



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO (S) (3-FENILTELANIL
PROPANAMIDA) SUCCINATO DE DIMETILA, UM NOVO TELÚRIO
AMINOÁCIDO DERIVADO DO ÁCIDO ASPÁRTICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daiane Francine Meinerz

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO (S) (3-FENILTELANIL
PROPANAMIDA) SUCCINATO DE DIMETILA, UM NOVO TELÚRIO
AMINOÁCIDO DERIVADO DO ÁCIDO ASPÁRTICO**

por

Daiane Francine Meinerz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

Orientador: Prof Dr. Jeferson Luis Franco

Co-orientador: Prof Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Santa Maria, RS, Brasil

2011

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO (S) (3-FENILTELANIL PROPANAMIDA) SUCCINATO DE DIMETILA, UM NOVO TELÚRIO AMINOÁCIDO DERIVADO DO ÁCIDO ASPÁRTICO

Elaborada por
Daiane Francine Meinerz

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Jeferson Luis Franco (UFSM)
Presidenté/Orientador



Prof. Dr^a Maria Beatriz Moretto (UFSM)



Prof. Dr^a Caroline Wagner (UNIPAMPA)

Santa Maria, 25 de março de 2011

*Aprendi que para crescer como
pessoa eu preciso me cercar de
gente mais inteligente do que eu.*

William Shakespeare

*Aos meus pais
À minha família e meus amigos
Ao Maurício
Pessoas especiais que foram meu porto seguro nesta etapa*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente, a uma força superior que não consigo explicar, mas sei que me guia e dá forças.

Aos meus pais, pelo exemplo, amor e dedicação. A vocês, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, e jamais mediram esforços para me ajudar. Não tenho palavras para agradecer-los. Apenas posso dizer: muito obrigada e que eu amo muito vocês. Também a minha “sis” querida que é minha conselheira de plantão, e que está sempre ao meu lado. Simplesmente a melhor irmã do mundo. Amo você!

A toda minha família que mesmo a distância está sempre torcendo por mim, obrigada!

Ao meu amorzinho, Maurício, que me faz tão bem e tão feliz. Obrigada amor, por ter entrado na minha vida, pelo seu amor, apoio, carinho, dedicação e compreensão. Também a sua família, pelo apoio e presença em minha vida.

Ao meu orientador, Jeferson, pela amizade, paciência, dedicação e pela oportunidade de aprendizado. Também pelo exemplo de determinação e por me apoiar no crescimento profissional. Obrigada por estar sempre disposto a me ajudar e pela dedicação ao meu trabalho.

Ao João, por me ensinar que dedicação e esforço valem à pena. Obrigada pelo acolhimento em seu laboratório desde a Iniciação Científica, e pelo auxílio e crescimento como pesquisadora. Admiro-te pela sabedoria, dedicação, esforço e competência.

A Danúbia, uma grande amiga que encontrei no laboratório e que levo para sempre. Sou muito grata pelos ensinamentos que não se encerram quando foi pra Florianópolis. Obrigada por estar sempre disposta a me ouvir e me ajudar. Você mora no meu coração!

Aos colegas e amigos do “Chernobyl” Douglas e Josi, que estão sempre juntos comigo, nas grandes empreitadas de pesquisa.

Agradeço também a Bruna, que me ajudou muito nesta etapa do mestrado, pelos dias dedicados a matanças intermináveis e experimentos, encontrei em você uma grande amizade, parceria para todas as horas.

Gostaria de agradecer a todos os colegas de laboratório: Carol, Jéssie, Alessandro, Sílvio, Alessandra, Fernanda, Claudinha, Cris Dalla Corte, Cris Mizdal, Daniel, Rodrigo, Rogério, Romaiana, André, Fran, Jean Paul, Pablo, Diones, Mariane, Emily, Cléia, pelo companheirismo, ajuda e descontração.

Ao pessoal dos laboratórios da Prof^a Cristina, do Prof^o Gilson e do Prof^o Felix, e ao pessoal da química, sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários Márcia e Rinaldo pela dedicação e competência com que realizam os seus trabalhos.

A professora Maria Beatriz e à professora Caroline por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação. À Nilda também, meu muito obrigada.

Ao CNPq e a CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Ao Biotério Central pelo fornecimento dos animais de laboratório.

Aos animais utilizados neste trabalho, todo o meu respeito.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao PPGBTOX pela possibilidade de realização deste curso.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO (S) (3-FENILTELANIL PROPANAMIDA) SUCCINATO DE DIMETILA, UM NOVO TELÚRIO AMINOÁCIDO DERIVADO DO ÁCIDO ASPÁRTICO

AUTORA: DAIANE FRANCINE MEINERZ
ORIENTADOR: JEFERSON LUIS FRANCO
CO-ORIENTADOR: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de março de 2011

Estudos recentes de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o composto (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila, um telúrio aminoácido apresentou atividade mimética da enzima Glutathione Peroxidase (GPx), indicando potencial antioxidante. Contudo, a toxicidade e a farmacologia deste composto não são conhecidas. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar as potenciais propriedades toxicológicas deste composto em modelos *in vitro* e *in vivo*. Nas análises *in vitro* foram utilizados testes bioquímicos como: atividade mimética a GPx, atividade tiol oxidase e determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Além disso, as análises *in vivo* foram realizadas com a utilização de camundongos machos adultos, tratados e submetidos a testes comportamentais (exploração e locomoção). Para os estudos *ex vivo* foram dosados a atividade de enzimas antioxidantes, e testes para avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do composto. Com o intuito de verificar potenciais mecanismos de ação do composto, foram utilizados inibidores das enzimas Glutathione Redutase (GR) e Tiorredoxina Redutase (TrxR). Os resultados demonstraram que o composto apresentou importante atividade antioxidante *in vitro*. No entanto, quando testado *in vivo* em dose maiores, o mesmo demonstrou-se potente agente genotóxico e mutagênico nas doses de 175 e 195 $\mu\text{mol/Kg}$. Por outro lado, quando testado em doses menores ($1/2 \text{ DL}_{50}$) o composto não demonstrou significativos sinais de toxicidade. Quanto ao tratamento com os inibidores das enzimas GR e TrxR, os

resultados demonstraram que a inibição destas enzimas não afeta a ação do composto.

Palavras-chave: (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila, antioxidante, toxicidade, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduate Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

Evaluation of the biological effects of (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate, a new telluroamino acid derivative of aspartic acid

AUTHOR: Daiane Francine Meinerz
ADVISOR: Jeferson Luis Franco
CO-ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha
Place and Date of the Defense: Santa Maria, 25th march, 2011.

Recent studies from our group demonstrated that the (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate compound, a telluroamino acid showed glutathione peroxidase (GPx)-like activity, attesting to its antioxidant potential. However, toxicology and pharmacology from this compound are unknown. Then, the present study aimed to investigate the potential toxicological properties of this compound *in vitro* and *in vivo*. For *in vitro* analysis were used biochemical tests as: GPx-like activity, tiol oxidase activity and TBARS determination. Furthermore, the *in vivo* analyses were carried out using swiss albino male adult mice treated and submitted to behavioral tests (exploration and locomotion). For *ex vivo* studies, the antioxidant enzyme activity, and tests to evaluate citotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of compound were carried out. In order to verify the potential mechanisms of action of the compound, we used the GR and TrxR enzymes inhibitors. The results indicated that the compound presented an important antioxidant activity *in vitro*. However, when the compound was tested *in vivo* with the highest concentrations, it was shown as a potent genotoxic and mutagenic agent at doses of 175 e 195 $\mu\text{mol/Kg}$. On the other hand, when the compound was tested at minor doses (1/2 LD₅₀), it did not demonstrate significant signs of toxicity. In relation to treatment with inhibitors of GR and TrxR enzymes, the results showed that the inhibition of these enzymes did not affect the compound action in our model of study.

Key words: (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate, antioxidant, toxicity, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estrutura do composto (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila	9
Figura 2. Dano oxidativo em macromoléculas biológicas	12
Figura 3. Etapas do processo de peroxidação lipídica	14
Figura 4. Esquema de detoxificação de ROS realizada por enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT e GPx	15

PARTE I- ARTIGO

Figura 1. Structure of (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate	22
Figura 2. Antioxidant activity of (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) prop-anamido) succinate against basal or 10 μ M Fe(II)-induced TBARS formation in rat brain S1...	23
Figura 3. GPx-like activity of (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propa-namido) succinate.....	24
Figura 4. Effect of (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate on Low-Molecular Weight Thiol Groups Oxidation	24
Figura 5. Lethality dose–response curve in mice treated with (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate (s.c.).	24

PARTE II - RESULTADOS COMPLEMENTARES

Figura 1. Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) no ganho de peso corporal de camundongos adultos.....	36
Figura 2. Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) no comportamento exploratório e locomoção (campo aberto) de camundongos adultos	37
Figura 3. Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) na atividade da enzima antioxidante catalase	38

Figura 4. Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) na atividade da enzima antioxidante Glutaciona Peroxidase	39
Figura 5. Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) na atividade da enzima antioxidante Glutaciona Redutase	40
Figura 6. Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) na atividade da enzima antioxidante Tiorredoxina Redutase	41
Figura 7. Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) na viabilidade celular de leucócitos de camundongos adultos.	42
Figura 8. Efeito dos inibidores BCNU e CDNB na viabilidade mitocondrial (Teste MTT) de sinaptossomas de camundongos tratados com (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila. (TeAsp)	43

LISTA DE TABELAS

PARTE I- ARTIGO

Tabela 1. Effects of (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate. Treatment for 21 days on Micronuclei Frequency in Whole Blood Cells from Mice. .25

Tabela 2. Distribution of damage levels in leukocytes from mice exposed to (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate25

PARTE II – RESULTADOS COMPLEMENTARES

Tabela 1. Dano no DNA expesso como índice de dano em leucócitos de camundongos tratados com (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila42

LISTA DE ESQUEMAS

INTRODUÇÃO

Esquema 1 . Mecanismo proposto da reação tiol peroxidase de diteluretos2

DISCUSSÃO

Esquema 1 . Mecanismo da atividade tipo GPx de teluretos45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ER	Espécies reativas
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSSG	Glutaciona oxidada
H	Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hg	Mercúrio
MDA	Malondialdeído
NAC	N-acetilcisteína
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peróxinitrito
PL	Peroxidação lipídica
RL	Radical Livre
ROOH	Hidroperóxido Lipídico
S	Enxofre
Se	Selênio
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Te	Telúrio
(PhTe) ₂	Ditelureto de difenila
TFK	Tampão Fosfato de Potássio
TrxR	Tiorredoxina redutase
δ ALA-D	δ-aminoluvulinato desidratase

SUMÁRIO

<i>Agradecimentos</i>	<i>vi</i>
<i>Resumo</i>	<i>viii</i>
<i>Abstract</i>	<i>x</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>xi</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>xiii</i>
<i>Lista de Esquemas</i>	<i>xiv</i>
<i>Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos</i>	<i>xv</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	4
3. OBJETIVOS	5
3.1. <i>Objetivo geral</i>	5
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4.1. <i>Telúrio</i>	6
4.3. <i>Propriedades farmacológicas de compostos orgânicos de telúrio</i>	8
4.4. <i>Propriedades toxicológicas de compostos orgânicos de telúrio</i>	10
4.5. <i>Espécies reativas de oxigênio e Estresse oxidativo</i>	12
4.6. <i>Peroxidação lipídica</i>	13
4.7. <i>Defesas antioxidantes</i>	14
4.7.1 <i>Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo</i>	16
5. RESULTADOS	18
5.1. Parte I: <i>Artigo Científico : Avaliação dos efeitos biológicos do (s) (3 feniltelanil propanamida) succinato de dimetila, um novo telúrio aminoácido derivado do ácido aspártico</i>	20
5.2. Parte II : <i>Resultados complementares</i>	29
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	49
8. PERSPECTIVAS	51
9. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

Da família dos calcogênios, assim como o enxofre (S) e o selênio (Se), o Telúrio (Te) foi descoberto em 1782. Entretanto, a inclusão desse átomo em moléculas orgânicas ocorreu apenas no início do século XIX.

O Te pode apresentar-se com diferentes números de oxidação: Te^{+6} (telurato), Te^{+4} (telurito), Te^0 (telúrio elementar) e Te^{-2} (telureto) (Scansetti, 1992). No entanto, é encontrado com maior frequência na forma de teluretos de ouro, bismuto, chumbo e prata (Zeni e cols., 2003).

Industrialmente o Te^0 é utilizado no manufaturamento de semicondutores e outros componentes eletrônicos, como microchips e discos de DVD regraváveis (Green e cols., 2007). Ele também é utilizado na produção industrial de vidro e aço, e como um aditivo anti-detonante da gasolina (Fairhill, 1969). Além disso, é empregado no processo de síntese de alguns fármacos e explosivos, na vulcanização da borracha, em lubrificantes sólidos e na petroquímica (Taylor, 1996). O Te inorgânico é encontrado em soluções oxidantes que servem para polir metais (Yarema e Curry, 2005). E ainda, o Te vem sendo utilizado como intermediário na síntese orgânica (Petraghani, 1995)

O aumento do uso industrial de produtos químicos como o Te^0 , resulta em riscos ocupacionais e ambientais para a saúde humana, e cresce a preocupação em relação aos potenciais efeitos adversos desses compostos. Os primeiros relatos a respeito da toxicidade do Te aconteceram após o acidente de Windscale (UK), quando um reator pegou fogo e liberou grande quantidade de material radioativo, incluindo Te^{132} (Stewart e Crooks, 1958; Wakeford, 2007).

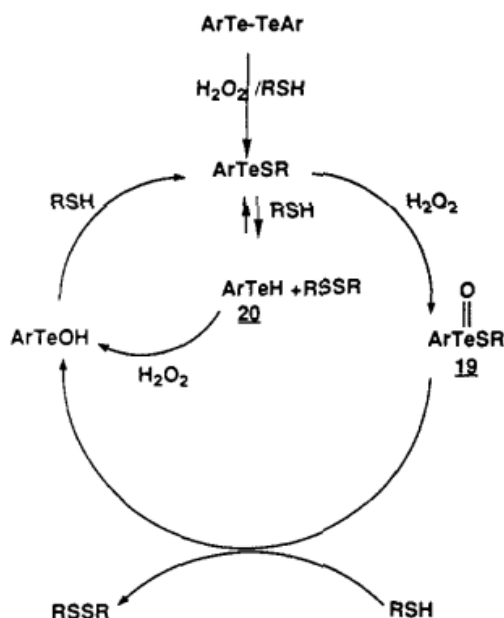
O Te pode ser prontamente absorvido pelo organismo através da dieta, principalmente na forma de compostos orgânicos. Entretanto, a exposição e a absorção de Te inorgânico na forma de teluritos e teluratos também ocorre (Larner, 1995). Casos de intoxicação ocupacional aguda por Te são raros, entretanto, quando ocorrem, os sintomas são: dores de cabeça, sonolência, náuseas, alteração da frequência cardíaca, bem como odor característico de alho, na respiração e na urina (Müller e cols., 1989; Taylor, 1996).

Os efeitos tóxicos do Te podem estar relacionados ao seu estado de oxidação, dose administrada e tipo de animal testado (Nogueira e cols., 2004; Van Vleet e cols., 1982). O mecanismo proposto para explicar essa toxicidade envolve a

interação com resíduos tiólicos (-SH) de moléculas biologicamente ativas. Os compostos orgânicos de Te têm a capacidade de oxidar os grupamentos-SH, inativando enzimas e/ou diminuindo a concentração de moléculas sulfidrílicas não-protéicas (Blais e cols., 1972; Young e cols., 1981). Ainda, essa toxicidade pode também estar relacionada à habilidade dos compostos de Te induzirem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Chen e cols., 2001).

Apesar das propriedades tóxicas atribuídas aos compostos de Te, existem relatos na literatura atribuindo importantes propriedades farmacológicas aos compostos orgânicos de Te tais como, quimioprotetora, antitumoral, antiviral (Engman e cols., 2000, 2003 a; Cunha e cols., 2005; Nyska e cols., 1989) e a capacidade de mimetizar a atividade da glutathiona-peroxidase (GPx) que, às custas de glutathiona (GSH), neutraliza o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Em 1992, Engman e colaboradores demonstraram, utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear, que vários diaril diteluretos possuem atividade tiol peroxidase superior aos compostos análogos contendo Se, propondo um mecanismo de reação geral para estes compostos (Esquema 1-Engman e cols., 1992).



Esquema 1 – Mecanismo proposto da reação tiol peroxidase de diteluretos (Engman e cols., 1992)

Posteriormente em 1993, Andersson e colaboradores reportaram a atividade mimética da GPx de diaril teluretos substituídos com moléculas doadoras de

elétrons. Além disso, estes autores apontaram que o efeito antioxidante destes compostos se devia à formação de teluróxido, resultante da oxidação do Te⁺² à Te⁺⁴, que seria novamente reduzido ao estado inicial pela GSH, num mecanismo catalítico, neutralizando radicais livres e as espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (Andersson e cols., 1993).

De particular importância, compostos orgânicos de Te têm sido reportados como excelentes antioxidantes em vários modelos de estresse oxidativo (Briviba e cols., 1998; Engman e cols., 1995; Jacob e cols., 2000; Ávila e cols., 2006, 2007, 2008, 2010).

Recentemente, observou-se que uma série de novos compostos de Te derivados de aminoácidos demonstraram atividade mimética a GPx (Braga e cols., 2009; Alberto e cols., 2009) atestando para um potencial antioxidante dos mesmos. Em adição, o composto que será utilizado neste estudo, (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila, foi o que apresentou melhor atividade mimética a GPx *in vitro* dentre os vinte novos derivados de aminoácidos testados (Braga e cols., 2009).

No entanto, estudos adicionais precisam ser realizados para verificar sua atividade farmacológica/toxicológica *in vitro* e *in vivo*.

Adicionalmente, considerando-se que o mecanismo pelo qual o (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila pode induzir toxicidade não se encontra elucidado, há a necessidade de novos estudos experimentais que investiguem os mecanismos de toxicidade deste composto, bem como seus efeitos genotóxicos que resultam em danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA).

