água destilada por 3 vezes, sendo estas deixadas em bandejas para secagem em temperatura ambiente.

Para cada grupo, $n = 5$, foram fotografadas 100 células por lâmina, sendo 2 lâminas por animal. A avaliação foi realizada a partir da análise do tamanho e intensidade de degradação e arraste do material genético, onde 5 classes de danos foram

identificadas: classe 0, material genético sem dano ou intacto; classe 1, classe 2; classe 3; até o máximo de dano, classe 4. Por fim, calculou-se o índice de dano (ID), variando de 0 a 400, segundo a fórmula: $\Sigma 0 \times (C0) + 1 \times (C1) + 2 \times (C2) + 3 \times (C3) + 4 (C4)$. Nota: “C0” representa o número de núcleos em Classe 0, “C1” representa o número de núcleos em Classe 1, “C2” representa o número de núcleos em Classe 2, “C3” representa o número de núcleos em Classe 3 e “C4” representa o número de núcleos em Classe 4; em 100 núcleos avaliados. Também foi calculada a frequência de dano (FD), variando de 0 a 100%, segundo a fórmula: $FD (\%) = 100\% - \text{danos de classe 0 (C0)}$. Para avaliação de células apoptóticas, 200 células por animal foram contabilizadas com os resultados dispostos em porcentagem.

2.4 Teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos *Mus musculus*

O teste de micronúcleos (MN) utilizando células de medula óssea foi realizado de acordo com metodologia descrita previamente por Krishna e Hayashi (2000). Após a eutanásia dos animais, os dois ossos fêmurais de cada roedor foram retirados e lavados internamente com soro bovino fetal (20%), para lavagem da medula óssea. 25 μ L da suspensão celular foram direcionados a lâminas de vidro, para fixação e coloração com Giemsa 10%. Para a determinação da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) o que caracteriza o efeito mutagênico da RF07 foram observados 2000 eritrócitos policromáticos (EPC) por animal, totalizando 10.000 células por tratamento Para determinar a citotoxicidade do composto na medula óssea dos animais, foi contabilizado um total de 400 eritrócitos (EPC+ENC) por animal (200/lâmina) e 2000 células por tratamento. Nesse caso, a relação eritrocítica foi calculado por (EPC/PCE+NCE). Para esta análise foi utilizado microscópio óptico com objetiva de aumento de 100x

2.6 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Para análise hematológica, as amostras foram coletadas em tubos de ensaios com anticoagulante EDTA e foram rapidamente analisados os seguintes parâmetros: hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), RDW, leucócitos e plaquetas. Os ensaios foram realizados no Analisador Hematológico automático Mindray Modelo BC-2800 (EUA).

Para análise bioquímica, as amostras de sangue total foram coletadas e armazenadas em tubos de ensaios e depois centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos. Logo após, foram dosados os seguintes parâmetros: uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Os ensaios foram realizados no Analisador Bioquímico Bioplus semiautomático Modelo BIO-2000 IL (BR).

2.6 Análise estatística

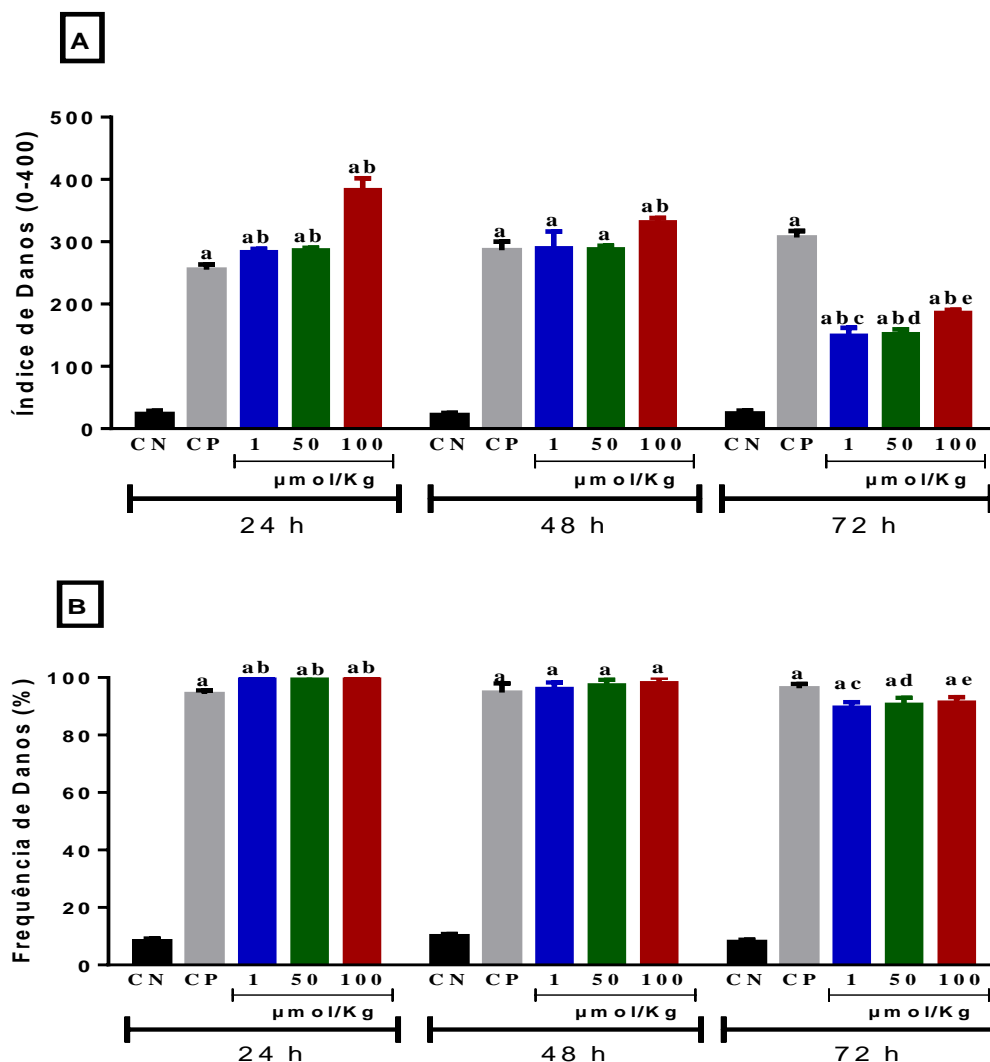
A análise dos resultados foi realizada pela análise de variância One-way e Two-way (ANOVA) seguido do por Tukey como Post hoc teste, utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego Califórnia U.). O valor de $p < 0.05$ foi utilizado como valor de significância.

