

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

**AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DE FÍGADO,
RIM, PULMÃO E CÉREBRO DE CAMUNDONGOS
EXPOSTOS AO COMPOSTO DITELURETO DE
DIFENILA**

TESE DE DOUTORADO

Sônia Cristina Almeida da Luz

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

**AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DE FÍGADO, RIM,
PULMÃO E CÉREBRO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO
COMPOSTO DITELURETO DE DIFENILA**

Sônia Cristina Almeida da Luz

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nilda Berenice de Vargas Barbosa
Co-Orientador: Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Luz, Sônia Cristina Almeida da
Avaliação anatomopatológica de fígado, rim, pulmão e cérebro de camundongos expostos ao composto ditelureto de difenila / Sônia Cristina Almeida da Luz.-2014.
97 p.; 30cm

Orientadora: Nilda Berenice de Vargas Barbosa
Coorientador: João Batista Teixeira da Rocha
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2014

1. Ditelureto de difenila 2. Histologia 3. Fígado 4. Rim 5. Pulmão. Cérebro I. Barbosa, Nilda Berenice de Vargas II. Rocha, João Batista Teixeira da III. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Sônia Cristina Almeida da Luz. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: sonia.daluz@yahoo.com.br

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DE FÍGADO, RIM, PULMÃO E
CÉREBRO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO COMPOSTO
DITELURETO DE DIFENILA**

elaborada por
Sônia Cristina Almeida da Luz

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Nilda Berenice de Vargas Barbosa, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

João Batista Teixeira da Rocha, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra. (UFSM)

Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM)

Simone Pinton, Dra. (UNIPAMPA)

Daniel Henrique Roos, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 29 de agosto de 2014.

Dedico esta tese ao meu esposo e meu ex professor de Histologia, Neucyr Estevan Peralta de Andrade e também à nossa filha Lívia Almeida de Andrade com a esperança de ter correspondido ao que esperam de mim. Conscientemente, sacrifiquei por este trabalho acadêmico o tempo que poderia ter dedicado a vocês, mas creio que foi por uma boa causa. “A Ciência e a Medicina, em particular, precisam de quem por elas se dedique, sem reservas, ao modo de sacerdotes laicos, consagrados à investigação, ao desenvolvimento de novas tecnologias a serem utilizadas no diagnóstico e na cura dos que sofrem.”

Autor desconhecido).

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta tese foi utilizar tão poucas palavras para agradecer as pessoas que fizeram parte desta minha trajetória. Embora uma tese seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há tributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

Início os agradecimentos pelos meus pais Walter Pereira da Luz (*in memorian*) e Diomar Francisca Almeida da Luz (*in memorian*) que além de conduzirem meus primeiros passos proveram o suporte para minha vida acadêmica. O meu obrigado também aos meus irmãos Sérgio, Sandra (*in memorian*), Rogério e Sandro (*in memorian*).

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Nilda Berenice de Vargas Barbosa pela competência científica, acompanhamento e confiança nas minhas “idéias inovadoras”.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha pela competência científica e por fazer-me acreditar que o meu trabalho de médica patologista seria importante e bem-vindo junto ao seu Programa de Pós-Graduação.

Agradeço aos demais professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que direta ou indiretamente contribuíram com meu trabalho, com especial deferência ao Prof. Félix Antunes Soares e Prof^a. Maria Ester Pereira por acreditarem no Laboratório de Histologia e fazer dele uma realidade.

Ao Departamento de Patologia da UFSM, onde sou lotada, na pessoa da Prof^a. Dr^a. Cristiane Cademartori Danesi e secretários Ivone Giacomini e Emerson Martins.

Ao corpo de trabalho do Serviço de Patologia do HUSM, pelo incentivo e ajuda técnica vai meu agradecimento às médicas Nara Maria Beck Martins, Marta Rocha e Melissa Falster Daubermann. Também aos técnicos de laboratório Ailton Pinto de Quadros, Cláudia Bertonchelli, Marisa Brondani, Eduardo Ramos dos Reis, Alencar Bertoldo, Sérgio Ribeiro e Sérgio Silveira. Aos técnicos da macroscopia Jorge Vieira e Josias Stefanello e aos amigos da Secretaria Ivete Dal’Acqua, Neri Balen e Elvandar Guimarães.

Agradeço de maneira especial a dois grandes incentivadores, os quais por parceria e amizade, marcaram importante presença durante meu trabalho de pós graduação, Gustavo Roberto Thomé e Jessié Gutierres.

Agradeço aos meus filhos do coração, Hélio Ribas de Andrade e Luciane Ribas de Andrade e suas respectivas famílias.

À minha secretária Josimara Girardi, por tão importante trabalho de bastidores.

Estendo meus agradecimentos a todos os integrantes do Lab 3239 que comigo conviveram e juntos compartilhamos momentos de alegria e também de grande tristeza e perdas. Inicio pela chefe Nilda Barbosa, Angélica Ramos, Sandra Pavin, Alessandro Prestes, Matheus dos Santos, Glaecir Dias, Jéssie Sudati, Daniel Roos, Alcindo Busanelo, Assis Ecker, Tailana Millitz, Gabriel de Macedo, Victor Pimentel, Jeandre Jacques e *in memoriam* aos queridos e inesquecíveis Franciele Vieira, Kelli Azzolin e Rafael Ferreira.

Agradeço à vida por poder citar todas estas pessoas neste momento tão importante e por colocá-las tão caprichosamente no meu caminho.

Meu reconhecimento a todos.

"Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo, é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda."

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DE FÍGADO, RIM, PULMÃO E CÉREBRO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO COMPOSTO DITELURETO DE DIFENILA

AUTORA: SÔNIA CRISTINA ALMEIDA DA LUZ
ORIENTADORA: NILDA BERENICE DE VARGAS BARBOSA
Co-Orientador: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA
Local e data da defesa: Santa Maria, 29 de agosto de 2014.