2. JUSTIFICATIVA

Sabendo-se que a toxicidade dos compostos orgânicos de Te está relacionada principalmente a exposição ocupacional, e que estes compostos são amplamente utilizados em síntese orgânica em laboratórios ao redor do globo, torna-se importante compreender os potenciais mecanismos de toxicidade do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila utilizando diferentes modelos animais. Além disso, a literatura específica da área demonstra que muitos compostos orgânicos Te sintéticos apresentam-se como potentes antioxidantes, sugerindo a utilização destes compostos como agentes terapêuticos. Desta forma, é relevante conhecer a toxicologia destes compostos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

A fim de obter mais informações sobre o potencial toxicológico, bem como de outras atividades biológicas desta classe de compostos orgânicos de Te, o presente estudo objetivou investigar os efeitos biológicos do composto (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila, Te aminoácido derivado do ácido aspártico, em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

3.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar os efeitos do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila sobre a peroxidação lipídica cerebral, atividade mimética a GPx e tiol oxidase em modelos experimentais *in vitro*;
2. Avaliar, *in vivo*, os efeitos da administração subaguda pela via subcutânea (s.c.) do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila sobre o índice de mortalidade e peso corporal de camundongos;
3. Observar sinais de toxicidade induzidos pelo (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila em modelo experimental com camundongo durante o período de exposição ao composto;
4. Avaliar o efeito da exposição ao (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila sobre parâmetros de “estresse oxidativo” e alterações comportamentais em modelo experimental de camundongos e o possível bloqueio destes efeitos pela pré-exposição desses animais a *N*-acetilcisteína (NAC);
5. Investigar o possível efeito genotóxico e mutagênico do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila em amostras sanguíneas de camundongos;
6. Verificar o efeito de inibidores das enzimas antioxidantes TrxR e GR em sinapssomas isolados de camundongos tratados com o (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Telúrio

O Telúrio (Te) pertence ao grupo 16 da tabela periódica, conhecido como grupo dos calcogênios. Foi descoberto em 1782, isolado pela primeira vez em 1798. Entretanto, a inclusão deste átomo em moléculas orgânicas ocorreu somente no início do século XIX. Além disso, o Te pode apresentar-se com diferentes números de oxidação: Te^{+6} (telurato), Te^{+4} (telurito), Te^0 (telúrio elementar) e Te^{-2} (telureto) (Scansetti, 1992).

Os compostos de Te são importantes na produção industrial de vidro e aço, bem como um aditivo anti-detonante na gasolina (Fairhill, 1969). Adicionalmente, são utilizados na produção de explosivos, na vulcanização da borracha, em lubrificantes sólidos, soluções oxidantes para polir metais e na indústria petroquímica (Fairhill, 1969; Taylor 1996). Também o Te tem ação bactericida, fungicida e inseticida (Kormutakova e cols., 2000; Toptchieva e cols., 2003; Castro e cols., 2009).

Recentemente, esse semi-metal vem sendo muito empregado na manufatura de semicondutores particulados, sistemas de energia fotovoltaica e outros componentes eletrônicos, como microchips e discos de DVD regraváveis (Green e cols., 2007; Zhang & Swihart, 2007; Wang e cols., 2008). Possui também uma grande aplicação na indústria farmacêutica, sendo importante na síntese de fármacos (Friedman e cols., 2009).

Contudo, esse aumento no uso industrial do Te, tanto das suas formas orgânicas quanto inorgânicas, trouxe riscos ocupacionais e ambientais para a saúde humana (Meotti e cols., 2003; Borges e cols., 2007).

O Te metálico também está presente na composição de organismos vegetais, particularmente em membros da Família Alliaceae, em que o representante mais popular é o alho (Larner, 1995). Alguns estudos já demonstraram que pequenas quantidades de Te foram identificadas em fluidos corporais de camundongos, tais como sangue e urina (Siddik & Newman, 1988; Newman e cols., 1989).

Em 1967, Shoereder e colaboradores determinaram, utilizando espectrometria de absorção atômica, que os organismos humanos possuíam aproximadamente 600mg de Te, uma quantidade relativamente grande em comparação com outros

elementos traço como o ferro e o zinco. Apesar desta grande quantidade, nenhuma função fisiológica foi ainda atribuída ao telúrio para humanos bem como para outros mamíferos (Taylor, 1996; Rezanka & Sigler, 2008).

Os efeitos do Te sobre o organismo animal começaram a ser estudados por Gmelin em 1824. Entretanto, os primeiros relatos a respeito da toxicidade do Te aconteceram somente após o incidente na cidade de Windscale, atual Sellafield, na Inglaterra (Wakeford, 2007; Bergan e cols., 2008). Casos de intoxicação ocupacional aguda por Te são raros; entretanto, quando ocorrem, os sintomas são: dores de cabeça, sonolência, náuseas, alteração da frequência cardíaca, bem como odor característico de alho, na respiração e na urina (Blackadder & Manderson, 1975; Yarema & Curry, 2005).

Compostos de Te inorgânico são compostos altamente tóxicos, podem afetar a pele e outros órgãos, entre os quais os rins (Taylor, 1996). Também são potentes agentes neurotóxicos e, por serem permeáveis à barreira placentária, teratogênicos em ratos (Agnew, 1972). Causam hidrocefalia, hipomielinização ou desmielinização (D'gregório & Miler, 1988; Taylor, 1996; Toews e cols., 1991).

Além disso, os compostos de Te atravessam as membranas celulares e se localizam no citoplasma das células, mais especificamente nas mitocôndrias, nos primeiros estágios de intoxicação (Mizuno, 1969; Siliprandi & Storey, 1973). A ingestão de determinadas quantidades de telúrio por mamíferos adultos e pássaros faz com que apareçam grânulos negros ou cristais em forma de agulha no citoplasma das células do sistema urogenital, do trato gastrointestinal, dos órgãos respiratórios, do sistema retículo endotelial e do sistema nervoso (Morgan e cols., 1997). O metabolismo do Te nos tecidos não está esclarecido, mas é sugerido que os depósitos negros ou os cristais puntiformes contêm Te reduzido ou elementar (Duckett, 1972).

O primeiro composto orgânico de Te foi sintetizado por Friedrich Wöhler em 1840. Desde sua descoberta até metade do século XX, a química dos compostos organotelurados desenvolveu-se rapidamente. Nos dias atuais, esses compostos constituem novos interesses farmacológicos. Várias destas substâncias, com diferentes características e estruturas químicas, vêm sendo estudadas quanto às suas propriedades fármaco e toxicológicas (Nogueira e cols., 2004; Rezanka & Sigler, 2008). No Brasil, a química do Te foi introduzida pelo professor Nicola Petragnani, o qual se dedica ao estudo de compostos orgânicos contendo Te e

sua aplicabilidade como intermediários em síntese orgânica (Petragani, 1995; Comasseto e cols., 1997).

4.2. Propriedades farmacológicas de compostos orgânicos de Telúrio

Em 1987, Sredni e colaboradores descreveram pela primeira vez uma atividade farmacológica para um composto orgânico de Te, ao demonstrarem as propriedades imunomoduladoras do composto codificado como AS-101 (telurato de tricloro amônio-dioxoetileno-O,O') em camundongos, mediando efeitos imunomoduladores e antitumorais (Sredni e cols., 1987).

Também Cunha e colaboradores em 2005, demonstraram a importante atividade antitumoral e efeito quimioprotetor de compostos orgânicos de Te que podem estar relacionados à sua propriedade citotóxica e a habilidade de inibir importantes enzimas necessárias para o crescimento tumoral (Cunha e cols., 2005)

Apesar da habilidade dos compostos de induzirem apoptose e alterações de outras naturezas a fim de causarem morte celular, um novo alvo para a pesquisa anticâncer vem surgindo através da enzima TrxR. Esta enzima tem sua expressão gênica aumentada nas células tumorais, auxiliando no crescimento celular (Grogan e cols., 2000). Engman e colaboradores sintetizaram uma série de compostos análogos do telureto de difenila e observaram que alguns eram bons inibidores da tioredoxina redutase e inibidores do crescimento de células cancerosas. Compostos orgânicos de Te na forma de sais, solúveis em água, também foram avaliados, e mostraram-se os melhores inibidores da TrxR já testados (Engman e cols., 2003a).

Adicionalmente, os compostos de Te foram amplamente utilizados terapêuticamente em drogas que atuam no sistema imunológico, no tratamento da sífilis e da tuberculose (Kovalev, 1969).

O interesse no estudo de estresse oxidativo e a busca de moléculas com atividade antioxidante mais potentes que os agentes nucleofílicos clássicos também se voltou aos compostos orgânicos contendo Te em fins da década de 1990.

A potência dos efeitos antioxidantes foi estudada em 1998, com compostos do tipo diteluretos de diarila em sistemas celulares *in vitro* em níveis crescentes de complexidade. Sendo que diferentes teluretos testados reduziram a formação de

espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e protegeram o tecido renal contra o dano oxidativo induzido por reoxigenação após anoxia, indicando um potencial antioxidante interessante, envolvendo no seus efeitos citoprotetivos. (Wieslander e cols., 1998). O mecanismo sugerido poderia estar ligado, ao menos em parte, a uma atividade mimética de GPx (Wieslander e cols., 1998). Neste contexto, há um grande interesse na produção de compostos organotelurados com propriedades de mimetizar esta importante enzima antioxidante visando uma potencial aplicação farmacológica (Ren e cols., 2002; Dong e cols., 2004; Back e cols., 2005).

De acordo, o composto orgânico de Te ditelureto de difenila (PhTe)₂, exibe atividade tiol peroxidase, decompondo H₂O₂ e uma variedade de outros hidroperóxidos lipídicos em água ou seus alcoóis equivalentes, utilizando GSH ou outros tióis sintéticos reduzidos como doadores de elétrons (Engman e cols., 1992; Kanda e cols., 1999; Klotz e cols., 2003; Nogueira e cols., 2004). Além disso, estes autores apontaram que o efeito antioxidante destes compostos se devia à formação de teluróxido, resultante da oxidação do Te+2 à Te+4, que seria novamente reduzido ao estado inicial pela GSH, num mecanismo catalítico, neutralizando radicais livres e as espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (Engman e cols., 1994; Andersson e cols., 1994).

Adicionalmente, o composto estudado neste trabalho, o (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (Figura 1) apresentou melhor atividade mimética a GPx entre 20 outros compostos de Te derivados de aminoácidos (Braga e cols., 2009).

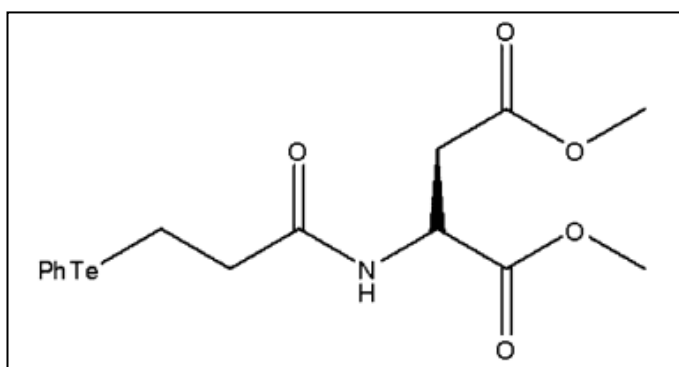


Figura 1. Estrutura do composto (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila

4.3. Propriedades toxicológicas de compostos orgânicos de telúrio

Assim como o Te elementar e os sais inorgânicos, os compostos orgânicos de Te são bastante tóxicos, e a intensidade desta toxicidade depende da estrutura do composto, da dose administrada e do tipo de animal testado (Nogueira e cols., 2004).

Embora exista um crescente uso de compostos orgânicos contendo Te nos campos da química e bioquímica, não existem muitos relatos sobre a toxicidade dessas substâncias até o momento. No entanto, da mesma forma que na toxicologia dos compostos organoselenados, as moléculas contendo Te são menos tóxicas do que os compostos iônicos desse metalóide (Nogueira e cols., 2004; Kanski e cols., 2001). Além disso, os compostos organotelurados são muito mais efetivos que seus correspondentes análogos de Se ou S (Rooseboom e cols., 2002).

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

Assim, a toxicidade destes compostos deve-se principalmente a interação com resíduos tiólicos (-SH) de moléculas biologicamente ativas. Os compostos orgânicos de Te têm a capacidade de oxidar estes grupamentos -SH, inativando uma enzima e/ou diminuindo a concentração de moléculas sulfidrílicas não-protéicas (Blais e cols., 1972; Deuticke e cols., 1992). De acordo, a oxidação da GSH em glutathiona oxidada (GSSG) pode ser um dos principais fatores da toxicidade causada pelos compostos orgânicos de Te (Barbosa e cols., 1998).

Alguns autores sugeriram que o PhTe_2 , um composto orgânico que contém Te, é neurotóxico para camundongos e ratos (Nogueira e cols.; 2002; Moretto e cols., 2003, Pinton e cols., 2010a), outro composto orgânico de Te como o 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-en-1-one também demonstrou ser neurotóxicos *in vivo*, quando administrados em ratos (Funchal e cols., 2010).

Além disso, o PhTe_2 também tem a capacidade de causar toxicidade renal e hepática em roedores, quando administrado em doses baixas (Meotti e cols., 2003; Borges e cols., 2007), além de toxicidade pulmonar (Pinton e cols., 2010b). Outros compostos orgânicos de Te como o 1-buthyltelurenyl-2-methylthioheptene também apresetaram hepatotoxicidade e toxicidade renal, no entanto em doses mais altas (Savegnago e cols., 2006).

Ainda, o ditelureto de difenila é capaz de reduzir a neurotransmissão glutamatérgica em plaquetas de humanos (Borges e cols., 2004) e de inibir a enzima δ -aminoluvulinato desidratase (δ -ALA-D) em eritrócitos humanos (Nogueira e cols., 2003c). Adicionalmente, esse composto pode causar desordens hematológicas quando utilizadas repetidas administrações (Borges e cols., 2007).

Stangherlin e colaboradores demonstraram em 2005, que o PhTe_2 pode ainda, ser teratogênico para fetos de ratos (Stangherlin e cols., 2005). Já em 2010, Degrandi e colaboradores demonstraram, que compostos orgânicos de Te como o PhTe_2 apresentam atividade genotóxica, mutagênica e citotóxica em cultura de células de fibroblastos de hamster chinês. (Degrandi e cols., 2010). Além disso, Santos e colaboradores demonstraram *in vitro* que compostos orgânicos de Te apresentam atividade hemolítica, citotóxica e genotóxica em células sanguíneas humanas (Santos e cols., 2009).

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

Estudos mais recentes têm constatado que a exposição a compostos orgânicos de Te induz efeitos tóxicos em plaquetas, leucócitos, eritrócitos e promielócitos (Sailer e cols., 2003; Borges e cols., 2004, 2007) de ratos. Da mesma forma, há evidências de que alguns teluretos de diarila são potentes agentes genotóxicos quando usados em doses altas ou de forma crônica (Tiano e cols., 2000).

4.4 Espécies reativas de oxigênio e Estresse Oxidativo

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas normais existe uma produção constante de espécies ERO, acompanhada pela sua contínua inativação através da ação de antioxidantes, de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas. As principais ERO vinculadas ao estresse oxidativo são o radical ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), o H_2O_2 , o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO^-) (Halliwell e Gutteridge, 1989). A extensão e o tipo de dano causado pelas ERO dependem da quantidade e da natureza dos mesmos, bem como das defesas antioxidantes celulares (Davies, 1991).

Assim, o estresse oxidativo pode resultar de uma situação em que ocorre uma diminuição nos níveis das defesas antioxidantes tanto enzimáticas quanto não enzimáticas do organismo, de uma elevada produção de espécies reativas (ER) ou de uma combinação de ambos os fatores. Esse quadro de estresse oxidativo pode causar danos a todas as estruturas celulares, incluindo DNA, lipídios e proteínas de membranas biológicas (Halliwell e Gutteridge, 1989; Dawson e Dawson, 1996) (Figura 2). Assim, a determinação dos níveis de ERO bem como das defesas antioxidantes celulares servem como medidas efetivas para a avaliação de estresse oxidativo e dano celular.

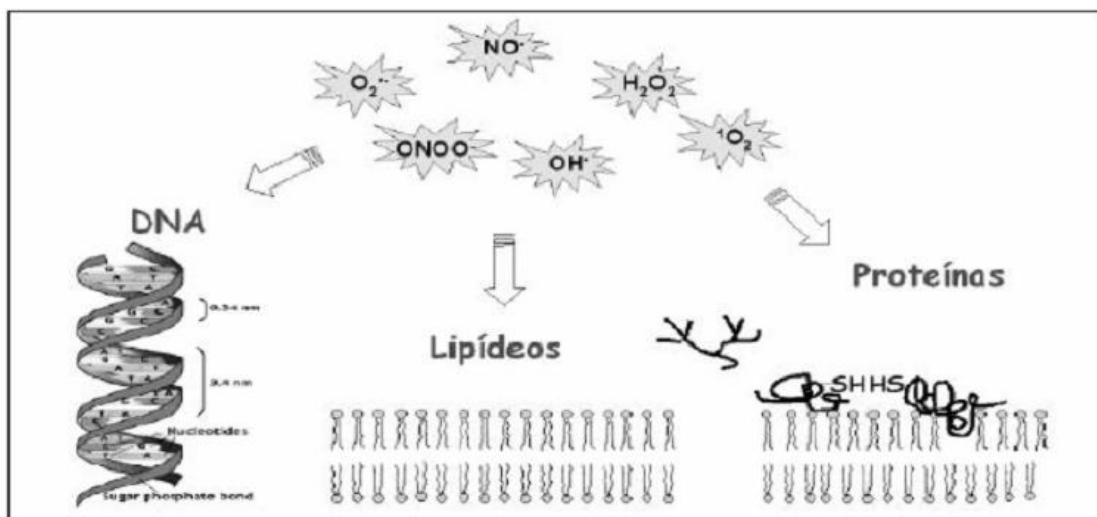


Figura 2. Dano oxidativo em macromoléculas biológicas.

(adaptado de Torres, 2003)

4.5 Peroxidação Lipídica

Os ácidos graxos poliinsaturados de fosfolípídeos em membranas biológicas são particularmente suscetíveis ao dano oxidativo causado pelas ER, num processo chamado de peroxidação lipídica (PL). Esta interação pode levar a modificação nos lípidios de membrana que conseqüentemente levará à perda nas características das membranas biológicas, criando fendas iônicas que alteram sua permeabilidade, o que favorece o trânsito indiscriminado de metabólitos e detritos celulares, provocando a lise celular (Josephy, 1997).