3 Resultados

3.1 Avaliação genotóxica do composto Telurana RF07

A Telurana RF07 se mostrou genotóxica com valores estatisticamente significantes para o índice e para a frequência de dano nas concentrações testadas nos tempos de exposição (TE) 24, 48 e 72 horas quando comparados com o controle negativo. Nas primeiras 24h de exposição, a RF07 apresentou efeito genotóxico significativamente superior ao controle positivo para índice de dano e frequência de dano. Porém, para 48h, esse valor só foi estatisticamente superior na maior concentração (100 $\mu\text{mol/Kg}$) no índice de dano. Enquanto que para o último tempo de exposição, a RF07 se mostrou estatisticamente menos genotóxica do que o CP (Figura 1). Possivelmente, a capacidade de reparo das células animais diante do efeito genotóxico do composto ocorreu no último TE, já que as 3 concentrações da RF07 foram estatisticamente inferiores aos TE de 24 e 48h. Mesmo com o mecanismo de reparo, a RF07 no TE de 72 h continuou genotóxica com valores de ID e FD superiores quando comparados ao CN.

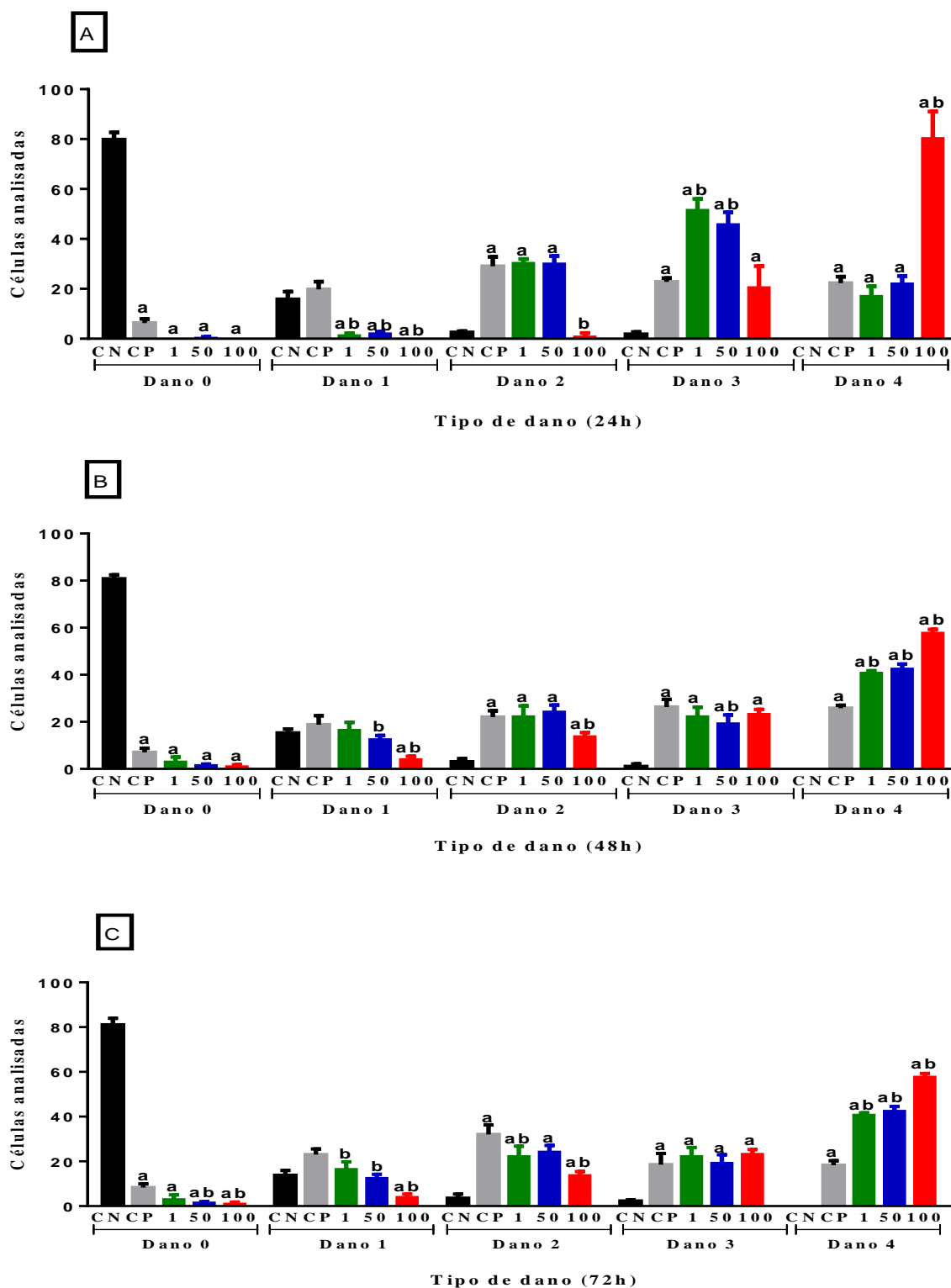
Figura 1. Avaliação genotóxica (índice de danos e frequência de danos) do composto Telurana RF07 em células sanguíneas de *Mus musculus* e a capacidade de reparo dessas células avaliadas em diferentes tempos de exposição.



CN: controle negativo (sem tratamento). CP: controle positivo (DOX a 2 mg/kg). ANOVA-One-way e pós-teste de Tukey $n=5$. Valores significantes (MD \pm DP) de $p<0.05$ para ^a comparado ao grupo CN, ^b à CP no mesmo tempo de exposição; ^c diferente quando comparado para 24 e 48h na concentração de 1 μ mol/Kg; ^d diferente quando comparado para 24 e 48h na concentração de 50 μ mol/Kg; ^e diferente quando comparado para 24 e 48h na concentração de 100 μ mol/Kg.