O ditelureto de difenila (PhTe)₂ é um composto orgânico de telúrio amplamente usado na indústria, como na produção industrial de borracha, aço e vidro, indústria de nanopartículas, painéis solares, semicondutores bem como intermediário em reações de síntese orgânica. Vários estudos têm demonstrado que esse composto causa diversos efeitos tóxicos em diferentes tecidos. Dentre esses, destacam-se os teratogênicos, os genotóxicos e os neurotóxicos. Embora os mecanismos de ação envolvidos na citotoxicidade mediada pelo composto não se encontrem totalmente esclarecidos, sua atividade pró-oxidante está diretamente ligada a sua toxicologia. Inibição de enzimas sulfidrílicas e antioxidantes, depleção de tióis e peroxidação lipídica são alterações bioquímicas encontradas em tecidos como sangue, cérebro, fígado e rim de animais expostos ao composto. Por outro lado, são raros na literatura estudos histopatológicos mostrando os efeitos da exposição ao (PhTe)₂ em órgãos específicos. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar a avaliação anatomopatológica de cérebro, rim, fígado e pulmão de camundongos expostos, via subcutânea, de forma aguda (1 dose de 250 $\mu\text{mol/kg}$) e subcrônica (doses de 10 e 50 $\mu\text{mol/kg}$ por 7 e 14 dias) ao composto. As análises histológicas revelaram que os hepatócitos dos animais expostos subcronicamente a ambas as doses do composto desenvolveram extensa vacuolização do citoplasma ou degeneração hidrópica e núcleos hiper cromáticos. A exposição subcrônica a 50 $\mu\text{mol/kg}$ também induziu hepatite focal e não específica, e necrose focal. Esteatose hepática foi verificada nos animais agudamente expostos ao composto. Em rim, a intoxicação aguda e subcrônica com (PhTe)₂ provocou degeneração vacuolar ou degeneração hidrópica, atrofia e hipertrofia de túbulos renais, formação de moldes (*casts*) hialinos e necrose tubular aguda. Edema e congestão vascular foram encontrados nos pulmões dos animais expostos a 50 $\mu\text{mol/kg}$ de (PhTe)₂. A análise histológica do tecido cerebral revelou que a exposição aguda e subcrônica ao (PhTe)₂ induziu alterações neurodegenerativas (vacuolização do neurópilo, status spongiosus) na região do tálamo e hipocampo. A presença de picnose nuclear de neurônios, a perda de viabilidade neuronal e foram particularmente observados no na camada granular do hipocampo. Adicionalmente, através de técnica imunoistoquímica, foram identificadas reação glial e perda de atividade pré-sináptica na região do tálamo e córtex, correspondentes às áreas de alteração espongiiforme. Nossos achados sugerem que a exposição ao (PhTe)₂, por via subcutânea, provoca severas alterações morfológicas em fígado, rim, pulmão e cérebro. Os dados obtidos contribuirão de forma significativa para aumentar o conhecimento sobre a toxicologia do composto (PhTe)₂, uma vez que, este é o primeiro trabalho que avalia a histologia de tecidos de vários órgãos após a intoxicação com o composto.

Palavras-chave: Ditelureto de difenila. Histologia. Fígado. Rim. Pulmão. Cérebro.

ABSTRACT

Doctor's Thesis
Graduate Program in Biological Sciences: Biochemical Toxicology
Federal University of Santa Maria

ANATOMOPATHOLOGICAL EVALUATION OF LIVER, KIDNEY, LUNG AND BRAIN OF MICE EXPOSED TO DIPHENYL DITELLURIDE

Author: SÔNIA CRISTINA ALMEIDA DA LUZ
Advisor: NILDA BERENICE DE VARGAS BARBOSA
Co-Advisor: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA
Place and date of defense: Santa Maria, August 29, 2014.

Diphenyl ditelluride (PhTe)₂ is an organic tellurium compound widely used as an intermediate in organic synthesis reactions and in the industry. Several studies have shown that this compound causes various toxic effects in different tissues. Particularly notable are teratogenic, genotoxic and neurotoxic effects. Although the mechanisms involved in cytotoxicity mediated by the compound are not fully understood, its pro-oxidant activity is directly related to its toxicology. Inhibition of sulfhydryl enzyme and antioxidant, thiol depletion, and lipid peroxidation are biochemical changes found in tissues such as blood, brain, liver and kidney of animals exposed to the compound. On the other hand, there are few histopathological studies showing the effects of exposure to (PhTe)₂ in specific organs. Thus, the present study aimed to carry out the anatomopathological evaluation of the brain, kidney, liver and lung of mice exposed subcutaneously acutely (1 dose of 250 µmol/kg) and subchronically (doses 10 and 50 µmol/kg for 7 and 14 days) to the compound. Histological analysis showed that the hepatocytes of animals exposed subchronically to both doses of the compound developed extensive vacuolization of the cytoplasm or hydropic degeneration and hyperchromatic nuclei. Subchronic exposure to 50µmol/kg has also induced nonspecific focal hepatitis and focal necrosis. Hepatic steatosis was observed in animals acutely exposed to the compound. In the kidney, acute and/or subchronic intoxication with (PhTe)₂ caused vacuolar degeneration or hydropic degeneration, atrophy and hypertrophy of renal tubules, forming hyaline casts and acute tubular necrosis. Pulmonar edema and vascular congestion were found in the lungs of animals exposed to (PhTe)₂ 50µmol/kg. Histological analysis of brain tissue revealed that acute and subchronic exposure to (PhTe)₂ induced neurodegenerative disorders (neuropil vacuolation, status spongiosus) in the hippocampus and thalamus. The presence of neuronal nuclear pyknosis, the loss of neuronal viability and neuronal death were observed particularly in the hippocampus. Additionally, through immunohistochemistry, we identified glial reaction and loss of pre-synaptic activity in the thalamus and cortex, corresponding to areas of spongiform change. Our findings suggest that exposure to (PhTe)₂, subcutaneously causes severe morphological changes in liver, kidney, lung and brain. The data obtained will contribute significantly to increase the knowledge on the toxicology of the compound (PhTe)₂, since this is the first work that evaluates the histology of tissues of various organs after intoxication with the compound.

Keywords: Diphenyl ditelluride. Histology. Liver. Kidney. Lung. Brain.

LISTA DE ABREVIATURAS

(AgAuTe₄)	– Sylvanita
(AuTe₂)	– Calaverita
(AuTe₂)	– Krennerita
(PhTe)₂	– Ditelureto de difenila
(Te₀)	– Telúrio elementar
2-TeCD	– Ditelureto de dicyclodextrinyl
ALT	– Alanina aminotransferase
AS-101	– Telurato de tricloro-amônio dioxoetileno- O,O'
AST	– Aspartato aminotransferase
ATP	– Adenosina trifosfato
DNA	– Ácido Desoxirribonucleico
EROs	– Espécies Reativas de Oxigênio
FIs	– Filamentos intermediários
GFAP	– Proteína glial fibrilar ácida
GPx	– Glutaciona Peroxidase
GSH	– Glutaciona Reduzida
GSSH	– Glutaciona Oxidada
H&E	– Hematoxilina e eosina
Na(+), K(+)-ATPase	– enzima sódio potássio ATPase
NTA	– Necrose tubular aguda
Raio UV	– Raio Ultravioleta
RT-01	– Composto orgânico de Telúrio
Se	– Selênio
SNC	– Sistema Nervoso Central
SNP	– Sistema nervoso Periférico
TBARS	– Espécies reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
Te	– Telúrio
Trx	– Tiorredoxina
TrxR	– Tiorredoxina Reduzida
δ-ALA-D	– δ-Aminolevulinato desidratase

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Telúrio	14
1.2 Farmacologia dos compostos orgânicos de Telúrio.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 TOXICOLOGIA DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS Te	19
4 DITELURETO DE DIFENILA	20
5 PATOLOGIA CELULAR DOS ÓRGÃOS ASSOCIADAS A AGENTES INTOXICANTES.....	23
5.1 Alterações morfológicas causadas por fármacos no cérebro	23
5.1.1 Reações dos neurônios e neurópilo	23
5.1.2 Reações dos astrócitos	24
5.1.3 Reações de oligodendrócitos	25
5.1.4 Reações da micróglia	25
5.2 Alterações morfológicas causadas por fármacos no fígado.....	25
5.3 Alterações morfológicas causadas por fármacos no rim.....	27
5.4 Alterações morfológicas causadas por drogas no pulmão.....	28
6 RESULTADOS.....	30
6.1 Manuscrito 1	30
Diphenyl ditelluride intoxication triggers histological changes in liver, kidney and lung of mice.....	30
Abstract.....	31
Introduction	33
Material and methods.....	34
Results	37
Discussion.....	40
References.....	45
6.2 Manuscrito 2	61
A intoxicação pelo ditelureto de difenila induz alterações histológicas em cérebro de camundongos.....	61
Abstract.....	63
Material and Methods.....	64