A PL é iniciada pelo ataque de uma espécie reativa (ER) que retira um átomo de hidrogênio (H) de um ácido graxo insaturado (RH), resultando na formação de um radical de fosfolípídeo (R.) (Slater, 1984; Janero, 1990; Halliwell, 1992; Holley e Cheeseman, 1993). Após, ocorre uma adição de oxigênio ao radical formado, originando um radical peroxil (ROO.), que por sua vez pode retirar um átomo de H de outra molécula vizinha, formando um hidroperóxido lipídico (ROOH) e outro radical (R'), o qual pode desencadear nova seqüência de reações, causando danos maiores (Slater, 1984; Halliwell, 1992).

O hidroperóxido formado pode ser quebrado e formar outros produtos como alcanos, aldeídos, entre os quais o malondialdeído (MDA), que são marcadores químicos da PL. Estudos que visam investigar o envolvimento da PL podem ser feitos utilizando uma técnica de determinação indireta das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, na qual um dos produtos finais da PL, o MDA, reage com o ácido tiobarbitúrico, originando um produto de cor rosa que pode ser quantificado espectrofotometricamente (Ohkawa, 1979).

Na segunda fase da PL, os ROOH primários são convertidos em produtos mais estáveis, porém esta quebra gera radicais alcoxil (RO \cdot), especialmente na presença de metais de transição como o Fe²⁺, favorecendo o processo de propagação. Os radicais alcoxil são análogos altamente reativos do radical hidroxil (OH \cdot), uma potente espécie reativa de oxigênio (Graf e cols., 1984; Janero, 1990; Namiki, 1990; Halliwell, 1992).

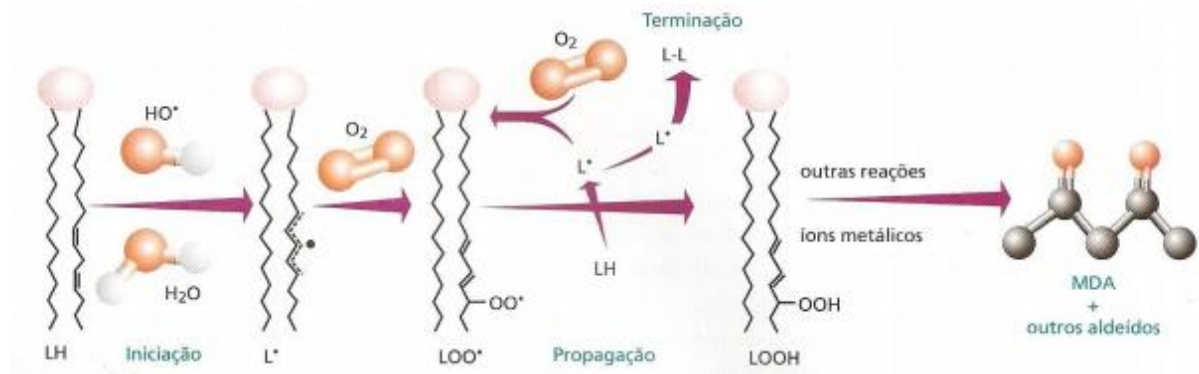


Figura 3: Etapas do processo de peroxidação lipídica

4.6 Defesas antioxidantes

Segundo Halliwell e Gutteridge (1990), antioxidante seria qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Esta definição compreende compostos de natureza enzimática e não enzimática. Assim, por diferentes mecanismos, as ERO são inativadas de forma a impedir reações oxidativas posteriores (Sies, 1993).

Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a GPx, que constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das ERO. Com isso, as células tentam manter baixas as quantidades do O_2^- e de H_2O_2 , evitando assim, a formação do OH (Boveris & Cadenas, 1997).

A SOD, presente na quase totalidade dos organismos eucarióticos, catalisa a dismutação do O_2^- em H_2O_2 (McCord & Fridovich, 1969). O H_2O_2 por sua vez é degradado pela ação da CAT ou GPx, resultando em água e oxigênio molecular (O_2) (Farber, 1990) (Fig. 3).

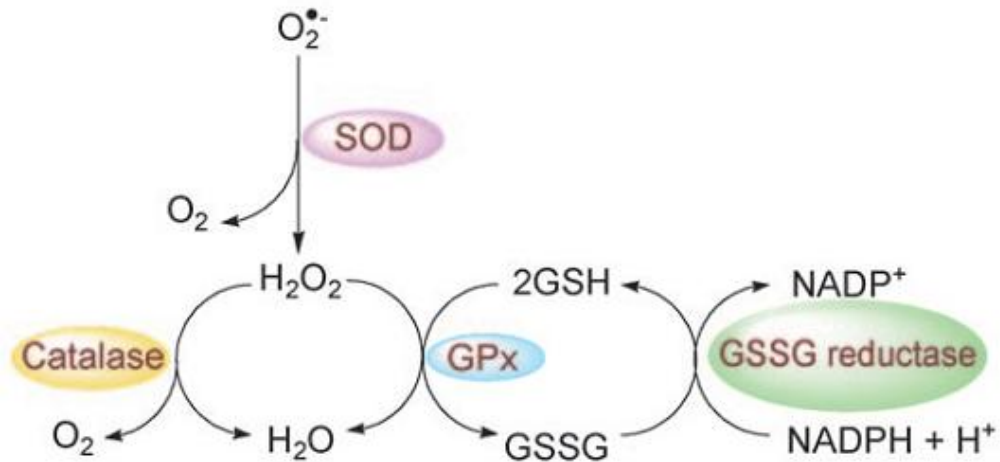


Figura 4: Esquema de detoxificação de ROS realizada por enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutaciona peroxidase.

Em adição, outra importante enzima responsável pela atividade antioxidante é o sistema da tioredoxina, que é composto pela enzima TrxR, tioredoxina (Trx) e NADPH. Este sistema desempenha importantes funções na regulação do metabolismo redox e de inúmeros processos celulares, tais como a síntese de DNA, proliferação celular e processos apoptóticos. Está ainda, largamente distribuído em diferentes tecidos e órgãos em mamíferos (Rozell e cols., 1985). Esta enzima possui em suas subunidades grupos tiólicos e um grupo selenol/selenolato, o que a torna alvo em potencial a agentes que possuem a capacidade de oxidar tióis ou selenóis.

Entre os antioxidantes não enzimáticos destaca-se o tripeptídeo glutaciona (γ -glutamilcisteinilglicina; GSH) o qual é o tiol não-protéico mais abundante encontrado nas células. Foi descoberto em 1921 por Hopkins e possui um importante papel na proteção das células contra radicais livres, peróxidos, entre outros. Este tiol é sintetizado a partir da ação consecutiva de duas enzimas: γ -glutamilcisteinase e glutaciona-sintetase (Meister, 1976). Devido à nucleofilicidade do grupo sulfidrílico da GSH, este pode funcionar como um ótimo nucleófilo removendo muitos eletrófilos reativos evitando eventos oxidativos e protegendo grupamentos tióis de proteínas intracelulares (Shigeoka e cols., 1987). Durante a detoxificação de ERO a GSH está envolvida em duas etapas de reações: (i) GSH reage não-enzimaticamente com radicais livres (Saez e cols., 1990); (ii) GSH doa elétron para a redução de peróxidos na reação que envolve a enzima GPx (Chance e cols., 1979). Nas células a GSH é regenerada a partir da GSSG pela reação envolvendo a enzima GR.

Além do GSH destaca-se também como um antioxidante não enzimático, o ácido ascórbico (vitamina C), que tem se mostrado eficiente contra as ERO (Rose, 1987). O ácido ascórbico age protegendo biomembranas contra a peroxidação, e perpetuando desta forma, a atividade do α -tocoferol, um antioxidante não enzimático lipossolúvel. O ácido ascórbico é um dos antioxidantes mais importantes em tecidos de mamíferos (Banhegyi e cols., 1997), sendo eficiente na redução da toxicidade de vários xenobióticos (Chakraborty e cols., 1978; Chatterjee & Rudra Pal, 1975).

4.7 Ensaio cometa e Teste de Micronúcleos

O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese de célula única em gel, é amplamente empregado para avaliar dano ao DNA e reparação em células eucarióticas. A popularidade deste teste deve-se à sua sensibilidade, custo relativamente baixo e simplicidade (Tice & Strauss, 1995; Collins, 2004; Dusinska & Collins, 2008; Shaposhnikov e cols., 2008).

O princípio desse ensaio leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização no núcleo celular. Assim, esse teste é uma avaliação de genotoxicidade, o qual detecta danos primários ao DNA induzidos por uma série de substâncias químicas (Collins, 2004). Os danos detectados são principalmente quebras simples e duplas na fita de DNA, eventos de reparo por excisão incompletos, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas entre moléculas de DNA, entre DNA e proteínas e entre DNA e xenobióticos (Tice e cols., 2000; Olive & Banáth, 2006).

O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas por esse teste podem ser reparadas (Tice e cols., 2000; Collins e cols., 2008; Shaposhnikov e cols., 2008).

Assim, o teste tem importantes aplicações na verificação dos efeitos genotóxicos de compostos químicos, na monitorização ambiental, na contaminação com agentes genotóxicos, no biomonitoramento de intoxicações em humanos, na epidemiologia molecular e em pesquisas que visem avaliar dano e reparo do DNA.

Adicionalmente, as anormalidades na estrutura do cromossomo são uma consequência direta do dano em nível de DNA. A perda de cromossomos e os erros de segregação são eventos importantes na carcinogênese, causados

principalmente por defeitos na formação do fuso, centrômero e alterações na condensação da cromatina antes da metáfase (Fenech, 2000)

As quebras cromossômicas que não possuem centrômero não podem ligar-se às fibras cinetocóricas e conseqüentemente, não podem migrar para os pólos opostos da célula juntamente com os demais cromossomos durante a anáfase. Na telófase, tanto da mitose quanto meiose, a membrana nuclear é refeita ao redor do conjunto de cromossomos. Os fragmentos acêntricos ou até mesmo um cromossomo inteiro que não estava ligado ao fuso mitótico são incapazes de integrarem-se aos novos núcleos. Em razão disso, esses fragmentos formam um pequeno núcleo individual, denominado micronúcleo, o qual é detectado em células interfásicas como um pequeno corpúsculo arredondado de cromatina, separado do núcleo principal (Fenech, 2000; 2006; 2007).

O teste de micronúcleos, portanto, detecta mutagênese cromossômica do tipo clastogênese, aneugênese, danos no fuso mitótico, aberrações numéricas e cromossômicas.

5. RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados em duas partes.

Os resultados da parte I estão apresentados sob a forma de um artigo científico intitulado “Evaluation of the biological effects of (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate, a new telluroamino acid derivative of aspartic acid”. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto da mesma forma que foi publicado na Revista “Archives of toxicology”.

Os resultados da Parte II são complementares aos resultados do artigo científico e estão divididos em Materiais e Métodos e Resultados.

Parte I

5.1 Parte I: Artigo Científico

Avaliação dos efeitos biológicos do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila, um novo telúrio aminoácido derivado do ácido aspártico

**EVALUATION OF THE BIOLOGICAL EFFECTS OF (S)-DIMETHYL
2-(3-(PHENYLTELLANYL) PROPANAMIDO) SUCCINATE,
A NEW TELLUROAMINO ACID DERIVATIVE OF ASPARTIC ACID**

Daiane Francine Meinerz · Jéssie H. Sudati · Danúbia B. dos Santos · Andressa Frediani · Eduardo E. Alberto · Josiane Allebrandt Jeferson L. Franco · Nilda B. V. Barbosa · Michael Aschner · João Batista T. da Rocha

Arch Toxicol (2011) 85:43–49

Evaluation of the biological effects of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate, a new telluroamino acid derivative of aspartic acid

Daiane Francine Meinerz · Jéssie H. Sudati · Danúbia B. dos Santos · Andressa Frediani · Eduardo E. Alberto · Josiane Allebrandt · Jeferson L. Franco · Nilda B. V. Barbosa · Michael Aschner · João Batista T. da Rocha

Received: 27 November 2009 / Accepted: 4 May 2010 / Published online: 21 May 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate, a new telluroamino acid derivative, showed remarkable glutathione peroxidase (GPx)-like activity, attesting to its antioxidant potential. However, the stability and toxicity of this compound has not yet been investigated. The present study was designed to investigate the pharmacological/toxicological properties of this compound in vitro and in vivo. In vitro, this telluroamino acid derivative significantly blocked spontaneous and Fe(II)-induced TBARS formation in rat brain homogenates, demonstrating high antioxidant activity. In addition, it exhibited GPx-like and thiol oxidase activities. However, when subcutaneously administered to mice, (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate indicated genotoxic and mutagenic effect in adult male mice. Considering the differential effects of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate in vitro and in vivo, additional experiments are needed to elucidate the mechanism(s) by which this compound displays its antioxidant/toxicological effects.

Keywords Organotellurium derivative · Antioxidant · Genotoxicity · Mutagenicity

Introduction

Organochalcogen compounds possess interesting biological activities, such as glutathione peroxidase (GPx)-mimetic activity (Parnham and Sies 2000; Nogueira et al. 2004; Barbosa et al. 2008). It seems that utilization of the redox activity of the selenium (Se) and, in particular, the tellurium (Te) atoms inherent to these substances possess considerable antioxidant potency to mitigate the adverse effects of free radical generation (Andersson et al. 1993, 1994), a process inherent to plethora of diseases, including diabetes and neurodegenerative diseases (Francia et al. 2009; Migliorea and Coppedè 2009). Of particular importance, organotellurium compounds have been reported as excellent antioxidants in several models of oxidative stress (Briviba et al. 1998; Engman et al. 1995; Jacob et al. 2000; Ávila et al. 2006, 2007, 2008, 2010). However, in contrast to Se, Te is a non-essential element that can induce both acute and chronic toxicity in a variety of species (Nogueira et al. 2004). For example, tellurides cause cytotoxicity (Sailer et al. 2003, 2004; Iwase et al. 2004; Rooseboom et al. 2002), hepatotoxicity (Meotti et al. 2003), glutamatergic system alterations (Nogueira et al. 2004), teratogenic effects (Stangherlin et al. 2009), as well as hemolytic and genotoxic effects in human blood cells at relatively high concentrations (Schiari et al. 2007, 2009; Santos et al. 2009a, b). The toxic properties of organotellurides are likely due to their interaction with thiol groups of critical biomolecular sites (Nogueira et al. 2004), and the ability of the Te compounds to induce the formation of reactive oxygen species (ROS) (Chen et al. 2001).

D. F. Meinerz · J. H. Sudati · A. Frediani · E. E. Alberto · J. Allebrandt · J. L. Franco · N. B. V. Barbosa · J. B. T. da Rocha (✉)
Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, Prédio 18, Santa Maria CEP 97105-900, RS, Brazil
e-mail: jbtrocha@yahoo.com.br

D. B. dos Santos
Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis CEP 88040-900, SC, Brazil

M. Aschner
Department of Pediatrics, B-3307 Medical Center North, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN 37232-2495, USA

In contrast, we have recently observed that diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate exhibited in vitro antioxidant activities and no overt in vivo signs of toxicity even after repeated exposure to high doses of this compound (Ávila et al. 2006, 2007, 2008). Consequently, we hypothesized that the toxicological properties of organotellurides reflect their structure, particularly the type of Te–C bond and, most importantly, the presence or absence of a Te–Te bond.

Recently, we have observed that a series of modular new telluroamino acid derivatives had remarkable glutathione peroxidase (GPx)-like behavior (Braga et al. 2009; Alberto et al. 2009), attesting to their antioxidant potential. Thus, in order to better characterize the potential pharmacological and/or toxicological properties and other biological activities of this class of organic Te compounds, the present study investigated the effects of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate, because this compound was found to be the most potent mimetic of GPx from about 20 different newly synthesized derivatives (Braga et al. 2009; Alberto et al. 2009). We also evaluated its thiol oxidase activity in vitro, i.e., its ability to oxidize thiols in the absence of peroxides and its potential genotoxicity using the comet assay (Cemeli et al. 2009; Grotto et al. 2009; Zhang et al. 2008), and the cytogenic and mutagenic micronucleus test (Caria et al. 1995; Engelhardt 2006; Westphal et al. 2009) as endpoint of toxicity.

Materials and methods

Chemicals

The chemical structure of telluroamino acid derivative of aspartic acid compound is shown in Fig. 1: (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido)succinate. This tested compound was purified by column chromatography, and the purity of the product accessed by hydrogen and carbon NMR and gas chromatography (Braga et al. 2009). The compound was dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide) for use in both in vivo and in vitro assays. DMSO was obtained from Sigma (St. Louis, MO). Malonaldehyde bis-(dimethyl acetal) (MDA) was obtained from Sigma. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

Animals

Swiss adult male mice weighing 40–60 g and male Wistar rats (± 3 months old), weighing 270–320 g, from our own breeding colony (Animal House-holding, UFSM, Brazil) were used for the experiments. The animals were kept in separate animal cages on a 12 h light/12 h dark cycle in a room with controlled temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 3$) and with free

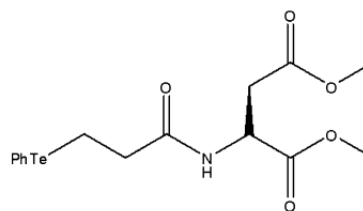


Fig. 1 Structure of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate

access to food and water. The animals were used in accordance to guidelines of the Committee on Care and use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria, Brazil (23081.002435/2007-16).

In vitro experiments

Preparation of brain homogenates (S1) and Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Brain (1 g) was homogenized in 10 ml of cold 10 mM Tris–HCl, pH 7.5. The homogenate was centrifuged for 10 min at $4,000\times g$ and the resulting supernatant (S1) was used for TBARS quantification (Ohkawa et al. 1979; Puntel et al. 2007).

Chemical determination of GPx-like activity and Thiol Oxidase activity

Catalytic GPx model reaction ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{PhSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{PhSSPh}$, at 30°C) was initiated by the addition of 5 mM H_2O_2 to a methanol solution containing 1.9 mM thiophenol (PhSH) either in the absence or presence of 50 μM (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate (Iwaoka and Tomoda 1994).