A variação quantitativa dos tipos de danos também foi avaliada, no qual se observou que a RF07 nas três concentrações induziu estatisticamente maiores danos do tipo 2, 3 e 4 nas células animais em comparação ao CN. Quando comparados ao CP, a substância causou mais danos do tipo 3 nas concentrações de 1 e 50 μ mol/kg e tipo 4 na concentração de 100 μ mol/kg no TE 24h. Para os TE 48 e 72h, a RF07 induziu estatisticamente mais danos do tipo 4 quando comparados ao CP (Figura 2B e C).

Figura 2: Variação quantitativa dos tipos de danos (0 – 4) para o teste cometa em células de sangue periférico de *Mus musculus* tratadas com o composto Telurana RF07 em diferentes tempos de exposição (24, 48 e 72h)



CN: controle negativo (sem tratamento). CP: controle positivo (DOX a 2 mg/kg). ANOVA-One-way e pós-teste de Tukey. Valores significantes (Média \pm DP) de $p < 0.05$ para ^a comparado ao grupo CN e ^b à CP no mesmo tipo de dano.

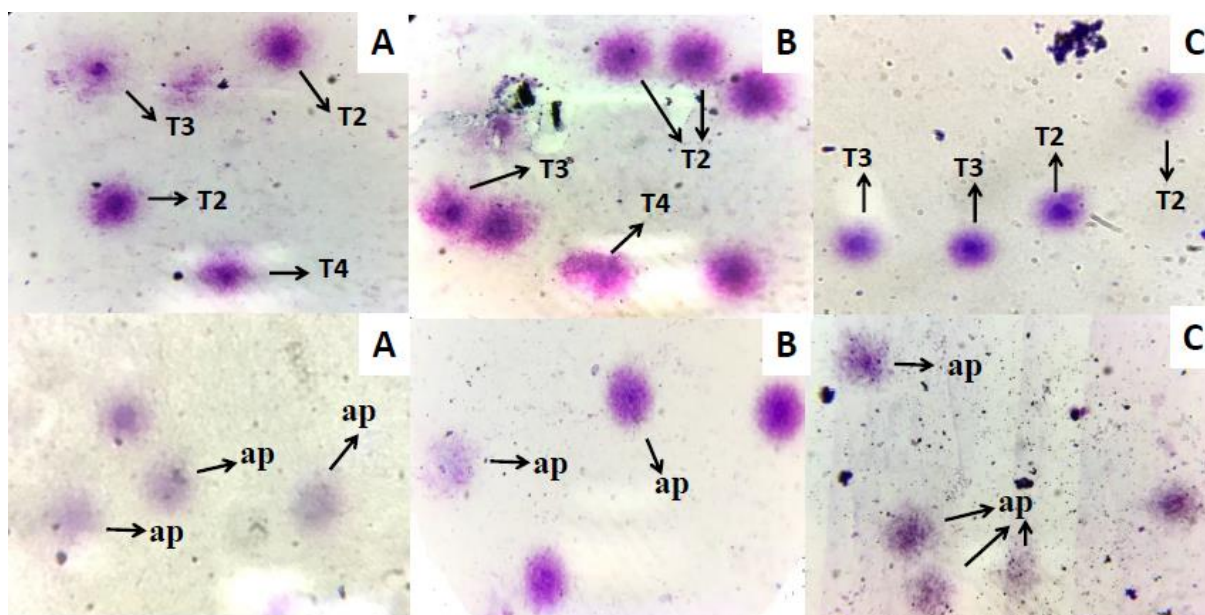
Na análise fotomicrográfica observou-se células em apoptose, a RF07 em todas as concentrações e tempos de exposição induziu morte celular em comparação ao CN. Ademais, em comparação ao CP, a organotelurana causou maiores valores de apoptose nas primeiras 24h de tratamento e no último TE. Quando comparados os diferentes TE na mesma concentração, observou-se, de forma estatística, que nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol/kg}$ ocorreu uma diminuição de células em apoptose na medida em que aumentava o período de tratamento (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1: Avaliação do percentual de apoptose em células sanguíneas de *Mus musculus* causada pelo composto Telurana RF07 avaliadas em diferentes tempos de exposição.

| Tratamento | Concentração | 24 h | 48 h | 72 h |
|---------------------|------------------------|----------------------|---------------------|---------------------------|
| CN (DMSO) | 0,5% | $4,0 \pm 2,3$ | $4,0 \pm 1,4$ | $3,0 \pm 2,4$ |
| CP (Ciclofosfamida) | 2 mg/kg | $31,0 \pm 2,5^a$ | $35,7 \pm 2,9^a$ | $41,5 \pm 3,8^{a\delta}$ |
| | 1 $\mu\text{mol/kg}$ | $39,2 \pm 6,2^{ab}$ | $32,5 \pm 3,6^a$ | $13,5 \pm 1,2^{ab\delta}$ |
| Telurana RF07 | 50 $\mu\text{mol/kg}$ | $41,25 \pm 1,2^{ab}$ | $32,2 \pm 1,5^a \#$ | $24,0 \pm 1,4^{ab\delta}$ |
| | 100 $\mu\text{mol/kg}$ | $49,7 \pm 6,7^{ab}$ | $31,2 \pm 1,8^a \#$ | $22,0 \pm 1,6^{ab\delta}$ |

ANOVA-One-way e pós-teste de *Tukey* $n=5$. Valores significantes (MD \pm DP) de $p<0,05$ para ^a comparado ao grupo CN, ^b à CP no mesmo tempo de exposição; [#] à 24 h na mesma concentração; ^{\delta} à 48 h na mesma concentração.

Figura 3. Perfil fotomicroográfico de células sanguíneas de *M. musculus* expostos ao composto Telurana RF07 através do ensaio cometa evidenciando os tipos de danos e células em apoptose. A: 1 $\mu\text{mol/kg}$; B: 50 $\mu\text{mol/kg}$; C: 100 $\mu\text{mol/kg}$. T2: dano tipo 2. T3: dano tipo 3. Ap: apoptose. Coloração por Giemsa. Aumento de 400X.