Results	68
7 DISCUSSÃO	78
8 CONCLUSÕES	84
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	85
REFERÊNCIAS.....	87

APRESENTAÇÃO

Os resultados dessa tese estão apresentados sob a forma de artigos que se encontram no item “**MANUSCRITOS**”. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados demonstrados nos artigos constituintes deste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta tese.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Telúrio

O telúrio (Te) é um raro metalóide que tem sido considerado como tóxico e elemento traço não essencial. Pertence ao grupo 16 da tabela periódica, os calcogênios, assim como o enxofre e o selênio. Foi descoberto por Franz Joseph Müller Von Reichstein in 1782 em minas de ouro na Romênia e em 1798 isolado e nomeado por Klaproth em homenagem à deusa da Terra (*tellus* = terra) (DITTMER, 2003).

O Selênio (Se) e o Te apresentam configurações eletrônicas semelhantes, e portanto compartilham algumas propriedades químicas. Entretanto o Te, ao contrário do Se, é um elemento traço raro e não apresenta função fisiológica descrita até o momento (TAYLOR, 1996; NOGUEIRA et al., 2004). Sabe-se que o Te se encontra presente em plantas e microorganismos como bactérias, fungos e leveduras. No entanto, não há evidências que este elemento possua uma função biológica nas células animais (GERHARDSSON et al., 1986).

O Te tem importantes aplicações em muitos processos industriais; e muitos compostos inorgânicos de Te são usados na produção industrial de vidro, aço, borracha, cerâmica, na metalurgia e na indústria de semicondutores (GREEN et al., 2007). Além disso, este elemento é usado como aditivo anti-detonante na gasolina, na produção de explosivos, na indústria petroquímica (FAIRHILL, 1969), microships e discos de DVD regraváveis. Nas últimas décadas as propriedades eletrônicas do Te têm sido o arreio na criação de módulos fotovoltaicos (ULLAL & ROEDERN, 2007) e geradores termelétricos de alta eficiência (KRAEMER et al., 2011), aumentando o interesse pelo elemento. Assim, muitos relatos foram publicados ressaltando a disponibilidade e o impacto do uso do Te (CdTe and BiTe₃) neste campo (AMATYA and RAM, 2011; CANDELISE et al., 2012; GAULTOIS et al., 2013).

Dentre suas aplicações biológicas, cabe salientar a ação bactericida, fungicida e inseticida (KOMUTAKOVA, 2000; TOPCHIEVA, 2003; CASTRO, 2009).

Com relação aos compostos orgânicos de Te, é importante destacar o papel como reagentes na síntese orgânica (PETRAGNANI, STEFANI, 2007).

Em casos de intoxicação níveis elevados de Te têm sido encontrados em sangue, coração, pulmão, fígado, baço e ossos, sendo as mais altas concentrações teciduais detectadas em rins e o maior acúmulo em ossos. Além disso, existe evidências experimentais que o Te, atravessa a barreira hematoencefálica e a barreira placentária, podendo causar alterações no sistema nervoso central em mamíferos em fase de desenvolvimento, como hidrocefalia em fetos de ratos (STANGHERLIN et al., 2005).

A excreção do Te administrado parenteralmente, incluindo a via subcutânea é feita através da urina, enquanto que o Te ingerido por via oral é excretado principalmente nas fezes. Aproximadamente 0,1% do Te absorvido pode ser exalado como dimetil telureto o qual possui um forte odor gálico que representa um sinal clínico de intoxicação (GERHARDSSON et al., 1986).

Os efeitos do Te sobre o organismo humano começaram a ser investigados por Gmelin em 1824. No entanto, os primeiros relatos a respeito da toxicidade deste elemento aconteceram após o incidente em outubro de 1957, quando um reator incendiou na cidade de Windscale, atual Sellafield, na Inglaterra e liberou grande quantidade de material radioativo, incluindo Te 132 (WADERFORD, 2007; BERGAN et al., 2008).

Embora dados sobre a toxicologia do Te nos sistemas biológicos ainda sejam escassos na literatura, alguns estudos em mamíferos têm demonstrado os efeitos tóxicos do Te em tecidos como fígado, rim, cérebro e sangue (NOGUEIRA et al., 2004; KEALL et al., 1946; MEINERZ et al., 2011).

Estudos realizados em animais sobre os efeitos sistêmicos e agudos da exposição ao Te incluem apatia, perda de peso, anorexia, perda de pêlo e paralisia das patas traseiras, enquanto estudos relatando os efeitos sistêmicos crônicos são raros (TAKAHASHI, 1981; MÜLLER et al., 1989).

Em nível de sistema nervoso central, destaca-se a neuropatia periférica, caracterizada pela presença de desmielinização. Neste sentido, foi observado que o cérebro de animais intoxicados por Te desenvolve uma coloração cinza-escuro devido à inclusão de partículas escuras de Te e grânulos de lipofucsina no citoplasma dos neurônios. Dados sobre o metabolismo do Te são escassos e não estão bem esclarecidos. No entanto, é sugerido que os depósitos negros

encontrados no trato urinário, trato gastrointestinal, órgãos respiratórios e no sistema nervoso central contém Te reduzido ou Te elementar (DUCKETT, 1972).

Em outros órgãos, existem evidências que o Te pode causar degeneração gordurosa (esteatose) e necrose em fígado, alterações degenerativas e necróticas dos túbulos proximais e distais, oligúria e anúria em rim e necrose, edema e congestão em coração (FRIBERG, NORDBERG, VOUK, 1986).

A primeira classe de compostos orgânicos de Te foi sintetizado por Friedrich Wöhler em 1840, quando preparou teluretos de dialquilas. Posteriormente, um aumento no número destas classes de compostos passaram a ser sintetizados e investigados (ENGMAN, 1985). No entanto, após o ano de 1980 cresceu consideravelmente o interesse com relação à síntese e reatividade dos compostos orgânicos para estudos toxicológicos e farmacológicos. Recentemente, os compostos orgânicos de Te têm atraído especial interesse devido ao potencial antioxidante, demonstrado em alguns modelos experimentais (ÁVILA et al., 2010). A atividade antioxidante destes compostos tem sido associada principalmente às mudanças no estado de oxidação do átomo de Te (Te (II) Te (IV)) (ENGMAN et al., 1995; NOGUEIRA et al., 2004).

1.2 Farmacologia dos compostos orgânicos de Telúrio

Apesar do papel biológico do Te ser ainda pouco esclarecido, estudos têm evidenciado que alguns compostos orgânicos de Te exibem propriedades farmacológicas diversificadas e promissoras.

A atividade farmacológica para um composto orgânico de Te foi descrita pela primeira vez por Sredni, em 1987, quando demonstrou que o composto codificado como AS-101 (telurato de tricloro-amônio dioxoetileno-O,O'), exibia propriedades imunomoduladoras por aumentar os níveis de expressão do receptor de Interleucina-2 em linfócitos de murinos e humanos em cultura, assim como a produção de fator estimulador de colônias por esplenócitos de camundongos *in vitro* (SREDNI et al., 1987, 1988).