Thiol oxidase activity of 50 μM (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate was determined in a medium containing 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) and 1 mM glutathione or PhSH. An aliquot of 100 μL was removed at different time points (0, 30, 60 and 120 min) and added to a solution containing 0.5 mM DTNB and 10 mM Tris/HCl buffer (in the absence of thiol oxidation a maximum of 100 nmol of $-\text{SH}/\text{ml}$ can be found). Samples were read at 412 nm and the absorbance was compared with respective standard curves (using GSH or PhSH) (Ellman 1959).

In vivo experiments

Lethal dose–response

Swiss adult male mice were treated with a subcutaneous (s.c.) injection of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)

propanamido) succinate at 5 different doses (0.1–2.5 mmol/kg) or vehicle (DMSO, 2.5 ml/kg). In this study, we have used the subcutaneous route for 3 reasons: (1) the tested compound is lipophilic and the s.c. route is a proper route to delivery it; (2) the stability of organotellurium compounds is decreased in aqueous acidic solution and we could not predict whether the parent compound could be absorbed after oral administration; (3) previous studies have indicated that the s.c. route is less toxic than the i.p. route for other tellurium and selenium compounds (Meotti et al. 2003; Nogueira et al. 2004; Ávila et al. 2006). Animals were observed for up to 72 h after tellurium administration and its lethal dose (LD₅₀) was calculated by the method of Litchfield and Wilcoxon (1949).

In vivo exposure

Mice were divided in: (1) control group (treated with DMSO, 2.5 ml/kg, s.c., $n = 6$), (2) 175 $\mu\text{mol/kg}$ of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate group, $n = 9$, s.c., and (3) 195 $\mu\text{mol/kg}$ of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate group, $n = 12$, s.c. (doses were based on an previous LD₅₀ study—Fig. 5, where the mortality for these two doses were 32 and 47%, respectively). The animals were treated daily for 21 days with mortality reaching 33 and 50% for treatments with 175 and 195 $\mu\text{mol/kg}$ of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate, respectively. Te-treated mice did not present loss of weight (data not shown) and renal, hepatic and cerebral weight was not modified by tellurium compound (data not shown).

Sample preparation

After 21 days, the animals were anesthetized with ether, 2.5 ml blood samples were collected by heart puncture, and then, mice were euthanized by decapitation.

Micronucleus test

Two total blood smears from each animal were made on pre-cleaned microscope slides, air dried at room temperature and stained in 5% May-Grunwald-Giemsa in buffered water for 5 min. The criteria used for the identification of micronuclei (MN) were a smaller size than one-third of the main nucleus, no attachment to the main nucleus, and identical color and intensity as in the main nucleus. The MN frequency was calculated as: % MN = Number of cells containing micronucleus \times 100/Total number of cells counted. This percentage was derived from 2,000 cells counted. Micronuclei presence was determined by three investigators that were blind to the animal treatments.

Leukocytes isolation

The sample separations were conducted following the method of Santos et al. (2009a) and adjusted to 2×10^6 leukocytes/mL with HBSS/heparin.

Single cell gel electrophoresis: comet assay and analysis of DNA damage

The comet assay and analysis of DNA damage were carried out following the method of Santos et al. (2009a). The slides were analyzed under blind conditions by at least two individuals.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple range test when appropriate. The values were expressed as mean \pm SEM from 3 to 4 independent experiments performed in triplicate, and the results were considered statistically significant at $P < 0.05$. For the comet assay, statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney *U* test and the values were expressed by medium (Q1/Q3).

Results

In vitro

Thiobarbituric acid reactive substances measurement

Spontaneous and Fe(II)-induced TBARS formation in rat brain homogenates was significantly blocked by (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate ($P < 0.05$, Fig. 2).

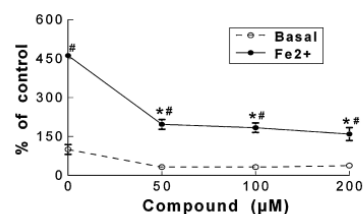


Fig. 2 Antioxidant activity of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate against basal or 10 μM Fe(II)-induced TBARS formation in rat brain S1. Values are expressed as mean \pm SEM from 3 to 4 independent experiments performed in triplicate. * Represent difference in relation to Fe(II)-induced TBARS when compared to those induced by Fe(II) and treated with (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate. # Represents significant difference between Fe(II)-induced TBARS formation and basal values

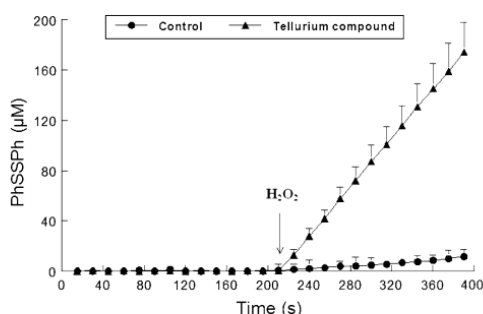


Fig. 3 GPx-like activity of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate. Values are the mean \pm SEM of four independent experiments performed in duplicate

GPx mimetic properties of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate

(*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate exhibited a GPx-like activity ($T_{50} = 19.78 \pm 4.31$ min, T_{50} corresponds to the time required to oxidize 50% of thio-phenol, Fig. 3) surpassing the potency of the positive control, PhSeSePh ($T_{50} = 51.38 \pm 2.83$ min, data not shown). In the absence of tellurium compound T_{50} was 301 ± 38.43 min.

Chemical Thiol Oxidase activity of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate

(*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate oxidized GSH and after 120 min the -SH content was lower than in control samples ($P < 0.05$; Fig. 4a). In contrast to GSH, PhSH oxidation was not accelerated by (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate (Fig. 4b).

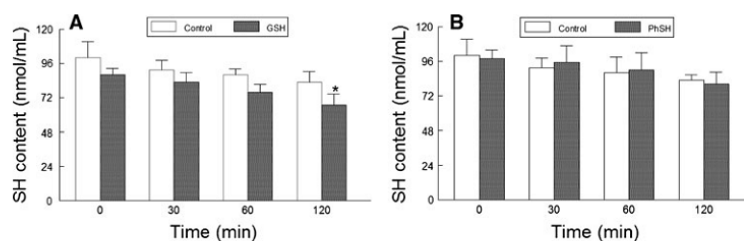


Fig. 4 Effect of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate on Low-Molecular Weight Thiol Groups Oxidation: **a** GSH (1 mM) and **b** PhSH (1 mM). Values are the mean \pm SEM of 4–5

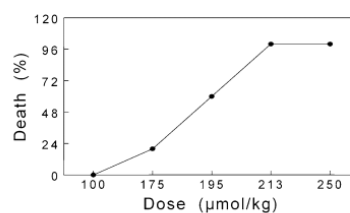


Fig. 5 Lethality dose–response curve in mice treated with (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate (s.c.). After a single injection, mice were observed up to 72 h. Data are reported as mean \pm SEM; $n = 4$ –5 mice per dose, except for 175 and 195 $\mu\text{mol/kg}$, where 9–10 mice were tested

In vivo

LD50 study

The calculated LD_{50} and the 95% confident interval for s.c. acute exposure to (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate were 185 $\mu\text{mol/kg}$ (0.175–0.195) (Fig. 5).

Micronucleus test

Exposure to (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate for 3 weeks caused a significant increase about 50% (175 $\mu\text{mol/kg}$) and 130% (195 $\mu\text{mol/kg}$) in the number of micronuclei in male mice, when compared to control value ($P < 0.01$; Table 1).

DNA damage in blood leukocytes

Exposure of mice to (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate for 21 days caused a significant increase in DNA damage index (DI) in leukocytes. The increase was dose-dependent (~ 1.7 times and ~ 3.9 times

independent experiments performed in duplicate or triplicate. * Represents significant difference between GSH at 120 min and its respective control at 0 min

higher in the 175 and 195 $\mu\text{mol/kg}$ groups, respectively, vs. the control group; Table 2). Notably, (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate caused a significant increase in the frequency of damage 3 and 4, when compared to the control group ($P < 0.05$; Table 2).

Discussion

Organotellurium compounds are effective antioxidant agents, with greater potency than their selenium and sulfur analogues (Wieslander et al. 1998; Engman et al. 1995, 2000; Kanski et al. 2001). However, few studies have investigated the in vivo antioxidant or toxic effects of organotellurides (Ávila et al. 2006, 2007, 2008; Pessoto et al. 2007). In agreement with its GPx-mimetic properties (Braga et al. 2009; Alberto et al. 2009), the present study demonstrated that (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate has potent in vitro antioxidant activity and effectively attenuated the pro-oxidant activity of Fe(II) in brain homogenates. In addition, (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate showed weak in vitro thiol oxidase activity, attesting to its low potential toxicity (i.e., this compound can oxidize thiol groups efficiently only in the presence of hydrogen peroxide). Thus, in this compound, Te (II) can react with H_2O_2 to form

the Te(IV) and H_2O . Sequentially, reaction of Te(IV) with one thiol equivalent generates tellurenyl sulfide, which can react with another thiol equivalent to restore Te (II) in the thiol-peroxidase-like catalytic cycle (Braga et al. 2009). In agreement with these observations, the antioxidant activity of diorganoyl tellurides has been attributed, at least in part, to their GPx-like activity (Engman et al. 1992; Andersson et al. 1993; Meotti et al. 2003; Nogueira et al. 2004).

Even though (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate presented promising in vitro antioxidant activity, organotellurium compounds have been demonstrated to be toxic to rodents after in vivo administration and in vitro models (Sailer et al. 2004; Schiar et al. 2007, 2009; Santos et al. 2009a, b). Here, we demonstrated that at doses near to its LD_{50} , (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate produced both genotoxic and mutagenic effects in adult male mice. The molecular mechanism(s) involved in (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate genotoxic activity is unknown; however, it can be related to the reactivity of tellurium and its propensity to be oxidized to Te(IV), which can potentially interact with different nucleophile centers in biomolecules. Recently, Rosa et al. have demonstrated that exposure to diphenyl diselenide caused DNA damage and GSH depletion in different tissues from mice (Rosa et al. 2007). The knowledge of the relative toxicity of Te and Se-containing organic compounds is of fundamental importance, because the use of organochalcogenides in organic synthesis, industrial applications and as possible components of a variety of pharmacological agents (Barbosa et al. 2008; Rosa et al. 2007; Ineu et al. 2008; Brito et al. 2009).

In conclusion, the results presented here indicate that (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate was mutagenic in adult male mice (as judged by the increase in the frequency of micronuclei) and produced significant genotoxic effects in mice leukocytes. These effects may be linked to the pro-oxidant activity exhibited by high concentrations/doses of organotellurium compounds. It is

Table 1 Effects of (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate

Treatment	MN	MN % (in 2,000 cells)
Control	3.01 \pm 0.4	0.150 \pm 0.020
175 $\mu\text{mol/kg}$	4.56 \pm 0.23*	0.228 \pm 0.011*
195 $\mu\text{mol/kg}$	6.91 \pm 0.53*	0.345 \pm 0.026*

Treatment for 21 days on Micronuclei Frequency in Whole Blood Cells from Mice. MN micronucleus, $n = 6$

* $P < 0.01$ by one-way ANOVA (followed by Duncan Multiple Range Test)

Table 2 Distribution of damage levels in leukocytes from mice exposed to (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl)propanamido) succinate

Concentration	Level of DNA damage ^a					DI ^b
	0	1	2	3	4	
Control	88.5(81/90)	7(6/13)	5(3/5)	0(0/0)	0(0/0)	16.5(14/25)
175 $\mu\text{mol/kg}$	80(75/82)	16(8/19)	5(5/7)	1(1/3)#	0(0/0)	31(31.5/37.5)*
195 $\mu\text{mol/kg}$	75(62/72)#	11(62/71)	8(8/12)	7(7/14)*	4(2/5)*	86(44/94)*

DNA damage is expressed as DNA damage index (DI) and DNA damage levels. The DNA damage was calculated from cells in different damage classes (completely undamaged: 100 cells \times 0 to maximum damaged – 100 cells \times 4). DNA damage levels are expressed as percentages of cells damaged compared to control and DI as arbitrary units (a.u.); $n = 6$

^a Percentage of cells, ^b A.U., Arbitrary units (a.u. = $n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4$)

* $P > 0.01$ as compared to control values (nonparametric Mann–Whitney U test)

$P < 0.05$ as compared to control values

noteworthy that (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate also had a remarkable thiol-peroxidase mimetic activity in vitro, which is considered a potential indicator of in vivo antioxidant activity. However, the present study design did not attempt to link the in vitro activity with the in vivo properties of this compound. Accordingly, additional studies will be needed to elucidate the mechanism(s) by which (*S*)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) mediates its in vivo toxic effects and, particularly, whether or not cellular thiol depletion occurs prior to the onset of the mutagenic and/or genotoxic effects of this telluroamino acid derivative.

Acknowledgments We are thankful for the financial support from CNPq, UFSM, FAPERGS, and CAPES.

Conflict of interest statement The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Alberto EE, Soares LC, Sudati JH, Borges AC, Rocha JBT, Braga AL (2009) Efficient synthesis of modular amino acid derivatives containing selenium with pronounced GPx like activity. *Eur J Org Chem* 25:4211–4214
- Andersson CM, Hallberg A, Brattsand R, Cotgreave IA, Engman L, Persson J (1993) Glutathione peroxidase-like activity of diaryl tellurides. *Bioorg Med Chem Lett* 3:2553–2558
- Andersson CM, Brattsand R, Hallberg A, Engman L, Persson J, Moldéus P, Cotgreave IA (1994) Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. *Free Radic Res* 20:401–410
- Ávila DS, Beque MC, Folmer V, Braga AL, Zeni G, Nogueira CW, Soares FAA, Rocha JBT (2006) Diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate: an organotellurium compound with low toxicity. *Toxicology* 224:100–107
- Ávila DS, Gubert P, Dalla Corte CL, Alves D, Nogueira CW, Rocha JBT, Soares FAA (2007) A biochemical and toxicological study with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate in a sub-chronic intraperitoneal treatment in mice. *Life Sci* 80:1865–1872
- Ávila DS, Gubert P, Palma A, Colle D, Alves D, Nogueira CW, Rocha JBT, Soares FAA (2008) An organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats. *Brain Res Bull* 76:114–123
- Ávila DS, Colle D, Gubert P, Palma AS, Puntel G, Manarin F, Noremberg S, Nascimento PC, Aschner M, Rocha JB, Soares FA (2010) A possible neuroprotective action of a vinylic telluride against Mn-induced neurotoxicity. *Toxicol Sci* (in press)
- Barbosa NBV, Nogueira CW, Guecheva TN, Bellinaso ML, Rocha JBT (2008) Diphenyl diselenide supplementation delays the development of *N*-nitroso-*N*-methylurea-induced mammary tumors. *Arch Toxicol* 82:655–663
- Braga AL, Alberto EE, Soares LC, Rocha JBT, Sudati JH, Roos DH (2009) Synthesis of telluroamino acid derivatives with remarkable GPx like activity. *Org Biomol Chem* 7:43–45
- Brito VB, Rocha JBT, Folmer V, Erthal F (2009) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice. *Acta Biochim Pol* 56:125–134
- Briviba K, Tamler R, Klotz LO, Engman L, Cotgreave IA, Sies H (1998) Protection against organotellurium compounds against peroxynitrite mediated oxidation and nitration reactions. *Biochem Pharmacol* 55:817–823
- Caria H, Chaveca T, Laires A, Rueff J (1995) Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res* 343:85–94
- Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D (2009) Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res Rev* 681:51–67
- Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X (2001) Cell apoptosis induced carcinogenic metals. *Mol Cell Biochem* 221:183–188
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77
- Engelhardt G (2006) In vivo micronucleus test in mice with 1-phenylethanol. *Arch Toxicol* 80:868–872
- Engman L, Stern D, Cotgreave I, Andersson CM (1992) Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a ¹H NMR method. *J Am Chem Soc* 114:9737–9743
- Engman L, Person J, Vessman K, Ekstrom M, Berglund M, Andersson CM (1995) Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. *Free Rad Biol Med* 19:441–452
- Engman L, Kandra T, Gallegos A, Williams R, Powis G (2000) Water-soluble organotellurium compounds inhibited thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. *Anticancer Drugs* 15:323–330
- Francia P, Cosentino F, Schiavoni M, Huang Y, Perna E, Camici GG, Lüscher TF, Volpe M (2009) p66Shc protein, oxidative stress, and cardiovascular complications of diabetes: the missing link. *J Mol Med* 87:885–891
- Grotto D, Barcelos GRM, Valentini J, Antunes LMG, Angeli JPF, Garcia SC, Fjr Barbosa (2009) Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. *Arch Toxicol* 83:249–254
- Ineu RP, Pereira ME, Aschner M, Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT (2008) Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: involvement of oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 46:3023–3029
- Iwaoka M, Tomoda T (1994) A model study on the effect of an amino group on the antioxidant activity of glutathione peroxidase. *J Am Chem Soc* 116:2557–2560
- Iwase K, Tatsuishi T, Nishimura Y, Yamaguchi J, Oyama Y, Miyoshi N, Wada M (2004) Cytometric analysis of adverse action of diphenyl ditelluride on rat thymocytes: cell shrinkage as a cytotoxic parameter. *Environ Toxicol* 19:614–619
- Jacob C, Arteel GE, Kanda T, Engman L, Sies H (2000) Water soluble organotellurium compounds: catalytic protection against peroxynitrite and release of zinc from metallothionein. *Chem Res Toxicol* 13:3–9
- Kanski J, Drake J, Aksenova M, Engman L, Butterfield DA (2001) Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4(*N,N*-dimethylamino) benzenetellurenyl] propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. *Brain Res* 911:12–21
- Litchfield JT, Wilcoxon F (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *JPET* 96:99–113
- Meotti FC, Borges VC, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW (2003) Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett* 143:9–16
- Migliorea L, Coppedè F (2009) Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res* 674:73–84
- Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: pharmacology and toxicology. *Chem Rev* 104:6255–6286
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358