3.2 Avaliação citotóxica e mutagenicidade do composto RF07

A Telurana RF07 promoveu significantes ($p < 0,05$) decréscimos da relação $EPC/EPC+ENC$, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol/kg}$ em células de medula óssea em comparação ao grupo CN, além disso, nas três concentrações houve diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo CP (ciclofosfamida) apresentando os seguintes valores a $0,86 \pm 0,01$, $0,64 \pm 0,01$, $0,60 \pm 0,02$ para as concentrações de 1, 50 e 100 $\mu\text{mol/kg}$, respectivamente, o que demonstra o efeito citotóxico do composto químico em questão. Em relação à mutagenicidade, a substância testada nas duas maiores concentrações (50 e 100 $\mu\text{mol/kg}$) induziu significantes ($p < 0,05$) danos mutagênicos em comparação ao CN (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da ação mutagênica e citotóxica do composto Telurana RF07 em células de medula óssea de *Mus musculus* por meio do teste de micronúcleos (MN).

| Mutagenicidade e Citotoxicidade | | | |
|--|------------------------|---------------------|----------------------|
| Tratamentos | Concentração | Micronúcleos | EPC/EPC+ENC |
| CN (DMSO) | 0,5% | $1,95 \pm 0,60$ | $0,90 \pm 0,02$ |
| CP (Ciclofosfamida) | 20 mg/kg | $33,25 \pm 2,63^a$ | $0,43 \pm 0,02^a$ |
| | 1 $\mu\text{mol/kg}$ | $3,75 \pm 1,93^b$ | $0,86 \pm 0,01^b$ |
| Telurana RF07 | 50 $\mu\text{mol/kg}$ | $26,37 \pm 1,88^a$ | $0,64 \pm 0,01^{ab}$ |
| | 100 $\mu\text{mol/kg}$ | $30,87 \pm 1,26^a$ | $0,60 \pm 0,02^{ab}$ |

Sem tratamento: DMSO 0,5%. CP: controle positivo (20 mg/kg). Relação entre o número de eritrócitos policromáticos e a soma de eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) em 400 células analisadas (EPC/EPC+ENC). ANOVA-One-way e pós-teste de *Tukey*. $n=5$. Valores significantes (MD \pm DP) de $p < 0,05$ para ^a comparado ao controle negativo, ^b à CPA.

3.3. Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos de *M. musculus* submetidos a Telurana RF07

Para avaliar os efeitos tóxicos causados pela Telurana RF07 no organismo, os níveis plasmáticos de uréia, creatinina, AST e ALT relacionadas a parâmetros bioquímicos e níveis plasmáticos relacionados ao eritrograma, leucograma e plaquetograma de testes hematológicos foram avaliados. No que diz respeito aos parâmetros hematológicos, observou-se significativa ($p < 0,05$) leucopenia, com presença de neutropenia, linfocitose e monocitose, nas três concentrações usadas, quando comparados ao grupo controle. Em relação aos demais parâmetros hematológicos analisados, não houve alterações significantes. Para os parâmetros bioquímicos,

observou-se, nas maiores concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol/Kg}$, alterações estatisticamente significantes apenas para AST (TGO) (Tabela 03).

Tabela 3. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Mus musculus* tratados com Telurana RF07 (1, 50 e 100 $\mu\text{mol/Kg}$). ANOVA-*one-way* e pós-teste de *Tukey*. Significância de ^a $p < 0,05$ comparado ao CN; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com CP. Todos comparados em relação ao mesmo parâmetro.

| Parâmetros | CN | CP | RF07 1 $\mu\text{mol/Kg}$ | RF07 50 $\mu\text{mol/Kg}$ | RF07 100 $\mu\text{mol/Kg}$ |
|---------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Hematológico | | | | | |
| Leucócitos totais | 4552,5 \pm 405,0 | 2392,5 \pm 478,7 ^a | 3025 \pm 818,5 ^{ab} | 2550 \pm 556,0 ^a | 2675 \pm 292,0 ^a |
| Neu | 55,3 \pm 1,9 | 24,0 \pm 0,9 ^a | 7,5 \pm 1,8 ^{ab} | 4,1 \pm 2,7 ^{ab} | 5,8 \pm 8,9 ^{ab} |
| Lin | 36,8 \pm 1,4 | 71,5 \pm 5,3 ^a | 67,5 \pm 3,1 ^a | 74,1 \pm 4,2 ^a | 72,5 \pm 10,3 ^a |
| Mon | 6,1 \pm 0,9 | 2,2 \pm 4,5 | 23,4 \pm 2,8 ^a | 20,4 \pm 2,8 ^a | 20,3 \pm 1,7 ^a |
| Eos | 0,4 \pm 0,1 | 1,1 \pm 0,1 | 0,5 \pm 0,1 | 0,3 \pm 0,1 | 0,5 \pm 0,5 |
| Bas | 1,1 \pm 0,2 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,1 | 0,9 \pm 0,1 | 1,0 \pm 0,6 |
| GV | 8,1 \pm 0,9 | 7,1 \pm 1,2 | 10,2 \pm 2,9 | 4,80 \pm 2,6 | 6,8 \pm 0,8 |
| Hb | 13,1 \pm 1,2 | 12,8 \pm 0,8 | 11,2 \pm 3,5 | 5,4 \pm 2,6 ^a | 7,3 \pm 0,3 |
| Ht | 45,1 \pm 5,4 | 36,8 \pm 6,1 | 50,9 \pm 14,4 | 22,9 \pm 12,1 ^a | 32,9 \pm 0,9 ^a |
| VCM | 56,0 \pm 0,9 | 50,8 \pm 0,9 | 49,2 \pm 2,2 | 47,2 \pm 1,9 | 48,5 \pm 2,5 |
| HCM | 17,0 \pm 0,3 | 17,4 \pm 0,6 | 11,0 \pm 1,3 | 11,0 \pm 1,0 | 11,0 \pm 0,7 |
| CHCM | 31,8 \pm 1,8 | 32,9 \pm 1,2 | 22,3 \pm 1,6 | 23,1 \pm 1,4 | 22,7 \pm 2,3 |
| RDW | 13,9 \pm 0,3 | 13,7 \pm 1,6 | 19,6 \pm 2,6 | 21,0 \pm 1,4 | 21,3 \pm 0,2 |
| PLT | 787,7 \pm 149,6 | 691,7 \pm 138,0 | 937,5 \pm 428,2 | 861,7 \pm 398,9 | 1186,5 \pm 37,1 ^{ab} |
| Bioquímico | | | | | |
| Ureia | 34,7 \pm 2,7 | 67,2 \pm 6,3 ^a | 27,0 \pm 7,1 ^b | 39,7 \pm 5,3 ^b | 54,0 \pm 5,5 ^a |
| Creatinina | 0,5 \pm 0,1 | 1,6 \pm 0,1 | 0,6 \pm 0,1 | 0,6 \pm 0,1 | 2,2 \pm 3,1 |
| AST (TGO) | 110,7 \pm 9,5 | 162,2 \pm 13,5 | 121,5 \pm 13,9 ^b | 158,2 \pm 20,1 ^a | 194,5 \pm 41,8 ^{ab} |
| ALT (TGP) | 58,7 \pm 8,3 | 82,0 \pm 7,0 | 60,2 \pm 10,2 | 57,0 \pm 15,7 | 55,2 \pm 16,4 ^b |