Desde então, estudos vêm demonstrado a atividade antitumoral deste composto (SREDNI et al., 1998) bem como resultados promissores para o

tratamento do Lúpus Eritematoso Sistêmico e outras doenças autoimunes (ALCOCER-VARELA et al., 1998; BLANK et al., 1990). Na década de 1990, Sredni e colaboradores estudaram a relação de citocinas *in vivo* e *in vitro* em pacientes com AIDS e câncer, quando paralelamente também foi demonstrado o mecanismo de ação modulador do organotelureto (SREDNI et al., 1990).

Em estudos mais recentes, Okun e colaboradores demonstraram que o AS-101 foi capaz de induzir a produção do fator neurotrófico glial de crescimento celular e recuperar cultura de células neuronais PC-12 em apoptose (OKUN et al., 2007). Paralelamente, no estudo em células cerebrais submetidas à isquemia por privação de glicose, o uso do AS-101 acusou atividade neuroprotetora (OKUN et al., 2007). Além disso, o composto AS-101, bem como, mais dois outros compostos orgânicos de Te, denominados como RF-07 e RF-03 demonstraram possuir atividade antiepiletogênica (PERSKE et al., 2008).

Adicionalmente, o composto de Te AS-101, em estudo *in vitro*, aplicado em modelo de encefalite autoimune experimental, o qual simula as alterações da Esclerose Múltipla, causou inibição e supressão de monócitos e infiltração de células T no sistema nervoso central (LEE et al., 2014; XIE et al., 2014).

Com relação ao papel de compostos de Te frente ao estresse oxidativo em 1998 Wieslander et al. (1998), evidenciaram, em estudos *in vitro*, que várias moléculas contendo Te foram efetivas em reduzir a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteger o tecido renal contra o dano oxidativo induzido por reoxigenação após anoxia. Os mesmos efeitos foram observados *in vivo* em um modelo de isquemia e reperfusão. O mecanismo sugerido com relação ao papel antioxidante de tais compostos foi associado, pelo menos em parte, com a atividade mimética à enzima glutathione peroxidase (WIESLANDER et al., 1998). De acordo com tais constatações, estudos recentes têm mostrado que o composto ditelureto de dicyclodextrinyl (2-TeCD) mimetiza a ação da enzima GPx. Além disso, dados recentes na literatura mostram que alguns diteluretos (ditelureto de difenila, dietil 2-fenil -2 teluriofenil vinilfosfonato, p,p'-dicloro ditelureto de difenila) apresentam atividade antioxidante *in vitro* (REN et al., 2002; HUANG et al., 2008, ÁVILA et al., 2006; PINTON et al., 2011).

Estudos recentes revelaram efeito antioxidante dos compostos teluroacetileno a-d *in vitro* (SOUZA et al., 2009) e 2-Phenylethynyl-butyltellurium na melhora do déficit de memória induzida pela escopolamina (SOUZA et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações anatomopatológicas em cérebro, rim, fígado e pulmão de camundongos após a exposição ao composto ditelureto de difenila (PhTe)₂.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar análise histopatológica em cérebro, fígado, rim e pulmão de camundongos após a exposição aguda e sub-crônica ao (PhTe)₂, com coloração Hematoxilina e Eosina (H&E);
- Realizar análise histopatológica em cérebro de camundongos após a exposição aguda e sub-crônica ao (PhTe)₂, a fim de identificar possíveis alterações na bainha de mielina e também avaliar a viabilidade de neurônios;
- Realizar análise histopatológica em cérebro de camundongos após a exposição ao (PhTe)₂, com marcação imunoistoquímica da GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida) para detectar a atividade das células gliais e da Sinaptofisina para avaliar a atividade sináptica;

3 TOXICOLOGIA DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE Te

Embora determinados compostos contendo Te exibam aplicações farmacológicas em alguns modelos experimentais, a maioria dos estudos com compostos orgânicos de Te estão voltados para a toxicologia dos mesmos. Os efeitos tóxicos associados aos compostos orgânicos de Te já foram evidenciados em vários tecidos, especialmente no sistema nervoso, onde induzem toxicidade aguda e/ ou crônica (DEUTICKE et al., 1992; TIANO et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2004). Como um importante mecanismo, tem sido postulado que a ação tóxica das formas de Te (orgânicas e inorgânicas) envolve principalmente seu potencial oxidante e a consequente oxidação de grupos tióis de moléculas biologicamente ativas (BLAIS et al., 1972; DEUTICKE et al., 1992; BARBOSA et al., 1998; MACIEL et al., 2003; BORGES et al., 2005).

A toxicidade hepática e renal dos compostos orgânicos de telúrio são bem relatadas na literatura. Níveis elevados das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), bem como alterações na excreção de uréia e creatinina são observados em animais expostos a compostos orgânicos de Te (MEOTTI et al., 2003; SAVEGNAGO et al., 2006).

Os compostos orgânicos de Te, assim como o Te elementar são altamente tóxicos para o sistema nervoso. A neurotoxicidade no caso do telúrio elementar tem sua ação ligada principalmente à inibição da esqualeno epoxidase, interferindo assim na síntese de colesterol e consequentemente na composição da bainha de mielina no sistema nervoso periférico (SNP) (WAGNER, 1995; GOODRUM, 1998, NOGUEIRA et al., 2004). No SNC, o rompimento da homeostasia do citoesqueleto é proposto como mecanismo da neurotoxicidade de compostos contendo Te (PESSOA-PUREUR, 2014).

4 DITELURETO DE DIFENILA

O ditelureto de difenila (PhTe_2) (fig 1) é um composto orgânico de Te simples, de peso molecular 409,2. É um importante intermediário em reações de síntese orgânica, em especial de drogas contendo Te (MUÑIZ et al., 2005) e é também usado em larga escala na indústria. A exposição ocupacional e ambiental a esta forma de Te impulsionaram, nas últimas décadas, estudos sobre a toxicologia do mesmo. Os mecanismos pelos quais ele induz toxicidade não estão totalmente esclarecidos, mas assim como para outras outras formas de télúrio parece envolver a oxidação dos grupos tióis (NOGUEIRA et al., 2004).

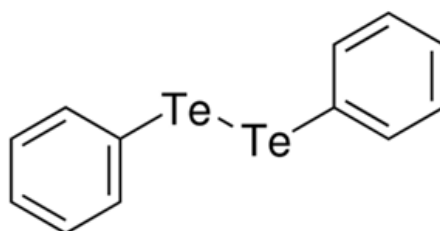


Figura 1 – Estrutura química do ditelureto de difenila.

Fonte: Adaptado de Royal Society of Chemistry (2014).

Em 1998, Barbosa e colaboradores observaram que o $(\text{PhTe})_2$ era capaz de inibir a enzima δ -ALA-D *in vitro* em sobrenadante de fígado (BARBOSA et al., 1998; MEOTTI et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2003). Isto impede a síntese do grupamento heme, citocromo e catalase e indica uma potente ação pró-oxidante. Além disso, o acúmulo do substrato da δ -ALA-D, o ácido aminolevulínico, está associado com eventos neurotóxicos (EMANUELLI et al., 2001; GONÇALVES et al., 2009).