- Parnham M, Sies H (2000) Ebselen: prospective therapy for cerebral ischemia. *Expert Opin Investig Drugs* 9:607–619
- Pessoto FS, Faria PA, Cunha RLOR, Comasseto JV, Rodrigues T, Nantes IL (2007) Organotellurane-promoted mitochondrial permeability transition concomitant with membrane lipid protection against oxidation. *Chem Res Toxicol* 20:1453–1461
- Puntel RL, Roos DH, Grotto D, Garcia SC, Nogueira CW, Rocha JB (2007) Antioxidant properties of Krebs cycle intermediates against malonate pro-oxidant activity in vitro: a comparative study using the colorimetric method and HPLC analysis to determine malondialdehyde in rat brain homogenates. *Life Sci* 81:51–62
- Rooseboom M, Vermeulen NPE, Durgut F, Commandeur JNM (2002) Comparative study on the bioactivation mechanisms and cytotoxicity of Te-Phenyl-L-tellurocysteine, Se-Phenyl-L-selenocysteine and S-Phenyl-L-cysteine. *Chem Res Toxicol* 15:1610–1618
- Rosa RM, Roesler R, Braga AL, Saffi J, Henriques JA (2007) Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. *Braz J Med Biol Res* 40:1287–1304
- Sailer BL, Liles N, Dickerson S, Chasteen TG (2003) Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Arch Toxicol* 77:30–36
- Sailer BL, Liles N, Dickerson S, Summers S, Chasteen TG (2004) Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicol In Vitro* 18:475–482
- Santos DB, Schiar VPP, Ribeiro MCP, Schwab RS, Meinerz DF, Allebrandt J, Rocha JBT, Nogueira CW, Aschner M, Barbosa NBV (2009a) Genotoxicity of organoselenium compounds in human leukocytes in vitro. *Mutat Res* 676:21–26
- Santos DB, Schiar VPP, Paixão MW, Meinerz DF, Nogueira CW, Aschner M, Rocha JBT, Barbosa NBV (2009b) Hemolytic and genotoxic evaluation of organochalcogens in human blood cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 23:1195–1204
- Schiar VPP, Santos DB, Lüdtke DS, Vargas F, Paixão MW, Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT (2007) Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. *Toxicol In Vitro* 21:139–145
- Schiar VPP, Santos DB, Paixão MW, Nogueira CW, Rocha JBT, Zeni G (2009) Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: a possible involvement of reactive oxygen species. *Chem Biol Interact* 177:28–33
- Stangherlin EC, Ardais AP, Rocha JB, Nogueira CW (2009) Exposure to diphenyl ditelluride, via maternal milk, causes oxidative stress in cerebral cortex, hippocampus and striatum of young rats. *Arch Toxicol* 83:485–491
- Westphal GA, Bünger J, Lichey N, Taeger D, Mönnich A, Hallier E (2009) The benzene metabolite para-benzoquinone is genotoxic in human, phorbol-12-acetate-13-myristate induced, peripheral blood mononuclear cells at low concentrations. *Arch Toxicol* 83:721–729
- Wieslander E, Engman L, Svensjo E, Erlansson M, Johansson U, Linden M, Anderson CM, Brattsand R (1998) Antioxidative properties of organotellurium compounds in cell systems. *Biochem Pharmacol* 55:573–584
- Zhang QH, Wu CF, Duan L, Yang JY (2008) Protective effects of ginsenoside Rg₃ against cyclophosphamide-induced DNA damage and cell apoptosis in mice. *Arch Toxicol* 82:117–123

Parte II

5.2 Parte II: Resultados Complementares

5.2.1 Materiais e Métodos:

5.2.1.1 Substâncias químicas

Glutathione redutase (GR), NADPH, ditioneitol (DTT), GSH, NAC, foram obtidos da *Sigma (St. Louis, MO, USA)*. (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila foi sintetizado conforme método da literatura (Braga e cols., 2009). O composto foi diluído em dimetil sulfóxido (DMSO). Todos os demais reagentes foram obtidos da empresa Merk (Rio de Janeiro).

5.2.1.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, adultos (30-40g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram mantidos no Biotério em gaiolas com livre acesso à comida e água a uma temperatura controlada (22 ± 3 °C) e em um ciclo claro/escuro de 12:12 horas. Foram mantidos e usados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5.2.1.3 Protocolo Experimental

5.2.1.3.1 Tratamento 1

A N-acetilcisteína (NAC) contém grupos tióis em sua estrutura e também é utilizada como antioxidante em condições de estresse oxidativo (Moldeus e cols., 1986). Sabe-se que a NAC pode estimular a síntese de GSH (Moldeus e cols., 1986). Neste estudo, utilizamos o pré-tratamento com NAC como uma ferramenta para elucidar mecanismos de ação do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila.

Os camundongos foram divididos em 4 grupos ($n= 5$) experimentais com as seguintes doses:

- (1) TFK (Tampão Fosfato de Potássio 140mM pH 7,4-veículo) 2,5ml/kg i.p. + DMSO 1ml/kg s.c.;
- (2) NAC 100mg/kg (2,5ml/kg) i.p + DMSO s.c.;
- (3) TFK 2,5ml/kg i.p + (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila 92,5 $\mu\text{mol/kg}$ (1/2 DL_{50}) 1ml/kg s.c.;
- (4) NAC 100mg/kg (2,5ml/kg) i.p + (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila 92,5 $\mu\text{mol/kg}$ (1ml/kg) s.c.

O tratamento com NAC foi realizado por 10 dias consecutivos. Os animais receberam injeções (única aplicação diária) durante 3 dias de NAC ou seu veículo (TFK) e posteriormente, mais 7 dias do tratamento com o composto e/ou NAC. Após este tempo de exposição, os testes comportamentais foram realizados.

Os animais foram observados diariamente quanto a existência ou não de sinais de toxicidade, sendo estes: odor gálico, parcial ou total paralisia dos membros inferiores, diarreia, tremores, perda de pelo e redução do peso corporal.

5.2.1.3.1.1 Avaliação comportamental

No dia do experimento, os animais foram aclimatados à sala experimental pelo menos 2 horas antes do procedimento experimental. O teste de campo aberto foi realizado em uma sala sem nenhum ruído ou interferência de atividade humana. O teste foi realizado em grupos independentes de animais ($n=5$ em cada grupo).

5.2.1.3.1.1.1 Campo aberto

O teste do campo aberto é uma medida da atividade motora espontânea e atividade exploratória dos animais. Este teste foi realizado conforme descrito por Kim e cols. (2000) com pequenas modificações. O aparato consiste em uma caixa de madeira (56 x 42 x 40 cm) dividida em 12 quadrantes. Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e o número de segmentos atravessados (com todas as patas) foi registrado durante um período de 5 min. O número de quadrados cruzados com as quatro patas foi utilizado como uma medida da atividade locomotora.

5.2.1.3.1.2 Preparação das amostras para os ensaios bioquímicos

Após o teste comportamental, os animais foram anestesiados, e sangue total foi coletado por punção cardíaca para o teste de viabilidade e ensaio cometa. Posteriormente os animais foram eutanasiados e o cérebro e o fígado removidos e homogeneizados em Tris – HCl 10 mM, pH 7,4. Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 2.500 g por 10 min, 4°C. O sobrenadante (S1) obtido foi usado para as análises bioquímicas.

5.2.1.3.1.2.1 Análise da atividade de enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx, GR e TrxR foi determinada na porção S1 do homogenato de tecido cerebral e hepático de camundongos, de acordo com a metodologia previamente descrita por Aebi (1984), Wendel (1981), Carlberg e Mannervik (1985) e Holmgren e Bjornsted (1995) respectivamente.

5.2.1.3.1.3 Determinação de proteínas

O conteúdo protéico das amostras foi determinado pelo método de Lowry e cols (1951).

5.2.1.3.1.4 Coleta de sangue e isolamento de leucócitos

Os animais foram anestesiados com éter, e 1,5 ml de sangue foram coletados por punção cardíaca.

O isolamento dos leucócitos, para posterior realização do teste de viabilidade e ensaio cometa, foi conduzido de acordo com o método de Santos e cols. (2009) e ajustada para 2×10^6 leucócitos/ml com HBSS/heparina.

5.2.1.3.1.4.1 Viabilidade Celular

A porcentagem de leucócitos viáveis e não viáveis das amostras foi determinada pelo método de Azul de Tripán segundo Mischell and Shiingi (1980). A viabilidade celular foi calculada como o número de células vivas dividido pelo total do número de células multiplicado por 100.

5.2.1.3.1.4.2 Teste cometa

O ensaio cometa foi realizado com amostras de leucócitos isolados, e as análises de danos no DNA foram realizadas seguindo a metodologia de Santos e cols. (2009). As lâminas foram analisadas por dois indivíduos que não tem conhecimento do tratamento.

5.2.1.3.2 Tratamento 2

Os camundongos foram divididos em 3 grupos ($n= 5$) experimentais com os seguintes tratamentos:

- (1) Salina 1ml/kg via s.c.;
- (2) DMSO 1ml/Kg via s.c.;
- (3) (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila 92.5 $\mu\text{mol/kg}$ (1/2 DL50) 1ml/kg via s.c.;

Os animais receberam injeções subcutâneas (única aplicação diária) durante 7 dias.

Foram observados diariamente a existência ou não de sinais de toxicidade, os quais já foram relatados no tratamento 1.

5.2.1.3.2.1 Isolamento da Fração Sinaptossomal

Vinte e quatro horas após a última injeção, os animais foram mortos por decapitação, o cérebro removido, e a fração sinaptossomal foi isolada segundo o protocolo de Franco e cols., 2007.

5.2.1.3.2.2 Tratamento da fração sinaptossomal

Foram avaliados os efeitos dos inibidores de enzimas antioxidantes na fração de sinaptossomas de camundongos. Foram utilizados, o BCNU, inibidor da GR (Walther e cols., 2003), e o CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), inibidor da TrxR (Arnér, e cols., 1995). O tratamento foi realizado conforme o esquema a seguir.

- (1) Etanol 10% (veículo) + solução de suspensão + 25µl de sinaptossomas
- (2) BCNU 200 µM + solução de suspensão +25µl de sinaptossomas
- (3) CDNB 25µM + solução de suspensão +25µl de sinaptossomas
- (4) CDNB 25µM + BCNU 200 µM + solução de suspensão +25µl de sinaptossomas.

As amostras foram incubadas durante 1h a 37°C. E posteriormente foi realizado o teste bioquímico conforme protocolo a seguir.

5.2.1.3.2.3 Ensaio bioquímico

5.2.1.3.2.3.1 Função Mitocondrial (MTT)

A função mitocondrial foi acessada através da reação de conversão do corante brometo de metiltiazolildifenil tetrazolio (MTT) a formazan pelas mitocôndrias viáveis, conforme a metodologia descrita por Dreiem e cols. (2005).

5.2.1.4 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via ou duas vias, seguida pelo teste Post Hoc de Newman-Keuls ou Bonferroni respectivamente, quando apropriado. As análises foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5.2.2. Resultados

5.2.2.1. Tratamento 1

5.2.2.1.1 Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila no ganho de peso corporal

O tratamento com o composto causou uma marcada redução no ganho de peso corporal dos animais estudados, significativamente após o oitavo dia de administração. Quando co-administrada a NAC, essa perda foi ainda maior, sendo significativo a partir do sexto dia quando comparado com o controle (Figura 1).

5.2.2.1.2 Teste comportamental de campo aberto

Os animais tratados com o composto não apresentaram alterações significativas no comportamento exploratório e locomotor, no entanto quando co-tratados com a NAC, a locomoção e exploração diminuí substancialmente (Figura 2).

5.2.2.1.3 Efeito do tratamento sobre a atividade das enzimas antioxidantes

O tratamento com o (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila quando associado à NAC apresentou uma tendência em diminuir a atividade da CAT hepática, o que não ocorreu no cérebro (Figura 3).

Nenhuma alteração foi observada para a atividade cerebral ou hepática da GPx quando os animais foram tratados com o composto ou co-tratados com a NAC (Figura 4).

Quando avaliada a atividade da GR, houve um significativo aumento na atividade desta enzima no fígado quando co-administrada a NAC ao (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila. Além disso, no cérebro existe uma tendência a diminuir a atividade desta enzima quando o composto é administrado sozinho ou em associação com a NAC (Figura 5).

A atividade cerebral da TrxR foi significativamente inibida pelo composto e quando co-administrado com NAC. No entanto, no fígado a atividade desta enzima

demonstrou um significativo aumento, quando comparado ao controle, quando os animais foram tratados com (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila e quando co-tratados com NAC (Figura 6).

5.2.2.1.4 Viabilidade Celular e Ensaio cometa

O tratamento com (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila ou co-administração com NAC, na dose testada não mostraram ser citotóxicos ou genotóxicos nos leucócitos dos camundongos tratados (Figura 7, tabela 1 respectivamente).

5.2.2.2 Tratamento 2

5.2.2.2.1 Função Mitocondrial (MTT)

Ocorreu uma significativa redução na viabilidade mitocondrial quando comparados os inibidores com o controle etanol dentro de um mesmo grupo de tratamento *in vivo*. No entanto a inibição das enzimas antioxidantes não afetou o efeito do composto, o que indica aparentemente que elas não estão envolvidas no mecanismo de ação do composto (Figura 8).

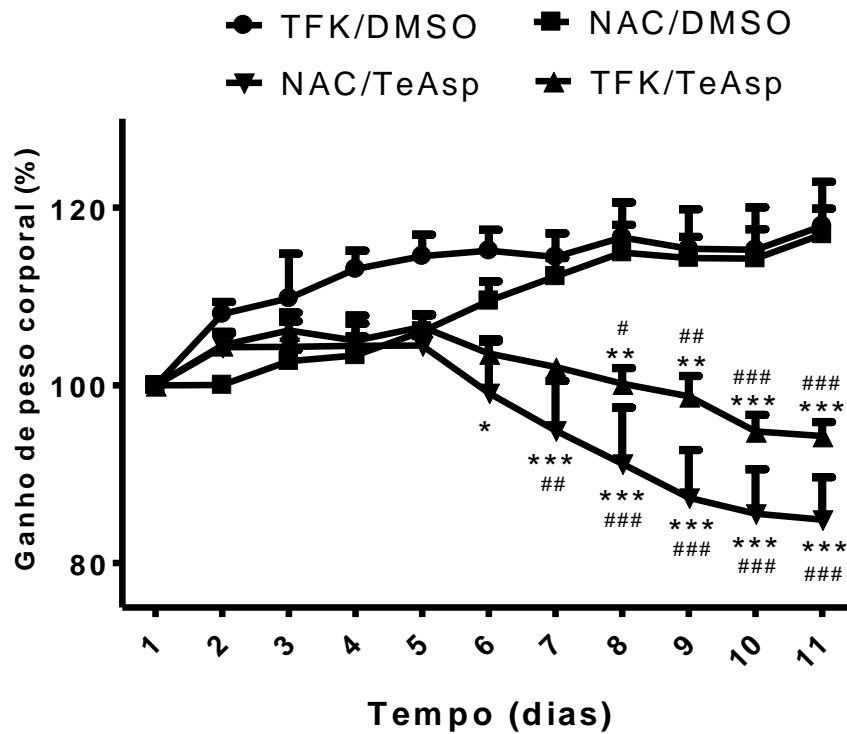


Figura 1: Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) no ganho de peso corporal de camundongos adultos. Os resultados são apresentados como porcentagem \pm erro, de 5 animais por grupo. * representa significativamente diferente do grupo TFK/DMSO e # significa diferença significativa do grupo NAC/DMSO, sendo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (ANOVA de uma via/ Newman-Keuls).

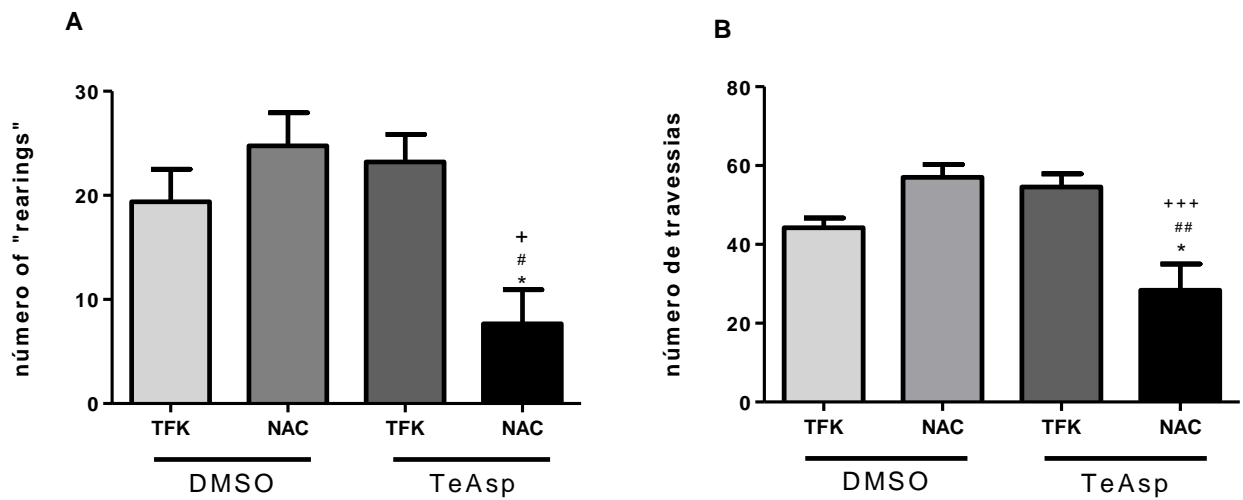


Figura 2: Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) no comportamento exploratório e locomoção (campo aberto) de camundongos adultos. Número de "rearings" (A) número de travessias (B). Os resultados são apresentados como média \pm erro, de 5 animais por grupo. * representa significativamente diferente do grupo TFK/DMSO, # significa diferença significativa do grupo NAC/DMSO e + diferença significativa do TFK/TeAsp, sendo * $p < 0,05$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; + $p < 0,05$ +++ $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido por Newman-Keuls.