Legenda: CN= controle negativo (sem tratamento); CP= controle positivo (ciclofosfamida a 20mg/Kg); Neu= neutrófilos/ μL ; Lin= linfócitos/ μL ; Mon= monócitos/ μL ; Eos= eosinófilos/ μL ; Bas= basófilos/ μL ; GV= glóbulos vermelhos $\times 10^6/\mu\text{L}$; Hb= hemoglobina (g/dL); Ht= hematócrito (%); VCM= Volume corpuscular médio (fL); HCM= Hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL); RDW= Distribuição de eritrócitos (%); PLT= plaquetas $\times 10^3/\mu\text{L}$; Uréia (mg/dL); Creatinina (mg/dL); AST= Aspartato aminotransferase (U/L); ALT= Alanina aminotransferase (U/L).

4. Discussão

Mesmo com o crescente uso de compostos orgânicos contendo telúrio na química e bioquímica, o estudo da toxicidade dessas substâncias até o momento ainda é escassa na literatura. Sabe-se que assim como o telúrio elementar e os sais inorgânicos, os compostos orgânicos de telúrio, tais como a organoteluranas, tendem a ser bastante tóxicos, e a intensidade desta toxicidade depende tanto da estrutura do composto, da dose administrada e do tipo de animal testado (NOGUEIRA et al., 2012). Assim, o presente estudo utilizou-se de um modelo experimental *in vivo* para avaliar os efeitos tóxicos, citotóxicos, e genotóxicos de da telurana RF07, um composto derivado do telúrio.

A genotoxicidade observada nas três concentrações avaliadas de RF07 no teste de cometa e micronúcleos corrobora com estudos realizados por Meinerz et al. (2014). Os autores utilizando $(\text{PhTe})_2$ um derivado do telúrio, e observaram genotoxicidade na concentração de 500 $\mu\text{mol/kg}$ por meio do ensaio de cometa. O possível mecanismo utilizado para explicar a toxicidade dos compostos orgânicos de telúrio é a capacidade de oxidar os grupamentos sulfidrílicos, inativando enzimas e/ou diminuindo a concentração de moléculas sulfidrílicas não-protéicas como a GSH (BARBOSA et al., 1998; NOGUEIRA et al., 2003) como a esqualeno monooxigenase e Na^+/K^+ ATPase (LADEN e PORTER, 2001; BORGES et al., 2005).

Doses próximas à DL_{50} , o (S)-dimetilo 2-(3- (fenilquilanil) propanamido) succinato produziu efeitos mutagênicos em camundongos machos adultos, avaliado pelo aumento da frequência de micronúcleos e produziu efeitos genotóxicos significantes nos leucócitos dos camundongos. Esses efeitos podem estar ligados à atividade pró-oxidante exibida por altas concentrações/doses de compostos organotelúricos. O mecanismo molecular envolvido ainda é desconhecido, no entanto, pode ser relacionado à reatividade do telúrio e sua propensão a ser oxidado para Te (IV), que pode potencialmente interagir com os centros nucleófilos diferentes nas biomoléculas. Recentemente foi demonstrada que a exposição ao diselenido de difenilo causou danos ao DNA e depleção de GSH nos diferentes tecidos de camundongos (ROSA et al., 2007; MEINERZ et al., 2014). O conhecimento da toxicidade relativa dos compostos orgânicos contendo Te e Se é importante devido o uso de organocalcogênicos na síntese orgânica, aplicações industriais e como possíveis componentes de uma variedade de agentes farmacológicos (ROSA et al., 2007, CUNHA et al., 2009)

Ratos adultos foram tratados com Ditelureto de difenila $(\text{PhTe})_2$ durante 7 dias nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{mol/kg}$, e foi observado que o composto induziu sinais proeminentes de toxicidade (perda de peso corporal), alterações comportamentais e aumento da peroxidação lipídica no cérebro. $(\text{PhTe})_2$ diminuiu as enzimas antioxidantes cerebrais catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e tiorredoxina redutase (TrxR). O cérebro foi mais suscetível ao estresse oxidativo induzido por $(\text{PhTe})_2$ do que o fígado. A inibição de selenoenzimas importantes (TrxR e GPx) parece estar envolvida na neurotoxicidade associada à exposição $(\text{PhTe})_2$ em camundongos adultos. (COMPARSI et al., 2012)

Engman et al., (2000) afirmaram que os compostos de Te são capazes de inibir a TxrR (Thioredoxina redutases) e causar citotoxicidade *in vitro* o que colabora com os resultados de apoptose e relação eritrocitária observados no presente estudo. O $(\text{PhTe})_2$ oxida o ditioneitol (DTT), além de inibir a atividade da enzima sulfidrílica δ -ALA-D. Essa enzima é considerada um dos alvos dos compostos orgânicos de telúrio, pois apresenta em seu sítio ativo dois resíduos de cisteinil, que são facilmente oxidados *in vitro* e *in vivo* por compostos de orgânico telúrio (MACIEL et al., 2000; MEOTTI et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2003).