Posteriormente, foi relatado que a exposição aguda ao $(\text{PhTe})_2$ também causava inibição da δ -ALA-D em fígado, rim, eritrócitos e cérebro de camundongos (MACIEL et al., 2000; MEOTTI et al., 2003). Em geral, baixas concentrações do composto já induzem toxicidade (MACIEL et al., 2000; MEOTTI et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2004).

O $(\text{PhTe})_2$ é considerado um potente agente neurotóxico (SOUSA et al., 2010; PINTON et al., 2010). Um dos possíveis mecanismos da neurotoxicidade mediada por este composto está ligado a sua atividade inibitória sobre a enzima Na^+ , K^+ ATPase, tanto *in vitro* como *in vivo* (BORGES et al., 2005). Esta enzima encontra-se presente na membrana celular e é responsável pelo transporte ativo de sódio e potássio nas células, especialmente nas células do SNC (JORGENSEN et al., 1986).

A enzima Na^+ , K^+ -ATPase cerebral é considerada um potencial alvo para os efeitos tóxicos do $(\text{PhTe})_2$ e sua inibição pode ocorrer por alteração dos seus grupos tióis (BORGES et al., 2005). Em 2012, Comparsi e colaboradores demonstraram que o $(\text{PhTe})_2$ induziu sinais de toxicidade (perda de peso e alteração de comportamento) e aumento na peroxidação lipídica em cérebro de camundongos adultos. Adicionalmente, o composto reduziu a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e tioredoxina redutase (TrxR) (COMPARSI et al., 2012).

Dados recentes também mostram que a exposição ao $(\text{PhTe})_2$ tanto *in vivo* como *in vitro* causa alterações no estado de fosforilação de filamentos intermediários de neurônios e células gliais (PESSOA-PUREUR et al., 2014). Tais alterações no citoesqueleto são consideradas marcadores importantes de morte apoptótica.

Os efeitos neurotóxicos associados ao $(\text{PhTe})_2$ variam de acordo com a região cerebral e o tipo celular. Em hipocampo, já foi evidenciado em astrócitos alterações no citoesqueleto representada por hiperfosforilação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), vimentina e subunidades de neurofilamentos (NF) (HEIMFARTH et al., 2011, 2012b). Além disso, o $(\text{PhTe})_2$ induziu alterações nas proteínas do citoesqueleto de neurônios e astrócitos no córtex cerebral (HEIMFARTH et al., 2012a). Rompimento da homeostasia do citoesqueleto, presença de astrogliose e morte celular por apoptose também já foram observadas no cerebelo (HEIMFARTH et al., 2013). No corpo estriado, o composto induziu neurodegeneração (HEIMFARTH et al., 2012b). Importante, os danos neuronais causados pela exposição ao composto, já foram avaliados histologicamente, e revelaram alterações no conteúdo de mielina (PINTON et al., 2010). Embora, a desmielinização no SNC após exposição ao $(\text{PhTe})_2$, seja um importante marcador de neurotoxicidade (PINTON et al., 2010); os mecanismos envolvidos na neurotoxicidade e neurodegeneração induzidos pelo $(\text{PhTe})_2$ são ainda pouco conhecidos.

Histologicamente, também já foi observada vacuolização do neurópilo em cérebro de camundongos tratados com $(\text{PhTe})_2$ (MACIEL et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2004). Além disso, a avaliação anatômica do cérebro dos fetos de camundongos fêmeas expostas ao $(\text{PhTe})_2$ no GD17 (dia de gestação) revelou uma diminuição do volume cerebral e hidrocefalia (STANGHERLIN et al., 2005).

Adicionalmente, o $(\text{PhTe})_2$ quando administrado a fêmeas prenhas foi teratogênico, alterou parâmetros de comportamento e causou estresse oxidativo em áreas cerebrais específicas (MORETTO et al., 2003; STANGHERLIN et al., 2005; ROMAN et al., 2007).

5 PATOLOGIA CELULAR DOS ÓRGÃOS ASSOCIADAS A AGENTES INTOXICANTES

5.1 Alterações morfológicas causadas por fármacos no cérebro

5.1.1 Reações dos neurônios e neurópilo

Os neurônios variam consideravelmente na estrutura e tamanho dentro do sistema nervoso. As especializações estruturais associadas com a função neural incluem aquelas relacionadas a transmissão sináptica bem como a diferenciação axonal e dendrítica. A resposta destas células à injúria inclui o mecanismo apoptótico. A apoptose neuronal tem importante papel na definição do número de neurônios, durante o desenvolvimento e também está presente em várias doenças, incluindo certas doenças neurodegenerativas (ROBBINS, KUMAR e COTRAN, 2010).

A lesão neuronal aguda (“red neurons”) refere-se ao espectro de alterações que acompanham hipóxia/isquemia no SNC e refletem morte celular (necrose ou apoptose). Os “red neurons” são vistos com hematoxilina eosina (H&E) 12 a 24 horas após um insulto hipoxico/isquêmico. As características morfológicas consistem de enrugamento do corpo celular, picnose nuclear, desaparecimento do nucléolo e perda da substância de Nissl, com intensa eosinofilia do citoplasma.

A lesão neuronal sub-aguda ou crônica (degeneração) refere-se a morte neuronal que ocorre como resultado de um processo de doença progressiva de alguma duração. A característica morfológica é a perda celular frequentemente envolvendo grupos de neurônios relacionados e gliose reativa. Quando o processo está em estágio inicial, a perda celular é difícil de ser detectada; a gliose reativa associada é o maior indicador de processo patológico (ROBBINS, KUMAR e COTRAN, 2010).

Alguns processos degenerativos do SNC estão associados com vacuolização do pericário e processos celulares no neurópilo. Alteração espongiiforme ou vacuolar

descreve o tecido que contém numerosos vacúolos redondos ou ovais, que medem em torno de 50 µm de diâmetro ao microscópio de luz (LAMPERT et al., 1972).

Estes vacúolos podem ser extracelulares ou intracelulares, frequentemente deslocando organelas como núcleo e mitocôndria. Vacúolos intramielínicos dentro da substância branca correspondem a divisão das camadas de mielina (MELOV et al., 1998). As alterações vacuolares também podem assumir a forma de microvacuolização, em que o neurópilo é interrompido por numerosos pequenos vacúolos de 2 a 10 µm de diâmetro (MASTERS et al., 1978), ou estatus esponjoso, onde cavidades irregulares aparecem rodeadas por uma malha de glia (MASTERS et al., 1978). Os vacúolos observados na degeneração esponjiforme são o resultado de um processo específico de doença e não somente do produto da perda celular.