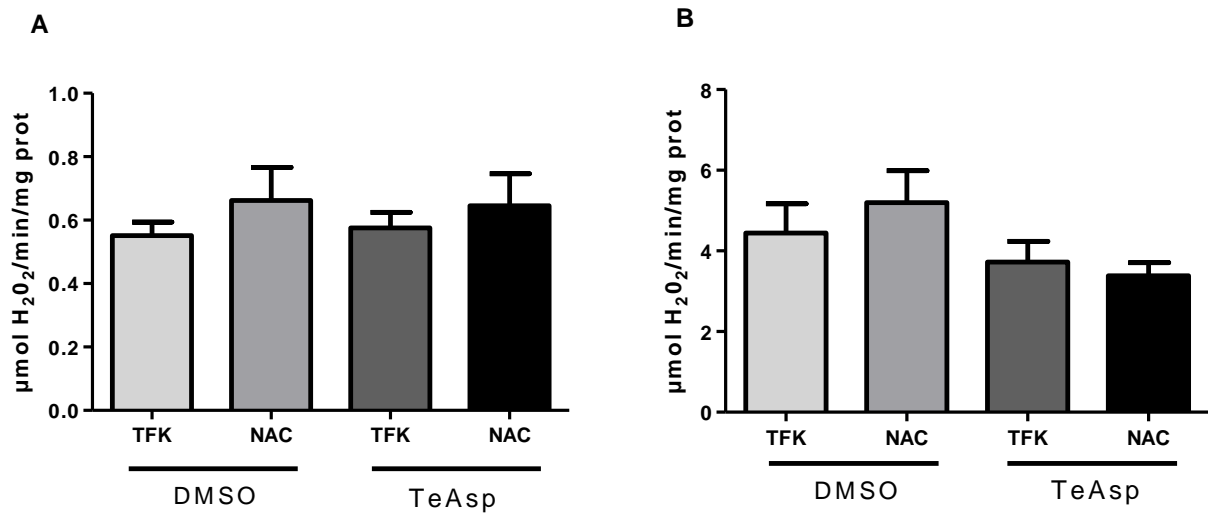


Figura 3: Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) na atividade da enzima antioxidante catalase no cérebro (A) e fígado (B) de camundongos adultos. Os resultados são apresentados como média \pm erro, de 5 animais por grupo. ANOVA de uma via seguido por Newman-Keuls

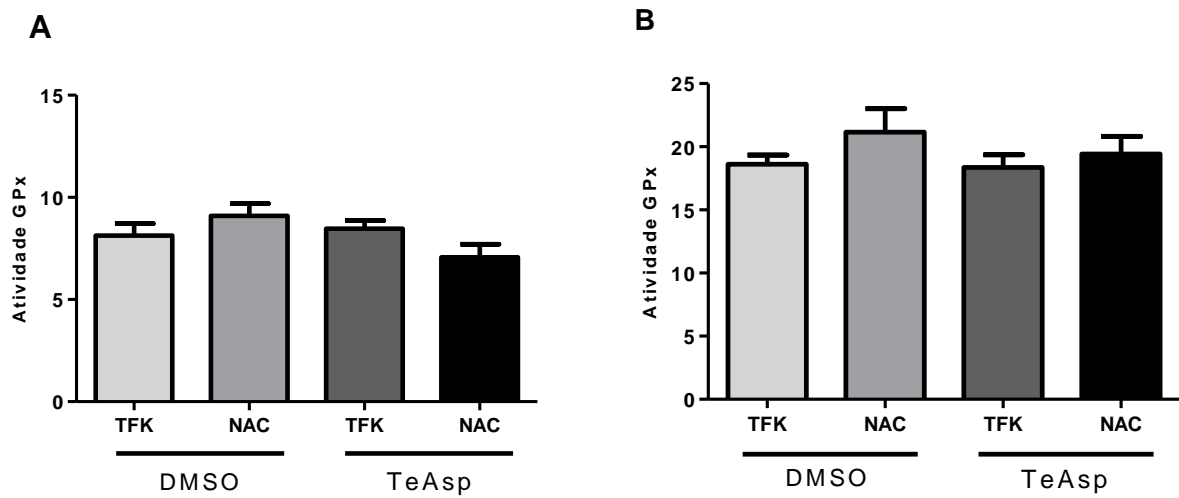


Figura 4: Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) na atividade da enzima antioxidante Glutaciona Peroxidase no cérebro (A) e fígado (B) de camundongos adultos. Os resultados são expressos em nmol de NADPH/min/mg proteína e são apresentados como média \pm erro, de 5 animais por grupo. ANOVA de uma via seguido por Newman-Keuls.

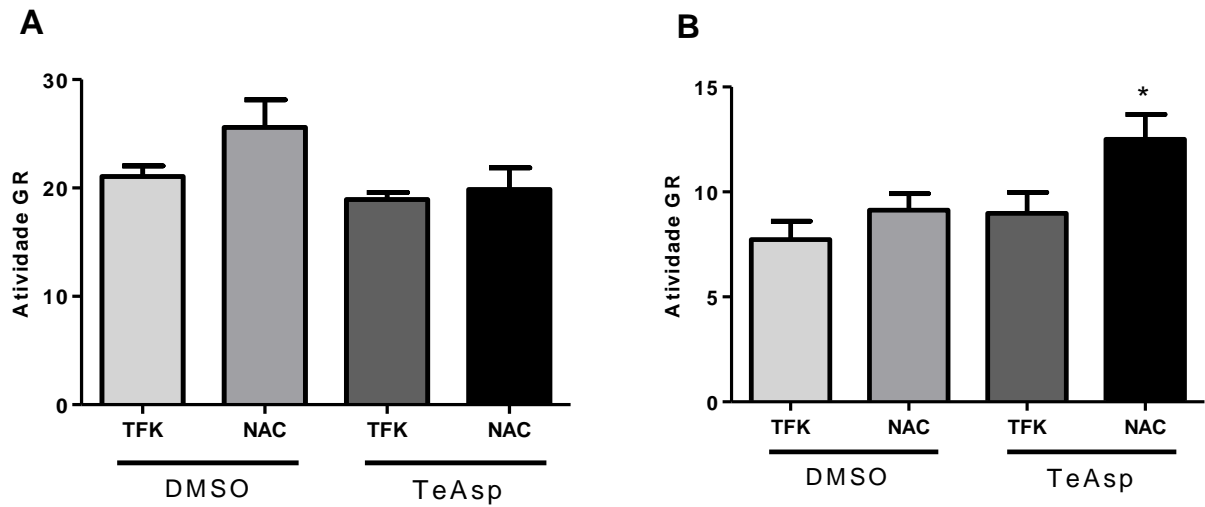


Figura 5: Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) na atividade da enzima antioxidante Glutathione Redutase no cérebro (A) e fígado (B) de camundongos adultos. Os resultados são expressos em nmol/min/mg proteína e são apresentados como média \pm erro, de 5 animais por grupo. *representa significativamente diferente do grupo TFK/DMSO ($p < 0,05$). ANOVA de uma via seguido por Newman-Keuls.

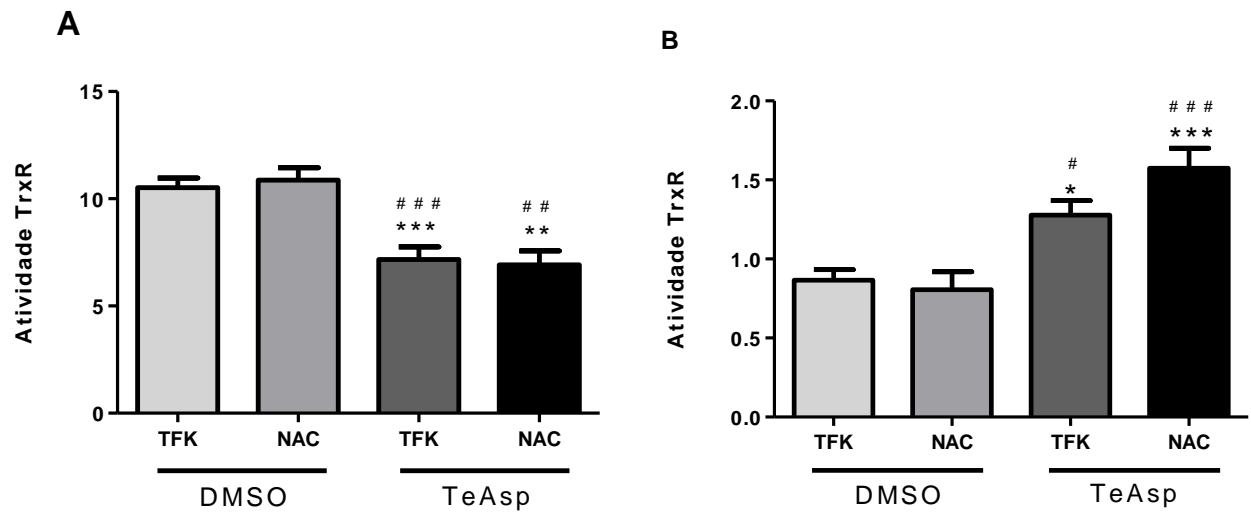


Figura 6: Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) na atividade da enzima antioxidante Tiorredoxina Redutase no cérebro (A) e fígado (B) de camundongos adultos. Os resultados são expressos em nmol de TNB/min/mg of proteína e apresentados como média \pm erro, de 5 animais por grupo. *representa significativamente diferente do grupo TFK/DMSO e # significa diferença significativa do grupo NAC/DMSO, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido por Newman-Keuls.

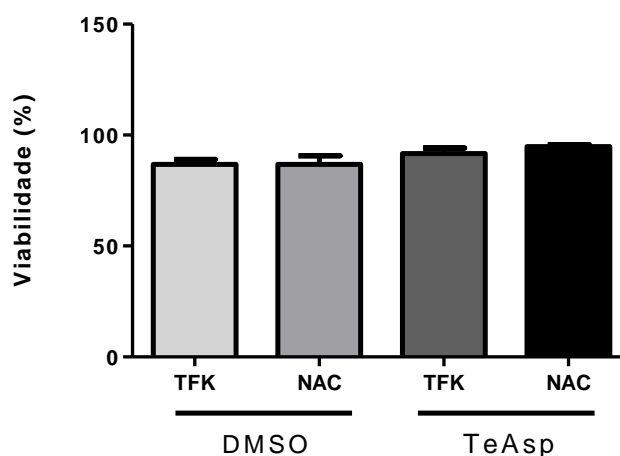


Figura 7: Efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp) na viabilidade celular de leucócitos de camundongos adultos. Os resultados são apresentados como média \pm erro, de 5 animais por grupo. ANOVA de uma via seguido por Newman-Keuls.

Tabela 1: Dano no DNA expresso como índice de dano (I.D.) em leucócitos de camundongos tratados com (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp).

Tratamento	I.D.
TFK/DMSO	12.25 \pm 1.65
NAC/DMSO	13.25 \pm 2.86
TFK/TeAsp	13.75 \pm 4.8
C/TeAsp	9.7 \pm 3.35

Os resultados são apresentados como média \pm erro, de 5 animais por grupo. ANOVA de uma via seguido por Newman-Keuls.

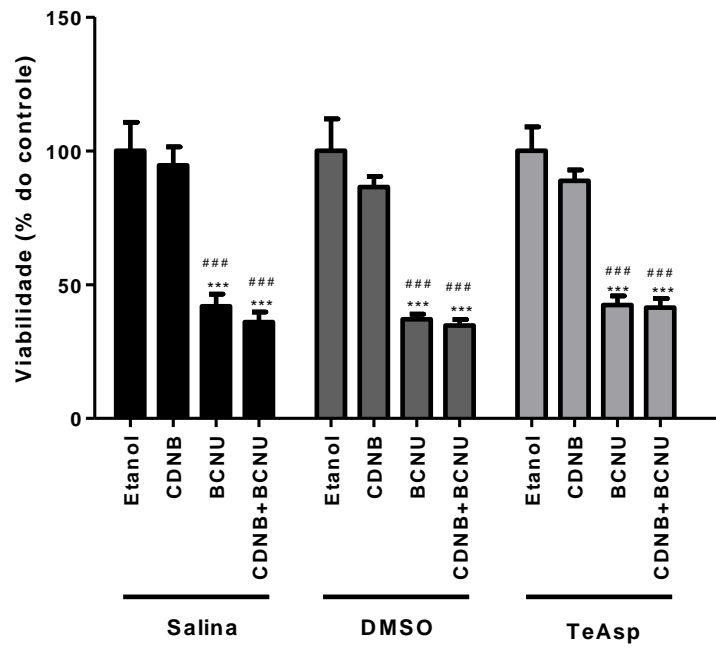


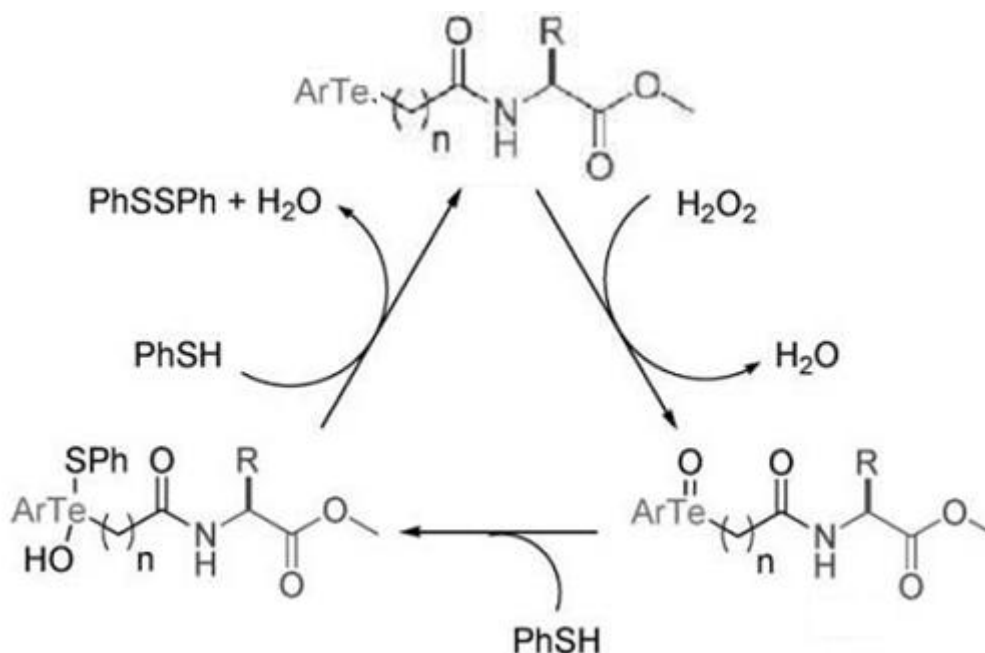
Figura 8: Efeito dos inibidores BCNU e CDNB na viabilidade mitocondrial (Teste MTT) de sinaptossomas de camundongos tratados com (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila (TeAsp). Resultados são apresentados como Médias \pm Erro, n=5 por grupo. Sendo que * diferente em relação ao etanol e # diferente em relação ao CDNB. ANOVA de duas vias, seguida por Bonferroni posttests.

6. DISCUSSÃO

Considerando que a exposição de humanos aos compostos orgânicos de Te está aumentando devido ao seu papel como importante intermediário na síntese orgânica, o qual pode provocar risco ocupacional e ambiental a saúde humana (Zeni e cols., 2006), no presente estudo investigamos os potenciais efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo* do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila, um composto orgânico de Te derivado do ácido aspártico.

Em geral, compostos orgânicos de Te são eficientes agentes antioxidantes, com um potencial maior do que seus análogos Se e S (Wieslander e cols., 1998; Engman e cols., 1995, 2003a; Kanski e cols., 2001). Estudos mostram que o principal mecanismo pelo qual os compostos organocalcogênicos exercem atividade antioxidante está relacionado ao efeito mimético da atividade da GPx (Meotti e cols., 2004; Nogueira e cols., 2004). De acordo, o composto estudado em nosso trabalho apresentou importante atividade antioxidante *in vitro*, sendo um potente mimético a enzima GPx, consistente com dados demonstrados previamente onde este composto apresentou melhor atividade mimética a GPx dentre outros 20 compostos de Te derivados de aminoácidos.

Em relação ao mecanismo de ação mimética a GPx do telureto utilizado neste estudo, acredita-se que inicialmente os compostos de Te (II) reagem com H_2O_2 para formar teluróxido, e H_2O . A adição de um equivalente de PhSH a esses compostos gera o sulfeto de telurenila o qual reage com outro equivalente de PhSH para regenerar Te(II) no ciclo catalítico e produzir PhSSPh e H_2O (Esquema 1.- Braga e cols., 2009).



Esquema 1- Mecanismo da atividade tipo GPx de teluretos
(Adaptado de Braga e cols., 2009)

Sabendo que a atividade mimética da enzima GPx de compostos de Se/Te depende da reatividade desses compostos com grupamentos tióis na presença de peróxidos, foi demonstrado que a atividade tipo GPx de compostos de selênio não depende apenas da reatividade do intermediário selenol com peróxidos, mas também depende da reatividade do intermediário selenosulfeto com grupos tióis (Mishra e cols., 2006). A semelhança desses compostos de Se com o Te pode nos levar a sugerir que uma maior reatividade do composto com grupo tiol pode estar associado a um aumento na propriedade mimética da enzima GPx desse composto.

Além disso, o composto apresentou fraca atividade tiol oxidase, o que acarretaria em uma baixa toxicidade, corroborando com a sua atividade antioxidante *in vitro*.

Adicionalmente, a produção de TBARS causada pelo Fe(II) em homogeneizados de cérebro de ratos, foi consideravelmente reduzida na presença do composto. A atividade pró-oxidante do ferro pode estar relacionado à sua capacidade de estimular a produção de radicais livres (RL) por diferentes mecanismos (Braugher e cols., 1986; Minotti e cols., 1992). Sendo assim o composto demonstra importante atividade antioxidante *in vitro* contra a PL causada por RL.

No entanto, mesmo apresentando potencial antioxidante *in vitro*, compostos orgânicos de Te têm demonstrado ser tóxicos para roedores quando administrados *in vivo* e em modelos *in vitro* (Sailer e cols., 2004, Schiar e cols., 2007, 2009; Santos e cols., 2009 a, b). E ainda, poucos estudos têm investigado os efeitos antioxidantes ou tóxicos dos organoteluretos *in vivo* (Ávila e cols., 2006, 2007, 2008; Pessoto e cols., 2007).