O presente estudo mostrou resultados significantes de citotoxicidade da RF07 tanto no ensaio cometa enfatizado pelas porcentagens significantes de apoptoses bem como pela redução significativa da relação eritrocitária quando tratados com as diferentes concentrações do composto. Estudos feitos por Sailer e colaboradores (2004) mostra que tanto a 2,20-dimetoxidifenil-ditellurida quanto a 2,20-diamino-3,30,5,50-tetrametildifenil-ditellurida são potentes agentes citotóxicos, enquanto análogo sem telúrio, 2,20-dimetoxibifenilo não foi citotóxico nas doses e tempos testados. Os dois compostos contendo telúrio foram capazes de induzir a morte celular apoptótica em células HL-60 eucariotas de uma maneira dependente da dose, essas doses variando de 5×10^{-6} a 5×10^{-5} M nas primeiras 6h de tratamento. A análise por citometria de fluxo indicou uma pequena população de células no final da fase G1/S que pareceu interromper a progressão no ciclo celular (SAILER et al., 2004)

O mecanismo real pelo qual os compostos contendo telúrio induzem a morte celular apoptótica é desconhecido. Mas, com base nas semelhanças químicas entre o telúrio e o selênio, o mecanismo de ação intracelular pode ser comparável ao proposto para os compostos contendo selênio (e outros metais). Foi formulada a hipótese de que formas inorgânicas e orgânicas de selênio podem funcionar como interruptores redox em inúmeras vias bioquímicas, levando a ruptura da química intracelular e morte celular apoptótica (SAILER et al., 2004). Em estudos realizados com Ditelureto de difenila, 3,3-Diaminodifenil ditelureto e 4,4-Diisopropildifenil ditelureto frente à linhagem promielocítica humana (HL-60) foi observado que todos os compostos de organotelúrio avaliados induziam uma forma apoptótica de morte celular colaborando com os resultados apresentados no nosso estudo. A indução de apoptose ocorreu de forma dependente do tempo e da dose analisada por três métodos analíticos diferentes: microscopia de fluorescência, eletroforese em gel e citometria de fluxo. As células

apoptóticas foram evidentes com 2h após o tratamento com concentrações de 1×10^{-6} M. (SAILER et al.2003)

A avaliação dos parâmetros bioquímicos demonstrou hepatotoxicidade na maior concentração de RF07 (100 μ /ml). A toxicidade hepática e renal *ex vivo* já foram observadas para alguns compostos orgânicos de telúrio. Os marcadores mais comuns de hepatotoxicidade são as atividades plasmáticas da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT), que se tornam aumentadas quando há dano causado pelos compostos derivados do telúrio (MEOTTI et al., 2003; SAVEGNAGO et al., 2006). Pequenas doses de (PhTe)₂ em ratos (0,5 μ mol/kg), mostrou um acréscimo na atividade da alanina aminotransferase e da aspartato aminotransferase no soro, indicando que (PhTe)₂ induz alterações nas funções normais do fígado e rins das cobaias (MEOTTI et al 2003). Ademais, Rooseboom et al. (2002) sintetizaram a Tefenil-Ltelurocisteína, e verificaram que este composto é capaz de depletar GSH e de aumentar a atividade da lactato desidrogenase (LDH) em hepatócitos de ratos tanto quanto o paracetamol, um conhecido agente hepatotóxico.

Reafirmando os resultados do presente estudo, Lacerda e colaboradores (2012) trataram ratos com uma injeção intraperitoneal de um organocalcogênio (3-metil-1-fenil-2- (fenilmaleno) oct-2-en-1-ona) nas doses de 125, 250 ou 500 mg-kg⁻¹ e após 60 minutos foi realizada a análise do sangue para a determinação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Observou-se alterações na atividade da ALT nas doses de 250 e 500 mg-kg⁻¹, e um aumento na contagem de neutrófilos na dose de 125 mg-kg⁻¹. Leucócitos humanos foram expostos a 5-50 μ M de ebselen, (PhSe)₂ e (PhTe)₂. Todos os compostos foram citotóxicos na maior concentração testada. Foi observado que o (PhTe)₂ pode causar citotoxicidade e genotoxicidade nos leucócitos, observado, respectivamente, por uma diminuição em viabilidade celular no teste de exclusão de azul de Trypan e um aumento de ID no Ensaio Cometa, onde o efeito (PhTe)₂ apresentou o mais genotóxico (BUENO et al., 2013).

Cabe ressaltar que a toxicidade é apenas causada se os mecanismos de detoxificação são suplantados por uma quantidade excessiva de telúrio ou de seus compostos, tais como a organotelurana RF07. Por se tratar de um elemento raro, pode-se afirmar que o perigo de envenenamento ocupacional ou ambiental por este elemento não é uma grande ameaça à existência humana, mas, apesar disso, ainda é considerado

um elemento tóxico na maioria dos estudos, e agora com o presente estudo também citotóxico e genotóxico (LACERDA et al., 2012).

5 Conclusão

A organotelurana RF07 apresentou em tratamento com doses agudas mutagenicidade em medula óssea pelo significativo aumento de micronúcleos e genotoxicidade pelo aumento do índice e frequência de danos ao DNA observados nas avaliações com sangue periférico. Ademais, o composto se mostrou citotóxico em células sanguíneas animais, causando morte celular provavelmente pela alta capacidade de causar mutações e aumentar o estresse oxidativo intracelular. Por fim, causou efeitos hepatotóxicos e distúrbios no tecido hematopoiético, necessitando assim de estudos adicionais para determinação de concentrações seguras para futuras formulações farmacêuticas.

6 Referências bibliográficas

BARBOSA, D. A.; JABES, D. L.; NUNES, L. R. Validação dos dados de microarray de *Paracoccidioides brasiliensis* exposto à telurana RF-07 por RT-PCR. Anais do VIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Mogi das Cruzes. 2014

BARBOSA, N. B. V. Effect of organic forms selenium on aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 149, p. 243-253, 1998.