5.1.2 Reações dos astrócitos

Os astrócitos possuem processos citoplasmáticos ramificados que se originam nos corpos celulares e contêm proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Essas células atuam como um tampão metabólico e detoxificante dentro do cérebro. Através desses processos, eles contribuem para a função de barreira, controlando o fluxo de macromoléculas entre o sangue, fluído cerebrospinal e o cérebro. Gliose (ou astrogliose) é o mais importante indicador histológico de lesão no SNC, independente da etiologia e é caracterizado por hipertrofia e hiperplasia. Nessa reação, o núcleo dos astrócitos é tipicamente redondo e oval, com cromatina pálida, nucléolo proeminente e com citoplasma escasso. Diante da lesão, o citoplasma se expande e assume brilho roseado, algumas vezes irregulares, núcleo excêntrico, numerosos processos ramificados, constituindo células chamadas astrócitos gemistocísticos (ROBBINS, KUMAR e COTRAN, 2010). Exame de imagem de células vivas revelou heterogeneidade na reação de astrócitos individuais, com um subgrupo fixo na sua morfologia inicial, outra dirigindo seus processos em direção à lesão e um distinto subgrupo localizado justavascular ao sítio da proliferação (BARDEHLE et al., 2013).

5.1.3 Reações de oligodendrócitos

Os processos citoplasmáticos oligodendrogliais envolvem os axônios e formam mielina. Os oligodendrócitos e epêndima não participam da resposta ativa na lesão do SNC e mostram poucas reações (RIVERA-ZENGOTITA e YACHNIS, 2012). No entanto, alguns oligodendrócitos são perdidos através de necrose ou apoptose, enquanto outros sobrevivem e podem formar parte da cicatriz glial com debris de mielina (FAWCETT & ASHER, 1999).

5.1.4 Reações da micróglia

Micróglia são células derivadas do mesoderma, cuja função principal é servir de macrófago fixo no SNC. Ela responde à injúria através de: proliferação; desenvolvimento de núcleo alongado, como na neurosífilis; formando agregados sobre pequenos focos de necrose (nódulos microgliais); ou reunindo-se ao redor de corpos celulares de neurônios em fase de morte (neuronofagia) (ROBBINS, KUMAR e COTRAN, 2010). A micróglia é extremamente sensível mesmo em pequenas alterações, com rápida resposta ao sinal inflamatório, destruição de agentes infecciosos e antes que o tecido nervoso sofra danos maiores (ZHANG et al., 2010).

A microgliose é temporária, permanecendo até um mês após o insulto, mesmo em casos de dano extremo (STREIT, WALTER e PENNELL, 1999).

5.2 Alterações morfológicas causadas por fármacos no fígado

O fígado é o principal órgão de metabolismo dos xenobióticos e onde ocorre extenso metabolismo aeróbico, levando a formação de EROs e com alta possibilidade de estresse oxidativo. A lesão hepática induzida por drogas inclui degeneração hidrópica, esteatose, hepatite, necrose.

A degeneração hidrópica ou vacuolar do hepatócito é o resultado da alteração da homeostase de íons e fluídos que levam a um aumento da água intracelular (ABDELHALIM, JARRAR, 2011).

No início o líquido se acumula no citoplasma, causando aumento de volume e aspecto de citoplasma diluído. A aparência histológica de edema celular é caracterizada por células alargadas, citoplasma pálido, núcleo em posição centralizada e tamanhos variados de vacúolos. Conforme o processo degenerativo progride, há formação de vacúolos com contornos imprecisos, deixando o citoplasma com aspecto rendilhado.

A esteatose hepática representa o acúmulo intracitoplasmático de triglicerídeos. No início, os hepatócitos apresentam pequenos vacúolos ao redor dos núcleos (esteatose microvesicular). Neste estágio as células hepáticas são preenchidas com múltiplas gotas de gordura que não deslocam o núcleo centralmente localizado. Em estágio mais tardio, o tamanho dos vacúolos aumenta, levando o núcleo para a periferia (esteatose macrovesicular). A esteatose macrovesicular é a forma mais comum e é tipicamente associada com álcool, corticosteróides, obesidade, diabetes e toxicidade (REDDY e RAO, 2006). Prejuízo ou inibição de moléculas receptoras que controlam as enzimas responsáveis pela oxidação e síntese de ácidos graxos parecem contribuir para o acúmulo de gordura. A esteatose é considerada reversível, principalmente se a causa for removida (MEDINA et al., 2004).

A hepatite aguda é o padrão mais comum de doença hepática induzida por fármacos e envolve a inflamação do tecido hepático, predominantemente por células mononucleares.

Pode ocorrer concomitantemente degeneração hidrópica, necrose e apoptose. Quando severa ocorre pontes de necrose (porto-portal, central-central, porto-central).

A patogênese da doença hepática induzida por droga usualmente envolve a participação de uma droga que provoque uma reação imune ou afete diretamente a bioquímica da célula. Em ambos os casos, a morte celular é o evento que leva a manifestação de hepatite (ZIMERMANN, 2000).

A lesão hepatocelular aguda pode resultar em necrose que pode ser definida como a ruptura da membrana citoplasmática e a consequente saída de material intracelular (KROEMER et al., 2009).

Afetando individualmente (necrose inconsistente) ou grupos de hepatócitos (necrose confluyente). Em alguns casos a necrose confluyente pode ser zonal. A necrose centrolobular (zona 3) consiste de morte celular irreversível dos hepatócitos centrolobulares e pode ser vista após anóxia ou exposição a agentes hepatotóxicos (GOPINATH, PRENTICE e LEWIS, 1987). Esta zona é particularmente vulnerável ao dano isquêmico devido ao baixo gradiente de oxigenação (COMPORTI, 1985).

Necrose pode ser isolada afetando zona 1 (periportal) ou zona 2 (mediozonal), a qual é vista como uma banda de células edemaciadas e eosinofílicas entre a zona 1 e zona 3 (WILSON et al., 1992). Apoptose pode acompanhar a necrose no fígado, especialmente em situações onde há efeito xenobiótico induzido (CULLEN, 2005; GREAVES et al., 2001).

Quando extensa, a necrose confluyente pode levar a falência hepática aguda. A observação histológica de necrose mostra que o citoplasma perde as afinidades tintoriais, tornando-se eosinófilo. A eosinofilia é devida a perda do RNA citoplasmático, e a afinidade da eosina à proteínas desnaturadas (a basofilia do citoplasma é dada pelo RNA. A alteração mais precoce da cromatina é a agregação junto à membrana nuclear. O núcleo diminui de tamanho, torna-se mais denso e com maior afinidade pela hematoxilina (picnose). A dissolução da cromatina leva ao processo de cariólise, provavelmente devido a ação de DNases lisossômicas. A fragmentação nuclear é denominada cariorexis (BUJA, 1993).

5.3 Alterações morfológicas causadas por fármacos no rim

A degeneração hidrópica envolve principalmente as células dos túbulos renais, que tornam-se edemaciadas e levemente coloridas. No citoplasma são observados vacúolos claros, que podem ser vacúolos de água ou representar retículo endoplasmático distendido. Pode haver aparência granular das células devido a presença de mitocôndria edemaciada. Devido ao edema das células, o lúmen dos túbulos renais pode ficar estreitado ou completamente obliterado. A patogenia deste processo deve-se ao desequilíbrio iônico entre sódio e potássio. O sódio fica retido intracelularmente, o que provoca a rápida entrada de água na célula e a retenção de potássio extracelularmente. Com a queda da bomba de Sódio e Potássio, a célula se

torna mais permeável, entra muita água da mitocôndria, aumentando seu tamanho e diminuindo o seu metabolismo e a produção de energia (ATP) (ROBBINS, KUMAR e COTRAN, 2010).