Neste contexto, quando administrado em camundongos adultos o composto (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila, o qual apresenta uma DL_{50} de $185\mu\text{mol/Kg}$, demonstrou atividade genotóxica e mutagênica quando testado em altas doses, próxima a DL_{50} . O mecanismo envolvido nesta toxicidade ainda não está elucidado, mas pode estar relacionado à oxidação do composto a Te(IV) que potencialmente interage com centros nucleofílicos de biomoléculas.

Tendo em vista que grande parte dos compostos de Te apresentam toxicidade por consumir grupos SH celulares (Blais e cols., 1972; Deuticke e cols., 1992) e que a NAC contém grupos tióis em sua estrutura, é utilizada como antioxidante em condições de estresse oxidativo (Moldeus e cols., 1986) e ainda, pode estimular a síntese de GSH (Moldeus e cols., 1986), realizamos testes utilizando a NAC como um pré-tratamento ao composto, objetivando elucidar possíveis mecanismos de ação *in vivo* para este composto. Baseando-se nestes fatos, nossa hipótese inicial fundou-se na possibilidade de que o tratamento com NAC reverteria os efeitos tóxicos do composto de Te. No entanto, nossos resultados demonstraram que o tratamento com NAC causou um aumento na toxicidade em relação ao tratamento somente com o composto.

Inicialmente os animais tratados com o composto demonstraram alguns sinais de toxidade, incluindo perda de peso e odor gálico. Esse efeito foi claramente enfatizado pelo pré-tratamento com NAC. Resultados semelhantes de perda de peso corporal foram mostrados também por Brandão e cols. 2006, onde a NAC agravou os efeitos causados apenas pelo cloreto de mercúrio (HgCl_2) (Brandão e cols., 2006).

Quanto ao comportamento de lomoção e exploração os animais tratados somente com o (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila não apresentaram diferença em relação ao controle. No entanto os animais tratados com NAC e o composto demonstraram significativa diminuição na locomoção e exploração. Estes dados corroboram com informações na literatura que indicam que

compostos de Te em geral exercem efeito tóxico ao sistema nervoso. (Nogueira e cols., 2002, Pinton e cols., 2010a). No entanto, como o efeito tóxico não foi demonstrado para o tratamento somente com o composto de Te, sugere-se que possa ter ocorrido uma associação entre o composto e a NAC, e o conjugado resultante desta associação poderia estar sendo transportado mais facilmente para o interior das células, e assim aumentando a toxicidade do composto. De maneira similar, esse efeito ocorreu também para a maioria dos testes *ex vivo* realizados. Similarmente, Brandão e cols demonstraram um aumento da captação de Hg pelos rins de roedores, o que ocasionou um aumento no dano renal, devido à formação de um complexo Hg-NAC (Brandão e cols., 2006).

Um espectro de absorção (200-800nm) realizado com o composto e a NAC demonstrou uma possível ligação/interação entre NAC e o composto em uma determinada dose (dado não mostrado). O que poderia estar ocorrendo também *in vivo*, facilitando a toxicidade do composto.

Além disso, outra possibilidade de estar exercendo efeito tóxico em associação com o composto, é que a utilização da NAC como agente antioxidante ou quelante, requer certos cuidados, já que Ritter e cols. (2004) descreveram que o uso da NAC pode ter algumas limitações e apresentar efeitos pró-oxidantes, devido à facilidade com que interage com o ferro.

Enzimas antioxidantes são consideradas a defesa primária que previne as macromoléculas biológicas do dano oxidativo. O cérebro possui maior atividade das enzimas SOD e GPx do que outros órgãos (Benzi & Moretti, 1995). Este fato, associado à menor atividade da CAT indica que o cérebro seja um órgão bastante vulnerável ao H₂O₂.

Em nosso estudo, o composto testado não foi capaz de alterar a atividade de enzimas antioxidantes cerebrais (GR, GPx e CAT), nem mesmo com a adição de NAC que piorou a ação do composto em relação ao comportamento ou em relação a outro órgão testado, o fígado. No entanto o tratamento com o composto causou um decréscimo na atividade da TrxR cerebral. De acordo com dados da literatura, compostos de Te são capazes de inibir a TrxR e causar citotoxicidade *in vitro*, provavelmente devido a alta afinidade de compostos de Te a grupos tióis (Engman e cols., 1997; Engman e cols., 2000; 2003 a, b).

Por outro lado quando analisadas a atividade de enzimas hepáticas, a associação da NAC com o composto de Te levou a um aumento na atividade da GR

e TrxR, não alterou a atividade da GPx e teve tendência a reduzir atividade da catalase.

Neste contexto, dados na literatura demonstram que a exposição aguda a oxidantes geralmente pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como resultado de uma resposta adaptativa, o que conseqüentemente reduz o dano (Hilbert & Mohsenin, 1996).

Por outro lado, após uma exposição prolongada, os efeitos tóxicos prevalecem sobre os mecanismos adaptativos dos tecidos, como indicado pela redução nos níveis destas enzimas (Hulea e cols., 1995). Neste estudo, o protocolo experimental foi realizado em uma semana de exposição, que é um tempo intermediário, classificado então, como protocolo subagudo. Diante disto, presumimos que o protocolo experimental utilizado neste estudo pode causar alterações enzimáticas observadas tanto na fase aguda quanto na fase crônica de exposição.

De acordo, em nossos resultados, o cérebro apresentou uma redução na atividade da maioria das enzimas testadas. Considerando que este órgão apresenta maior susceptibilidade à xenobióticos e que compostos de Te tem grande afinidade por este tecido (Nogueira e cols., 2004), pode-se sugerir que os mecanismos de defesa deste tecido tenham sido esgotados pela exposição ao composto de Te. Por outro lado, a atividade enzimática do fígado estaria aumentada como resultado de uma resposta adaptativa.

Como uma maneira de elucidar um possível mecanismo de ação do composto utilizamos inibidores das enzimas TrxR e GR. O CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), composto eletrofílico que reage com grupos sulfidrilas por meio da alquilação, é um inibidor irreversível da TrxR em baixas concentrações. A inibição ocorre somente depois da redução do sítio ativo sulfidrilas pelo NADPH (Arnér e cols., 1995). A diminuição da atividade da tiorredoxina reduz as defesas antioxidantes per se (Flohé e Harris, 2007). Já o BCNU, é um composto eletrofílico com alta afinidade por grupos sulfidrilas que inibe especificamente a GR (White e cols., 1999; Tretter e cols., 2003), comprometendo dessa forma também a função da GPx.

Nossos resultados mostraram, que somente quando inibida a GR ocorreu um significativo decréscimo da atividade mitocondrial. Ou quando a inibição da GR estava associada à inibição da TrxR. A inibição somente da TrxR não causou diminuição na viabilidade/atividade mitocondrial. No entanto a inibição dessas

enzimas não afetou a ação do composto, pelo menos nesta dose testada, mostrando que esse composto provavelmente não estaria agindo por essa via de toxicidade.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação pode-se concluir que:

- Quando testado *in vitro* o composto (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila demonstra importante atividade antioxidante;
- Os animais tratados durante 21 dias com altas doses do composto apresentam significativa genotoxicidade e mutagenicidade nas células sanguíneas;
- Os camundongos adultos expostos ao (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila apresentaram diversos sinais gerais de toxicidade, como: perda de peso e pelos corporais, tremores e paralisia parcial dos membros inferiores;
- Prejuízos no comportamento sensório-motor dos animais expostos ao (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila, co-tratados com NAC também foram observados, devido as alterações verificadas no desempenho destes animais nos testes de campo aberto;
- A exposição ao (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila modificou a atividade de enzimas antioxidantes pela redução da atividade hepática da CAT e aumento da GR hepática quando associado a NAC em camundongos;
- (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila é capaz de inibir a atividade da enzima TrxR cerebral, no entanto aumentar a atividade hepática em camundongos;
- Quando testado em doses menores o (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila não foi capaz de induzir citotoxicidade ou genotoxicidade em células sanguíneas de camundongos;
- A NAC, uma importante doadora de gupamentos SH, que atua na defesa ao estresse oxidativo, não foi capaz de proteger os animais contra os efeitos do

composto na dose testada. Pelo contrário, acentuou o efeito do mesmo em alguns casos;

→ Aparentemente as enzimas antioxidantes GR e TrxR não estão envolvidas no mecanismo de toxicidade do composto, o que foi demonstrado a partir de tratamento ex vivo com inibidores das mesmas, em sinaptossomas de animais tratados com (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila.

8. PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Realizar a detecção imuno-histoquímica de morte celular por apoptose e alterações sinápticas em cérebro de camundongos expostos ao (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila;
- Investigar o possível efeito genotóxico e mutagênico do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila em testes *in vitro*;
- Realizar a análise molecular da expressão gênica de enzimas antioxidantes;
- Analisar o efeito do (S) (3-feniltelanil propanamida) succinato de dimetila frente a diferentes parâmetros de disfunção mitocondrial.

9. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121–126, 1984.

AGNEW, W.F. Transplacental uptake of tellurium-127(m) studies by whole-body autoradiography. *Teratology* 6, 331-&, 1972.

ALBERTO, E.E.; SOARES, L.C.; SUDATI, J.H.; BORGES, A.C.; ROCHA, J.B.T.; BRAGA, A.L. Efficient synthesis of modular amino acid derivatives containing selenium with pronounced GPx like activity. *Eur J Org Chem* 25, 4211–4214, 2009.

ANDERSSON, C.M.; HALLBERG, A.; BRATTSAND, R.; COTGREAVE, I.A.; ENGMAN, L.; PERSSON, J. Glutathione peroxidase-like activity of diaryl tellurides. *Bioorg Med Chem Lett* 3, 2553–2558, 1993.

ANDERSSON, C.M.; BRATTSAND, R.; HALLBERG, A. Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. *Free Rad Res* 20, 401-410, 1994.

ARNÉR, E.S.J.; BJÖRNSTEDT, M.; HOLMGREN, A. 1-Chloro-2,4 dinitrobenzene Is an Irreversible Inhibitor of Human Thioredoxin Reductase. *J Biol Chem* 270, 3479 3482, 1995.

ÁVILA, D.S.; COLLE, D.; GUBERT, P.; PALMA, A.S.; PUNTEL, G.; MANARIN, F.; NOREMBERG, S.; NASCIMENTO, P.C.; ASCHNER, M.; ROCHA, J.B.; SOARES, F.A. A possible neuroprotective action of a vinylic telluride against Mn-induced neurotoxicity. *Toxicol Sci* 115, 194-201, 2010.

ÁVILA, D.S.; GUBERT, P.; PALMA, A.; COLLE, D.; ALVES, D.; NOGUEIRA C.W.; ROCHA, J.B.T.; SOARES, F.A.A. An organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats. *Brain Res Bull* 76, 114–123, 2008.

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. *Toxicol* 224, 100–107, 2006.

ÁVILA, D.S.; GUBERT, P.; DALLA CORTE, C.L.; ALVES, D.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T.; SOARES, F.A.A. A biochemical and toxicological study with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate in a subchronic intraperitoneal treatment in mice. *Life Sci* 80, 1865–1872, 2007.

BACK, T.G.; KUZMA, D.; PARVEZ, M. Aromatic derivatives and tellurium analogues of cyclic seleninate esters and spirodioxyselenuranes that act as glutathione peroxidase mimetics. *J Org Chem* 70, 9230-9236, 2005.

BANHEGYI, G.; BRAUN, L.; CSALA, M.; PUSKAS, F.; MANDL, J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free radical biology and medicine* 23, 793 803, 1997.

BARBOSA, N.B.V.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; BEQUE, M.C.; BRAGA, A.L. Effect of organic forms of Selenium on delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 149, 243-253, 1998.

BENZI, G.; MORETTI, A. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and glutathione system. *Free Radic Bio Med* 19, 77-101, 1995.

BERGAN, T.; DOWDALL, M.; SELNAES, O.G. On the occurrence of radioactive fallout over Norway as a result of the Windscale accident, October 1957. *J Environ Radioact.* 99, 50-61, 2008.

BLACKADDER, E.S.; MANDERSON, W.G. Occupational absorption of tellurium: a report of two cases. *Br J Ind Med.* 32, 59-61, 1975.

BLAIS, F.X.; ONISCHUK, R.T.; DE MEIO, R.H. Hemolysis by tellurite: I: The tellurite test for Hemolysis. *J.AOA* 73, 45-51, 1972.

BORGES, V.C.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. *Neurochem. Res* 29, 1505-1509, 2004.

BORGES, V.C.; ROCHA, J.B.T.; SAVEGNAGO, L.; NOGUERIA, C.W. Repeated administration of diphenyl ditelluride induces hematological disorders in rats. *Food and Chemical Toxicol* 45, 1453-1458, 2007.

BORGES, V.C.; SAVEGNAGO, L.; PINTON, S.; JESSE, C.R.; ALVES, D.; NOGUEIRA, C.W. Vinyl telluride derivatives as promising pharmacological compounds with low toxicity. *J Appl Toxicol* 28, 839-848, 2008.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In : CLERCH, L.; MASSARO, D. Oxygen, gene expression and cellular function. *Marcel Decker: New York* 105, 1-25, 1997.

BRAGA, A.L.; ALBERTO, E.E.; SOARES, L.C.; ROCHA, J.B.T.; SUDATI, J.H.; ROOS, D.H. Synthesis of telluroamino acid derivatives with remarkable GPx like activity. *Org Biomol Chem* 7, 43-45, 2009.

BRANDÃO, R.; SANTOS, F.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. DMPS and N-acetylcysteine induced renal toxicity in mice exposed to mercury. *BioMetals* 19, 389-398, 2006.

BRAUGHLER, J.M.; DUNCAN, L.A.; CHASE, R.L. The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. *J. Biol. Chem.* 261, 10282-10289, 1986.

BRIVIBA, K.; TAMLER, R.; KLOTZ, L.O.; ENGMAN, L.; COTGREAVE, I.A.; SIES, H. Protection against organotellurium compounds against peroxynitrite mediated oxidation and nitration reactions. *Biochem Pharmacol* 55, 817-823, 1998.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113, 484–490, 1985.

CASTRO, M.E.; MOLINA, R.C.; DÍAS, W.A.; PRADENAS, G.A.; VÁSQUEZ, C.C. Expression of aeromonas caviae ST pyruvate dehydrogenase complex components mediate tellurite resistance in Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun* 380, 148-152, 2009.

CHAKRABORTY, D.; BHATTACHARYYA, A.; MAJUMDAR, K.; CHATTERJEE, K.; CHATTERJEE, S.; SEN, A.; CHATTERJEE, G.C. Studies on l-ascorbic-acid metabolism in rats under chronic toxicity due to organophosphorus insecticides - effects of supplementation of l-ascorbic-acid in high doses. *J Nutr.* 108, 973-980, 1978.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605, 1979.

CHATTERJEE, G.C.; RUDRA PAL, D. Metabolism of L-ascorbic acid in rats under in vivo administration of mercury: effects of L-ascorbic acid supplementation. *Int J Vit Nutr Res* 45, 284-292, 1975.

CHEN, F.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. Cell apoptosis induced carcinogenic metals. *Mol Cell Biochem* 221, 183–188, 2001.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26, 249-261, 2004.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143-151, 2008.

COMASSETO, J. V.; LING, L.W.; PETRAGNANI, N.; STEFANI, H.A. Vinylic selenides and tellurides – preparations, reactivity and synthetic applications. *Synthesis* 4, 373-&, 1997.

CUNHA, L.O.R.; URANO, M.E.; CHAGAS, J.R.; ALMEIDA, P.C.; BINCOLETTO, C.; TERSARIOL, I.L.S.; COMASSETO, J.V. Tellurium- based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium (IV) compounds as inhibitors of human *Cathepsin B*. *Bioorg Med Chem.Lett* 15, 755-760, 2005.

D'GREGÓRIO, R.E.P; MILLER, R.K. Teratogenicity of tellurium dioxide: prenatal assessment. *Teratology.* 37, 307-316, 1988.

DAVIES, K.J.A. Oxidative damage and repair: Chemical, biological and medical aspects. *Oxford: Pergamon* p.910, 1991.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death Differ* 3, 71-78, 1996.

DEGRANDI, T.H.; DE OLIVEIRA, I.M.; D'ALMEIDA, G.S.; GARCIA, C.R.; VILLELA, I.V.; GUECHEVA, T.N.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A. Evaluation of the

cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 25, 257-269, 2010.

DEUTICKE, B.; LUTKEMEIER, R.K.; POSE, B. Tellurite- induced damage of the erythrocyte membrane. Manifestations and mechanisms. *Biochem Biophys Acta* 1109, 97-107, 1992.

DONG, Z.Y.; LIU, J.Q.; MAO, S.Z.; HUANG, X.; YANG, B.; REN, X.J.; LUO, G.M.; SHEN, J.C. Aryl thiol substrate 3-carboxy-4-nitrobenzenethiol strongly stimulating thiol peroxidase activity of glutathione peroxidase mimic 2, 2'-ditellurobis(2-deoxy-beta-cyclodextrin). *J Am Chem Soc.* 126, 16395-16404, 2004.

DREIEM, A.; GERTZ, C.C.; SEEGAL, R.F. The effects of methylmercury on mitochondrial function and reactive oxygen species formation in rat striatal synaptosomes are age-dependent. *Toxicol Sci* 87, 156–162, 2005.

DUCKETT, S. Teratogenesis caused by tellurium. *Ann N Y Acad Sci* 192, 220-226, 1972.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene- environment interactions. *Mutagenesis* 23, 191-205, 2008.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70–77, 1959.

ENGMAN, L.; AL- MAHARIC, N.; MCNAUGHTON, M.; BIRMINGHAM, A.; POWIS, G. Thioredoxin Reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells. *Bioorg Medic Chem* 11, 5091-5100, 2003a.

ENGMAN, L.; AL-MAHARIK, N.; MCNAUGHTON, M.; BIRMINGHAM, A.; POWIS, G. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium antioxidants. *Anticancer Drugs* 14, 153-61, 2003b.

ENGMAN, L.; COTGREAVE, I.; ANGULO, M.; TAYLOR, C.W.; PAINE-MURRIETA, G.D.; POWIS, G. Diaryl chalcogenides as selective inhibitors of thioredoxin reductase and potential antitumor agents. *Anticancer res* 17, 4599-4605, 1997.