BORGES, V. C.; ROCHA, J. B.; NOGUIRA, C. W. Effect of diphenyl diselenide, dipheyliditelluride and ebselen on cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats. **Toxicology**, v. 215, p. 191-197, 2005.

BUENO D.C.; MEINERZ D.F.; ALLEBRANDT J.; WACZUK E.P.W.; SANTOS D.B.; MARIANO D.O.C.; ROCHA J.B.T. Cytotoxicity and Genotoxicity Evaluation of CHIVERS T.; LAITINEN R.S. Tellurium: a maverick among the chalcogen. **Chem. Soc. Rev.** v.44. p. 1725-1739, 2015.

COMPARSI, B., MEINERZ, D. F., FRANCO, J. L., POSSER, T., DE SOUZA PRESTES, A., STEFANELLO, S. T., DOS SANTOS, D. B., WAGNER, C., FARINA, M., ASCHNER, M., DAFRE, A. L. E ROCHA, J. B. T. Diphenyl ditelluride targets brain selenoproteins in vivo: inhibition of cerebral thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in mice after acute exposure. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 370, n. 1-2, p. 173-182, 2012.

CUNHA, R. L. O. R.; GOUVEA, I. E.; JULIANO, L. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n.3, p. 393-407, 2009

CUNHA, R. L. O. R.; URANO, M. E.; CHAGAS, J. R.; ALMEIDA, P. C.; BINCOLETTO, C.; TERSARIOLB, I. L. S.; COMASSETO, J. V. Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium (IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 755–760, 2005

ENGMAN, L.; KANDRA, T.; GALLEGOS, A.; WILLIAMS, R.; POWIS, G. Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. **Anticancer Drug Design**, v. 15, p. 323-330, 2000.

HALPERT, G. E SREDNI, B. The effect of the novel tellurium compound AS101 on autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 12, p. 1230-1235, 2014.
HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2014.

KRISHNA G, HAYASHI M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat Res.** v.20. p-155-66. 2000.

LACERDA, D. S. Acute administration of the organochalcogen 3-methyl-1-phenyl-2-(phenylseleno)octa-2-1-one induces biochemical and hematological disorders in male rats. **Cell Biochemistry Function**, v. 30, p. 351-319, 2012.

LADEN, B. D.; PORTER, T. D. Inhibition on human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. **Journal Lipid Research**, v. 42, p. 235-240, 2001.

MACIEL EN, BOLZAN RC, BRAGA AL, ROCHA JBT. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect delta-aminolevulinatase from liver, kidney and brain of mice. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology** v.14, p.310–319. 2000.

MALUF, S. E. C. et al. Hypervalent organotellurium compounds as inhibitors of P. falciparum calcium dependent cysteine proteases. **Parasitology International**, v. 65, p. 21-22, 2015.

MEINERZ, D. F. et al. Differential genotoxicity of diphenyl diselenide (PhSe)₂ and diphenyl ditelluride (PhTe)₂. **Peerj**, v. 2, p.290-301. 2014.

MEOTTI, F. C.; BORGES, V. C.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T.; NOGUEIRA, C. W. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 9-16, 2003.

NOGUEIRA, C. W.; BORGES, V. C.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organochalcogens effects on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology**, v. 191, p. 169-178, 2003.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. The chemistry of organic selenium and tellurium compounds. PATAI'S Chemistry of functional groups **Brazilian Journal of Chemistry**, v.26, n. 8 e a p. 1533-1541, 2012.

OGRA, Y. Biology and toxicology of tellurium explored by speciation analysis. *Rev. Metallomias*. **This journal is The Royal Society of Chemistry**, v.24, p. 146-151, 2017. Organochalcogens in Human Leucocytes: A Comparative Study between Ebselen, Diphenyl Diselenide, and Diphenyl Ditelluride. **BioMed Research International**. 537279. 2013

PERSIKE, D. S., CUNHA, R. L. O. R., JULIANO, L., SILVA, I. R., ROSIM, F. E., VIGNOLI, T., DONA, F., CAVALHEIRO, E. A. E FERNANDES, M. J. D. S. Protective effect of the organotelluroxetane RF-07 in pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurobiology of Disease**, v. 31, n. 1, p. 120-126, 2008.

PIMENTEL, I. A. S. et al. In Vitro and In Vivo Activity of an Organic Tellurium Compound on Leishmania (Leishmania) chagasi. **PLoS ONE**, n. 13, v. 7, p. 251-259 2012.

QUINES, C. B. et al. Phenylethynyl-butyltellurium inhibits the sulfhydryl enzyme Na⁺, K⁺-ATPase: An effect dependent on the tellurium atom. **Biological Trace Elements Research**, v.12 p. 421-427, 2013.

ROSA, R., HOCH, N., FURTADO, G., SAFFI, J. AND HENRIQUES, J. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 633, p.35-45. 2007.

SAILER B. L.; LILES N. S.; DICKERSON S.; SUMNERS S.; T CHASTEEN T.G. Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. **Toxicol In Vitro**. v.18, p. 475-482, 2004.

SAILER, B., LILES, N., DICKERSON, S. E CHASTEEN, T. Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. **Archives of Toxicology**, v. 77, p. 30-36, 2003.

SAVEGNAGO L, BORGES VC, ALVES D, JESSE C, ROCHA JBT, NOGUEIRA CW. Evaluation of antioxidant activity and potential toxicity of 1-uthyltelurenyl-2-methylthioheptene. **Life Sciences** v.79, p.1546–1552, 2006.

SREDNI B. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. **Seminars in Cancer Biology**. v. 22. p. 60– 69. 2012.

VIJ P. HARDEJ D. Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non-transformed human colon cells. **Environ Toxicol Pharmacol**. 34 ,768–782, 2012.

ZENI, G., CHIEFFI, A., CUNHA, R. L. O. R., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., STEFANI, H. A. E COMASSETO, J. V. Addition Reaction of p-Methoxyphenyltellurium Trichloride to 3-Hydroxy Alkynes. **Organometallics**, n. 4, p. 803-806, 1999.