A necrose tubular aguda (NTA) é uma das principais causas de lesão aguda do rim. O processo envolve a morte das células epiteliais tubulares do rim acompanhada por oclusão do lúmen por moldes de proteínas (“casts”). Os moldes hialinos (“casts”) eosinofílicos consistem principalmente de proteína Tamm-Horsfall, uma glicoproteína secretada nas células da alça ascendente e túbulos coletores. Há necrose localizada das células tubulares com eosinofilia, ruptura focal ou perda da membrana basal. Nas células dos túbulos proximais pode haver viabilidade variável e não serem totalmente necróticas. A NTA tóxica é manifestada por dano tubular agudo, melhor observado nos túbulos contornados proximais (RACUSEN, 1998; GLYNNE, PICOT e EVANS, 2001).

A atrofia e hipertrofia tubulares devem-se à falência de néfrons (unidades funcionais do rim), infiltrado inflamatório crônico e fibrose intersticial. Os túbulos atróficos podem ser difíceis de identificar. Em alguns, há espessamento da membrana basal, o que ajuda a destacá-los do interstício. As áreas com atrofia tubular correspondem a néfrons que não funcionam mais. O processo atrófico pode ser devido a uma específica apoptose tubular (KUMAR et al., 2001). Os túbulos hipertróficos e dilatados representam hipertrofia compensatória dos néfrons remanescentes. Eles podem ser primariamente de origem proximal, mas podem ser de origem tubular distal (NÁDASDY, 1994). O resultado final é a insuficiência renal crônica. O infiltrado inflamatório crônico intersticial é inespecífico, podendo ser encontrado em atrofia renal de diversas origens.

5.4 Alterações morfológicas causadas por drogas no pulmão

No pulmão as células endoteliais são o sítio primário da lesão. O dano endotelial é o evento estrutural que resulta no aumento da permeabilidade capilar, dando origem ao edema no tecido pulmonar, que é o acúmulo de fluído nos espaços aéreos e parênquima do pulmão (WARE e MATHAY, 2005). A microscopia do

pulmão mostra espaços alveolares preenchidos com substância eosinofílica homogênea, que representa o fluido edematoso, que escoa da parede alveolar.

6 RESULTADOS

6.1 Manuscrito 1

Intoxicação por ditelureto de difenila provoca alterações histológicas no fígado, rim e pulmão de camundongos

Diphenyl ditelluride intoxication triggers histological changes in liver, kidney and lung of mice

Sônia Cristina Almeida da Luz, Melissa Falster Daubermann, Gustavo Roberto Thomé, Matheus Mülling dos Santos, João Batista Teixeira da Rocha and Nilda Vargas Barbosa.

Manuscrito submetido à revista Histology and Histopathology

Diphenyl Ditelluride Intoxication Triggers Histological Changes in Liver, Kidney and Lung Of Mice

Sônia Cristina Almeida da Luz¹, Melissa Falster Daubermann², Gustavo Roberto Thomé³, Matheus Mülling dos Santos³, João Batista Teixeira da Rocha^{3*} and Nilda Vargas Barbosa^{3*}.

¹Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Universitário – Prédio 20 Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

²Serviço de Patologia, Hospital Universitário de Santa Maria, Campus Universitário – Prédio 20 Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

³Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Universitário – Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

Text pages: 25

Tables: 0

Figures: 8

*

Corresponding author:

Dra. Nilda Vargas Barbosa and Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Tel: 55-55-3220-8140

Fax: 55-55-3220-8978

E-mail: nvbarbosa@yahoo.com.br/ jbtrocha@yahoo.com.br

Abstract

Tellurium is a rare element and non-essential trace element. Their inorganic compounds are used in industry and their organic compounds in the organic synthesis. The elemental tellurium, some of its inorganic and organic derivatives have been studied concerning to biological and toxicological effects. Considering the cellular toxicity of tellurium compounds, this work evaluated the effect of diphenyl ditelluride [(PhTe)₂] on the morphology of liver, kidney and lung. Adult mice were

exposed acute (a single dose at 250 μ mol/kg) and sub-chronically (one daily dose at 10 or 50 μ mol/kg for 7 or 14 days) to (PhTe)₂ via subcutaneous. After, the histological analysis of liver, kidney and lungs were performed. Hepatocytes of mice sub-chronically exposed to (PhTe)₂, presented cytoplasmic vacuolization, hydropic degeneration and hyperchromatic nuclei. Sub-chronic exposure to 50 μ mol/kg for 7 or 14 days (PhTe)₂ caused hepatic necrosis. Microvesicular and macrovesicular steatosis were identified in the liver of mice acutely exposed to (PhTe)₂. Acute and sub-chronic intoxication with (PhTe)₂ induced degenerative changes on epithelial cells of renal tubules as loss of brush border and cytoplasmic vacuolization. In several renal tubules, it was possible to observe atrophy and hypertrophy, cast proteinaceous formation and acute tubular necrosis. No morphological alteration was identified in the lungs of mice sub-chronically exposed to 10 μ mol/kg (PhTe)₂ for 7 and 14 days. Differently, the mice sub-chronically exposed at 50 μ mol/kg (PhTe)₂ developed intralveolar edema and vascular congestion in some areas of lungs. Acute exposure to (PhTe)₂ did not trigger significant changes in the lungs. Our data indicate that the compound (PhTe)₂ may be considered an inducing agent of morphologic changes in all tissue evaluated, but more markedly in liver and kidney than lung, which could lead to failure these organs.

Introduction

Tellurium (Te) is a rare metalloid, which has been regarded as a toxic and non-essential trace element. It may occur in the environment on elemental, inorganic and organic forms, being ordinarily obtained as by-product of copper refinement and/or combined with gold and other metals.^{1,2} Te has important applications in several industrial processes; and currently many inorganic Te compounds are used in rubber production, in glass and ceramics as a coloring agent, in metallurgy and in the industry of nanoparticulate semiconductors.³⁻⁵ Concerning organic Te compounds, it is important to highlight their role as reagent in organic synthesis.⁶

Although Te has been known to be present in plants and microorganisms as bacteria, fungi and yeast, there is no evidence that Te has a natural biological function in animal cells.⁷

The investigations regarding to the toxicology/pharmacology of Te is still limited in literature; however, the therapeutic and toxic role of Te compounds has received more attention in the last decades. With emphasis in toxicological properties, experimental studies have highlighted the detrimental effects of different Te compounds in several tissues including liver, kidney, skin and blood.⁸⁻¹⁰ Likewise, many Te compounds induce severe neurodegeneration, which is strongly associated with the demyelination processes via inhibition of enzyme squalene epoxidase.^{11,12} Of particular significance in terms of mechanisms, it has been postulated that the toxic action of Te forms (organic and inorganic) involve their oxidant potential and the consequent oxidation of thiol groups from molecules biologically active.¹³⁻¹⁷ In analogy, our research group has obtained evidence that the compound diphenyl ditelluride, an organotellurium used commonly as intermediate in organic synthesis,¹⁸

is cytotoxic to different cells types¹⁹⁻²⁶ and inhibits sulphhydryl enzymes activities *in vitro* and *in vivo* even in low concentrations.^{8,15} Moreover, diphenyl ditelluride exposure has been associated with teratogenic, mutagenic and genotoxic events.^{10,27,28}

Although a growing body of biochemical evidence shows the close relationship between diphenyl ditelluride intoxication and oxidative damage, there are few experimental works characterizing the putative histological changes triggered by the compound on specific organs. In this way, some studies have demonstrated that the exposure to certain Te compounds may induce morphologic alterations in tissues such as liver, thymus, bone marrow, heart, retina and kidney.²⁹⁻³² Specifically about diphenyl ditelluride; literature data show that rats exposed to this compound development an accentuated cerebral vacuolization.¹⁹ However, the effects of diphenyl ditelluride intoxication on liver, kidney and lung are still unknown. Thus, keeping in mind the diphenyl ditelluride toxicity and the scarcity of data on its action on the morphology of systemic tissues, the present work aimed to assess the histopathology of liver, kidney and lung of mice exposed acute and sub-chronically to diphenyl ditelluride.