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

ENGMAN, L.; PERSON, J.; VESSMAN, K.; EKSTROM, M.; BERGLUND, M.; ANDERSSON, C.M. Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. *Free Rad Biol Med* 19, 441–452, 1995.

ENGMAN, L.; STERN, D.; COTGREAVE, I.; ANDERSSON, C.M. Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a ¹H NMR method. *J Am Chem Soc* 114, 9737–9743, 1992.

ENGMAN, L.; STERN, D.; PELCMAN, M. Thiol peroxidase-activity of diorganyl tellurides. *J Org Chem.* 59,1973–1979, 1994.

FAIRHILL, L. T. Tellurium. In: industrial toxicology. *Hafner Publishing Co, New York* 1969.

FARBER, J.L.; KYLE, M.E.; COLEMANN, J.B. Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* 62, 670-678, 1990.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600, 58-66, 2006.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2, 1084-1104, 2007.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique *Mutat Res* 455, 81-95, 2000.

FLOHÉ, L.; HARRIS, J. R. Peroxiredoxin Systems: Structures and Functions Springer., 44, 407, 2007.

FRANCO, J.L.; BRAGA, H.C.; STRINGARI, J.; MISSAU, F.C.; POSSER, T.; MENDES, B. G.; LEAL, R.B.; SANTOS, A.R.S.; DAFRE, A.L.; PIZZOLATTI, M. G.; FARINA, M. Mercurial-Induced Hydrogen Peroxide Generation in Mouse Brain Mitochondria: Protective Effects of Quercetin. *Chem Res Toxicol* 20, 1919–1926, 2007.

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. *Br J Dermatol* 160, 403-408, 2009.

FUNCHAL, C.; CARVALHO, C.A.S.; GEMELLI, T.; CENTENO, A.S.; GUERRA, R.B.; SALVADOR, M.; DANI, C.; COITINHO, A.; GOMEZ, R. Effect of Acute Administration of 3-Butyl-1-Phenyl-2 (Phenyltelluro)Oct-En-1-One on Oxidative Stress in Cerebral Cortex, Hippocampus, and Cerebellum of Rats. *Cell Mol Neurobiol* 30:1135–1142, 2010.

GAY, C.A.; GERBICKI, J.M. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. *Anal Biochem* 304, 42-46, 2002.

GOODRUM, J.F. Role of organotellurium species in tellurium neuropathy. *Neurochem Res* 10, 1313-1319, 1998.

GRAF, E.; MAHONEY, J.R.; BRYANT, R.G.; EATON, J.W. Iron catalyzed hydroxyl radical formation: Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.* 259, 3620-3624, 1984.

GREEN, M.; HARWOOD, H.; BARROWMAN, C.; RAHMAN, P.; EGGEMAN, A.; FESTRY, F. A facile route to CdTe nanoparticles and their use in bio-labelling. *J Mater Chem* 17,1989-1994, 2007.

GROGAN, T.M.; FENOGLIO-RIESER, C.; ZEHEB, R.; BELAMMY, W.; FRUTIGER, Y.; VELA, E.; ESTERMEMAN, G.; MACDONALD, J.; RICHTER, L.; GALEGOS, A.; POWIS, G. Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. *Human Pathol* 31, 475-481, 2000.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59, 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. *Clerendon Press, New York*, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Met Enzimol* 186, 1-5, 1990.

HILBERT, J.; MOHSENIN, V. Adaptation of lung antioxidants to cigarette smoking in humans. *Chest* 110, 916-920, 1996.

HOLLEY, A.E.; CHEESEMAN, K.H. Measuring free radicals reactions in vivo. *British Med. Bull.* 49, 494-505, 1993.

HOLMGREN, A.; BJORNSTED, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 252, 199-208, 1995.

HULEA, S.A.; OLINESCU, R.; NITA, S.; CROCNAN, D.; KUMMEROW, A. Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case control study. *J Environ Pathol Tox Oncol* 14, 173-180, 1995.

JACOB, C.; ARTEEL, G.E.; KANDA, T.; ENGMAN, L.; SIES, H. Water soluble organotellurium compounds: catalytic protection against peroxyxynitrite and release of zinc from metallothionein. *Chem Res Toxicol.* 13, 3-9, 2000.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.* 9, 515-540, 1990.

JOSEPHY, P.D. Glutamate receptors in cortical plasticity: molecular and cellular biology. *Molecular Toxicology. Oxford University Press, New York*, 1997.

KANDA, T.; ENGMAN, L.; COTGREAVE, I.A.; POWIS, G. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. *J Org Chem* 64, 8161-8169, 1999.

KANSKI, J.; DRAKE, J.; AKSENOVA, M.; ENGMAN, L.; BUTTERFIELD, D.A. Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4(N,N-dimethylamino)benzenetellurenyl] propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. *Brain Res* 911, 12-21, 2001.

KIM, C.Y.; NAKAI, K.; KASANUMA, Y.; SATOH, H. Comparison of neurobehavioral changes in three inbred strains of mice prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 22, 397-403, 2000.

KLOTZ, L.O.; SIES, H. Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol Lett* 140-141, 125-132, 2003.

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* 13, 135-139, 2000.

KOVALEV, G.K. Determination of drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* by means of potassium tellurite. *Antibiotiki* 14, 323-325, 1969.

KRON, T.; HANSEN, C.; WERNER, E. Renal excretion of tellurium after peroral administration of tellurium in different forms to healthy human volunteers. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 5, 239-244, 1991.

LADEN, B.P.; PORTER, T.D. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J Lipid Res* 42, 235-240, 2001.

LARNER, A.J. Biological effects of tellurium: a review. *Trace Elem Electrolytes* 12, 26-31, 1995.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265, 1951

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte superoxide dismutase (hemocuprein). *J Biol Chem* 244, 6049-6055, 1969.

MEISTER, A.; TATE, S.S. Glutathione and Related γ -Glutamyl Compounds: Biosynthesis and Utilization. *Annu. Rev. Biochem.*, 45:559-604, 1976.

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. *Toxicol Lett* 143, 9-16, 2003.

MEOTTI, F.C.; STANGHERLIN, E.C.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ Res* 94, 276-282, 2004.

MINOTTI, G.; AUST, S.D. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids* 27, 219-226, 1992.

MISCHELL, B.B., SHINGI, S.M. Selected methods in cellular immunology. *W. H. Freeman Company*, New York, 1 - 469, 1980.

MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K.I.; MOHANA, H.; MUGESH, G. Horseradish compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 5334-5338, 2006.

MIZUNO, R. Electron microscopic study on the cerebral cortex of rabbits intoxicated with tellurium. *Yokohama Med J* 20, 101-121, 1969.

MOLDEUS, P.; COTGREAVE, I.A.; BERGGREN, M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 50, 31-42, 1986.

MORETTO, M.B.; ROSSATO, J.I.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Ebselen and diorganochalcogenides inhibition of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into brain synaptosomes is voltage-dependent. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17, 154–160, 2003.

MORGAN, D.L.; SHINES, C.L.; JETER, S.P.; BLAZKA, M.E.; ELWELL, M.R.; WILSON, R.E.; WARD, S.M.; PRICE, H.C.; MOSKOWITZ, P.D. Comparative pulmonary absorption, distribution, and toxicity of copper gallium diselenide, copper indium diselenide, and cadmium telluride in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 147, 399-410, 1997.

MÜLLER, R.; ZSCHIESCHE, W.; STEFFEN, H.M.; SCHALLER, K.H. Tellurium-intoxication 67, 1152-1155, 1989.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. *Food Sci. Nutr.* 29, 273-300, 1990.

NEWMAN, R.A.; OSBORN, S.; SIDDIK, Z.H. Determination of tellurium in biological fluids by means of electrothermal vapourization-inductively coupled to plasma mass spectrometry (ETV-ICP-MS). *Clin Chim Acta* 179, 191-196, 1989.

NOGUEIRA, C.W.; ROTTA, L.N.; ZENI, G.; SOUZA, D.O.; ROCHA, J.B.T. Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* 27, 283–288, 2002.

NOGUEIRA, C.W.; SOARES, F.A.; NASCIMENTO, P.C.; MULLER, D.; ROCHA, J.B.T. 2,3 dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury and cadmium induced inhibition of δ -aminolevulinatase. *Toxicology* 84, 85–95, 2003.

NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organo-tellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev.* 104, 6255–6285, 2004.

NYSKA, A.; WANER, T.; PIRAK, M.; ALBECK, M.; SREDNI, B. Toxicity study in rats of a tellurium based immunomodulating drug, AS-101: a potential drug for AIDS and cancer patients. *Arch Toxicol* 63, 386-393, 1989.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358, 1979.

OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1, 23-29, 2006.

PESSOTO, F.S.; FARIA, P.A.; CUNHA, R.L.O.R.; COMASSETO, J.V.; RODRIGUES, T.; NANTES, I.L. Organotellurane-promoted mitochondrial permeability transition concomitant with membrane lipid protection against oxidation. *Chem Res Toxicol* 20, 1453–1461, 2007.

PETRAGNANI, N. In: comprehensive Organometallic Chemistry II (Ed. A. Mckillop), vol. LI, *Pergamon Press*, Exeter, UK, 1995.

PINTON, S.; LUCHESE, C.; STANGHERLIN, E.C.; NOGUEIRA, C.W. Acute exposure to diphenyl ditelluride causes oxidative damage in rat lungs. *Ecotoxicol Environ Saf.* xx: xx-xx, 2010b.

PINTON, S.; LUCHESE, C.; STANGHERLIN, E.C.; ROMANA, S.S.; NOGUEIRA, C.W. Diphenyl Ditelluride Induces Neurotoxicity and Impairment of Developmental Behavioral in Rat Pups. *J. Braz. Chem. Soc.* 21, 2130-2137, 2010a.

REN, X.J.; XUE, Y.; LIU, J.Q.; ZHANG, K.; ZHENG, J.; LUO, G.; GUO, C.H.; MU, Y.; SHEN, J.C. A novel cyclodextrin-derived tellurium compound with glutathione peroxidase activity *Chembiochem* 3, 356-363, 2002.

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

RITTER, C.; ANDRADES, M.E.; REINKE, A.; MENNA-BARRETO, S.; MOREIRA, J.C.F.; DAL-PIZZOL, F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit. Care Med.* 32, 342-349, 2004.

ROOSEBOOM, M.; VERMEULEN, N.P.E.; DURGUT, F.; COMMANDEUR, J.N.M. Comparative study on the bioactivation mechanisms and cytotoxicity of Te- Phenyl-L-tellurocysteine, Se-Phenyl-L-selenocysteine and S-Phenyl-L- cysteine. *Chem Res Toxicol* 15, 1610-1618, 2002.

ROSA, R.M.; HOCH, N.C.; FURTADO, G.V.; SAFFIA, J.; HENRIQUES, J.A.P. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. *Mutat Res* 633, 35-45, 2007.

ROZELL, B.; HANSSON, H.A.; LUTHMAN, M.; HOLMGREN, A. Immunohistochemical localization of thioredoxin and thioredoxin reductase in adult rats. *Eur J Cell Biol* 38, 79 - 86, 1985.

SAEZ, G.T.; BANNISTER, W.H.; BANNISTER, J.V. Free radicals and thiol compounds the role of glutathione against free radical toxicity. In: Vina, J. (Ed.), *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 237-254, 1990.

SAILER, B.L.; LILES, N.; DICKERSON, S.; CHASTEEN, T.G. Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Arch of Toxicol* 77, 30-36, 2003.

SAILER, B.L.; LILES, N.; 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* 18, 475-482, 2004.

SANTOS, D.B.; SCHIAR, V.P.P.; PAIXÃO, M.W.; MEINERZ, D.F.; NOGUEIRA, C.W.; ASCHNER, M.; ROCHA, J.B.T.; BARBOSA, N.B.V. Hemolytic and genotoxic evaluation of organochalcogens in human blood cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 23, 1195-1204, 2009b.

SANTOS, D.B.; SCHIAR, V.P.P.; RIBEIRO, M.C.P.; SCHWAB, R.S.; MEINERZ, D.F.; ALLEBRANDT, J.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.; ASCHNER, M.; BARBOSA, N.B.V. Genotoxicity of organoselenium compounds in human leukocytes in vitro. *Mutat Res* 676, 21–26, 2009a.

SAVEGNAGO, L.; BORGES, V.C.; ALVES, D.; JESSE, C.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Evaluation of antioxidant activity and potential toxicity of 1-uthyltelurenyl-2-methylthioheptene. *Life Sciences* 79, 1546–1552, 2006.

SCANSETTI, G. Exposure to metals that have recently come into use. *Science Total Environ* 120, 85-91, 1992.

SCHIAR, V.P.P.; DOS SANTOS, D.B.; PAIXÃO, M.W.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.; 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.* 177, 28-33, 2009.

SCHIAR, V.P.P.; DOS SANTOS, D.B.; LUDTKE, D.S.; VARGAS, F.; PAIXAO, M.W.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes *Toxicology in vitro* 21, 139-145, 2007.

SHAPOSHNIKOV, S.A.; SALENKO, V.B.; BRUNBORG, G.; NYGREN, J.; COLLINS, A.R. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments? *Electrophoresis* 29, 3005- 3012, 2008.

SHIGEOKA, S.; ONISHI, T.; NAKANO, Y.; KITAOKA, S. Purification and properties of glutathione reductase in *Euglena gracilis* Z. *Biochem. J.* 242, 511-515, 1987.

SIDDIK, Z.H.; NEWMAN, R.A. Use of platinum as a modifier in the sensitive detection of tellurium in biological samples. *Anal Biochem* 172, 90-196, 1988.

SIES, H. Strategies of antioxidants defenses. *Eur J Biochem* 215, 213-219, 1993.

SILIPRANDI, D.; SOTREY, D.T. Interaction of tellurite with the respiratory chain in rat liver mitochondria. *Febs Lett* 29, 101-104, 1973.

SLATER, T.F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 105, 283-293, 1984.

SREDNI, B.; CASPI, R.R.; KLEIN, A.; KALECHMAN, Y.; DANZIGER, Y.; BENYA'AKOV, M.; TAMARI, T.; SHALIT, F.; ALBECK, M. A new immunomodulating compound (AS-101) with potential therapeutic application. *Nature* 330, 173-176, 1987.

STANGHERLIN, E.C.; FAVERO, A.M.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. *Toxicology* 20, 561 568, 2005.

STEWART, N.G.; CROOKS, R.N. Long-range travel of the radioactive cloud from the accident at Windscale. *Nature* 182, 627-628, 1958.

TAYLOR, A. Biochemistry of tellurium. *Biol Trace Elem Res* 55, 231-239, 1996.

TIANO, L.; FEDELI, D.; SANTRONI, A.M.; VILLARINI, M.; ENGMAN, L.; FALCIONI, G. Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. *Mutat Res* 464, 269-277, 2000.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-221, 2000.

TICE, R.R.; STRAUSS, G.H. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13, 207-214, 1995.

TOEWS, A.D.; ECKERMANN, M.D.; ROBERSON, S.Y.; LEE, S.Y.; MORELL, P. Primary demyelination induced by exposure to tellurium alters mRNA levels for nerve growth factor receptor, SCIP, 2'3'-cyclic nucleotide 3'phosphodiesterase, and myelin proteolipid in rat sciatic nerve. *Mol. Brain Res.* 11, 321-325, 1991.

TOPTCHIEVA, A.; SISSON, G.; BRYDEN, L.J.; TAYLOR, D.E.; HOFFMAN, P.S. An inducible tellurite-resistance operon in *Proteus mirabilis*. *Microbiology* 149, 1285-1295, 2003.

TRETTNER, L.; RÉPÁSSY, R.; ADAM-VIZI, V. Endogenous glutamate contributes to the maintenance of glutathione level under oxidative stress in isolated nerve terminals. *Neurochemistry International*. 42, 393-400, 2003.

VAN VLEET, J.F. Amounts of twelve elements required to induce selenium-vitamin E deficiency in ducklings. *Am J Vet Res* 43, 851-857, 1982.

WAKEFORD, R. The Windscale reactor accident-50 years on *Journal of radiological protection* 27, 211-215, 2007.

WALTHER, U.I.; CZERMAK, A.; MUCKTER, H.; WALTHER, S.C.; FICHTL, B. Decreased GSSG reductase activity enhances cellular zinc toxicity in three human lung cell lines. *Arch Toxicol* 77, 131-137, 2003.

WANG, C.; MA, Q.; SU, X. Synthesis of CdTe nanocrystals with mercaptosuccinic acid as stabilizer. *J Nanosci Nanotechnol* 8, 4408-4414, 2008.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77, 325-333, 1981.

WHITE, A. R., BUSH, A. I., BEYREUTHER, K., MASTERS, C. L. e CAPPAL, R. Exacerbation of copper toxicity in primary neuronal cultures depleted of cellular glutathione. *J. Neurochem.* . 72: 2092-2098, 1999

WIESLANDER, E.; ENGMAN, L.; SVENSJO, E.; ERLANSSON, M.; JOHANSSON, U.; LINDEN, M.; ANDERSSON, C.M.; BRATTSAND, R. Antioxidative properties of

organotellurium compounds in cell system. *Biochemical Pharmacology* 55, 573–584, 1998.

YAREMA, M.C.; CURRY, S.C. Acute tellurium toxicity from ingestion of metal-oxidizing solutions. *Pediatrics* 116, 319-321, 2005.

YOUNG, V.R.; NAHAPETIAU, A.; JONGHORBONI, M. Selenium bioavailability with reference to human nutrition. *American J. Clin. Nutrion* 35, 1076-1088, 1981.

ZENI, G.; BRAGA, A.L.; STEFANI, H.Á. Palladium-catalyzed coupling of sp(2)-hybridized tellurides. *Accounts Chem Res.* 10, 731-738, 2003.

ZENI, G.; LUDTKE, D.; PANATIERI, R.B.; BRAGA, A.L. Vinylic tellurides: from preparation to their applicability in organic synthesis. *Chem. Rev.* 106, 1032–1076, 2006.

ZHANG, H.; SWIHART, M.T. Synthesis of tellurium dioxide nanoparticles by spray purolsis. *Chem Mater* 19, 1290-1301, 2007.