ANEXO A - Carta de submissão para a revista Elsevier Editorial System for Toxicology *in vitro*.

Elsevier Editorial System(tm) for Toxicology
in Vitro

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Cytotoxic, mutagenic and antitumor evaluation of organotelluroxetane RF-07

Article Type: Research paper

Section/Category: Mechanisms

Keywords: Semi-metal; Toxicity; Genotoxicity; Antineoplastic agents;

Chromosomal alterations.

Corresponding Author: Dr. João Marcelo Castro Sousa,

Corresponding Author's Institution: Federal University of Piauí

First Author: Felipe Emmanuel A de Jesus

Order of Authors: Felipe Emmanuel A de Jesus; Octávio A de Carvalho Maia; Rosália M Tôrres de Lima; Ag-anne P Melo de Meneses; José V de Oliveira Santos; Antonielly C dos Reis; Audinei de S Moura; Adriana M Viana Nunes; Anderson N mendes; Débora C do Nascimento Rodrigues; José R de Oliveira Ferreira; Felipe P Mesquisa; Maria E Amaral de Moraes; Raquel C Montenegro; Felipe C Carneiro da Silva; Paulo M Pinheiro Ferreira; Ana Amélia C Melo Cavalcante; João Marcelo Castro Sousa

Abstract: Previous studies have shown that organic compounds based on tellurium have toxic effects and potential as antineoplastic agents. Thus, the current study evaluated the toxic, cytotoxic, mutagenic, antitumor and oxidative potential of organotelluroxetane RF07 in different bioassays, such as *Artemia salina*, *Allium cepa*, *Saccharomyces cerevisiae* and the viability with MTT and Alamar blue tests. The cell lines used were Sarcoma 180, HL-60, AGP01, SKMEL-28, and MRC5. The toxic effect of RF07 was demonstrated by the low LD50 in *A. salina*, as well as a significant decrease of root growth in *A. cepa*. The compound cytotoxicity was observed at the 03 concentrations assessed through the low mitotic indexes. RF07 provoked clastogenic/aneugenic mechanisms in implant cells by the induction of micronuclei, c-metaphases, bridges and chromosomal losses. The organotellurium in question has also presented antitumor effect by reducing the viability of the tumor cells analyzed in the tests of MTT and Alamar blue in micromolar concentrations. The toxicogenic effects presented may be related to the RF07 oxidative mechanisms observed in *S. cerevisiae*. In view of these results and the several RF07 applications, it is emphasized the importance of toxicological studies which will allow the use of RF-07 telurane in new therapies with more security and efficiency.

Suggested Reviewers: André S Kayat

Federal University of Pará

andreskh@gmail.com

Ukpai A Eze

Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Health Sciences,

Ebonyi State University, P. M. B. 053, Abakaliki, Nigeria

ukpai.eze@ebsu-edu.net

Raquel L Dias
Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul - PUCRS,
Brazil
Thirumulu Ponnuraj Kannan
School of Dental Sciences, Universiti Sains Malaysi
kannan@usm.my

Teresina-PI, February 09th, 2018

Dear Editor,

We are pleased to inquire the interest of Toxicology *in vitro* in publishing as original investigation our manuscript entitled " **Cytotoxic, mutagenic and antitumor evaluation of organotelluroxetane RF-07**". There are no more specific studies on the toxicity of RF07, as well as of the others hypervalent organic compounds, based on tellurium. Thus, toxicological studies are necessary for cytotoxic and genotoxic evaluations of these compounds, since they have interesting pharmacological activities for rational use in biology and medicine. Therefore, the current study evaluated the toxicogenic potential of RF-07 in *Artemia salina*, in *Allium cepa* and in *Saccharomyces cerevisiae* strains, in addition to evaluate the antiproliferative/antitumor activity of this compound against human tumor cells using the MTT and Alamar Blue assays.

Toxicology in Vitro publishes original research papers and reviews on the application and use of *in vitro* systems for assessing or predicting the **toxic effects** of chemicals and elucidating their mechanisms of action. These *in vitro* techniques include utilizing cell or tissue cultures, isolated cells, tissue slices, subcellular fractions, transgenic cell cultures, and cells from transgenic organisms, as well as *in silico* modelling. The Journal will focus on investigations that involve the development and validation of new *in vitro* methods, e.g. for prediction of toxic effects based on traditional and *in silico* modelling; on the use of methods in high-throughput **toxicology** and **pharmacology**; elucidation of mechanisms of toxic action; the application of **genomics, transcriptomics** and **proteomics** in toxicology, as well as on comparative studies that characterise the relationship between *in vitro* and *in vivo* findings. The Journal strongly encourages the submission of manuscripts that focus on the development of *in vitro* methods, their practical applications and regulatory use (e.g. in the areas of food components cosmetics, pharmaceuticals, pesticides, and industrial chemicals). *Toxicology in Vitro* discourages papers that record reporting on toxicological effects from materials, such as plant extracts or herbal medicines, that have not been chemically characterized.

All authors declared that they have no conflict of interest.

Sincerely,

Cover Letter

João Marcelo de Castro e Sousa, PhD
Researcher of the LAPGENIC Laboratory
Federal University of Piauí, Street Cicero Duarte, n. 950, CEP: 64607-670, Picos, Piauí,
Brazil. E-mail: j.marcelo@ufpi.edu.br

Phone and Fax number: 55 86 9 81006336

ANEXO B – Carta do Comitê de Ética

**GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

**DECLARAÇÃO CEUA-UESPI**

Declaro que, o pesquisador, **ANTONIO MARTINS MAIA FILHO**, deu entrada sob no protocolo o Nº0089/2017 do Projeto intitulado **AVALIAÇÃO CLÍNICA, TOXICOLÓGICA E PATOLÓGICA DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL TRATADA COM TELURANA RF09**.

O mesmo após a análise da Comissão teve o seguinte parecer:

APROVADO

Data do relatório final:31.12.18

Teresina, 05 de MAIO de 2017



Dr. Francisco Araújo
Sub-Coordenador CEUA/UESPI
Portaria Nº 1347 - 20/11/14
CRMV - 0415/17