Material and methods

Materials

The histological stain hematoxylin and eosin (H&E) was acquired from Renylab. Diphenyl ditelluride was synthesized using the method described by Petragani (1994).²⁰ Analysis of ¹H NMR and ¹³C NMR spectra showed that diphenyl ditelluride

presented analytical and spectroscopic data in full agreement with their assigned structures. The chemical purity of the compounds (99.9%) was determined by CGMS.

Animals

Adult Male Swiss albino mice (25-35g) (n= 30) from our own breeding colony were used. Animals were kept on a 12 h light/dark cycle, at a room maintained at constant temperature (22 ± 2 °C), with free access to food and water; and housed in solid plastic-bottomed cages. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, from the Federal University of Santa Maria, Brazil.

Experimental protocol

Treatment

The mice were acute and sub-chronically treated with different doses of diphenyl ditelluride. The animals were randomly divided into 2 experimental groups (n=5): (1) control and (2) diphenyl ditelluride groups. Diphenyl ditelluride groups were subcutaneously administered with the compound once a day at 10 and 50 $\mu\text{mol/kg}$ during 7 and 14 days and with 250 $\mu\text{mol/Kg}$ to 1 day. The compound was dissolved in DMSO and the control group was similarly treated with the vehicle (DMSO 1ml/kg). The choice of diphenyl ditelluride doses used in this protocol was based on a previous study, where the calculated LD50 for the compound in mice s.c. route was > 500 $\mu\text{mol/kg}$.³⁵

Tissue Preparation

After the end of each experimental period, the animals were euthanized by cervical dislocation. The organs designed to morphologic analysis (liver, kidney and lungs) were quickly removed, rinsed with saline solution (0.9%) and fixed in formalin 10%. The diagonal section of the liver and lung as well as the longitudinal section of the kidney were obtained and processed (Pathology laboratory- Pathology Department – Federal University of Santa Maria). The processed tissues were embedded in paraffin, sectioned at 4 µm thickness, and placed on frosted glass slides for further evaluation. The tissue macroscopic alterations were also analyzed.

Hematoxylin and Eosin staining (H&E)

After the assembly of glass slides, the samples were stained using hematoxylin and eosin (H&E) stains. Hematoxylin is a colouring that flushes cellular acid structures (nucleus) in dark blue. Eosin is a colouring that flushes cellular basic structures (cytoplasm) in pink (Gartner and Hiatt, 1999). Consequently, these stainings permit the analysis of changes linked to nucleus and cytoplasm as degenerative lesions and necrosis. After, the slides stained with H&E were submitted to histological assessment using a light microscopy coupled to photomicrography complex, both adapted to a microcomputer with *software* Honestech for image capture.

Periodic Acid-Schiff (PAS)

The PAS is a special stain used to stains basement membrane (normal and in tumors), glycogen, some mucins and mucosubstances such as glycoproteins. In the kidney changes in the tubulointerstitial compartment assessed by light microscopy such presence of tubular casts (Tamm-Horsfall casts)

After the fixation of sections in 10% formalina and paraffin sections at 5 um, the samples in glass slides, were stained using 0.5% Periodic Acid Solution (Periodic acid to 0.5 g and distilled water to 100 ml). The Schiff Reagent were used to 10 ml of 37% formalin into a watch glass. To this add a few drops of the Schiff reagent to be tested. A good Schiff reagent will rapidly turn a red-purple color. A deteriorating schiff reagent will give a delayed reaction and the color produced will be a deep blue-purple.

Results

Macroscopic analysis

In macroscopic examination, we observed that the internal structures of mice exposed to diphenyl ditelluride (independently of dose and period) developed a gray-black coloration. This effect was verified in kidneys, lungs, muscles and mucous (Figures 1A, 1B and 1C). No similar coloration was observed in the hepatic tissue.

Microscopic analysis

Hepatic tissue

Liver histopathological analysis showed that the hepatocytes of mice sub-chronically exposed to diphenyl ditelluride, at 10 $\mu\text{mol/kg}$ for 7 days, presented marked cytoplasmic vacuolation (vacuoles of different sizes), hydropic degeneration (intracellular edema) and hyperchromatic nuclei when compared to normal hepatic histology of control mice (Figure 2). The same morphological changes were found in liver of mice exposed for 14 days to diphenyl ditelluride (data not shown).

In addition to hydropic degeneration, sub-chronic exposure to 50 $\mu\text{mol/kg}$ diphenyl ditelluride for 7 days caused hepatic necrosis (Figure 3). The signs of necrosis were represented by presence of a sheet of hepatocytes with pyknotic nuclei and eosinophilic cytoplasm (Figure 3C). An aggregation of mononuclear cells in centrilobular (zone 3) and mediolobular areas (zone 2) were also found in the hepatic parenchyma (Figure 3D). Similar histological changes were identified in the livers of mice intoxicated with 50 $\mu\text{mol/kg}$ of diphenyl ditelluride for 14 days (data not shown).

Hystopathologic analysis revealed that the liver of mice acutely exposed to diphenyl ditelluride at 250 $\mu\text{mol/kg}$ developed microvesicular and macrovesicular steatosis (Figure 4). Microvesicular steatosis was characterized by presence of small vesicles filling the cytoplasm of the hepatocytes (foamy hepatocytes) and nucleus localized on the cell center while macrovesicular steatosis by large vacuoles apparently “without filling” and rounded by a clear outline (Figure 4B). The acute intoxication was also associated with a marked and focal dilatation of sinusoids, which was more prominent in the centrilobular (Zone 3) and mediolobular (Zone 2)

areas of the hepatic parenchyma (Figure 4C). In some areas were found mild venous congestion and hepatocytes with piknotic nucleus surrounding the congested area (Figure 4D). A disorganization of hepatic laminae was also observed in this group when compared to control.

Renal Tissue

The sub-chronic exposure to diphenyl ditelluride at 10 $\mu\text{mol/kg}$ for 7 days caused a prominent degeneration of epithelial cells lining the renal tubules (Figure 5). Degenerative processes were evidenced by presence of edema and epithelial cells with large vacuoles (Figure 5B and 5C). In several tubules, it was possible observe signals of acute tubular necrosis such as apparent loss of tubular epithelial cells specialization (brush border); presence of necrotic debris and necrotic epithelial cell free in the lumen (Figure 5C). Indeed, various renal tubules were filled with eosinophilic homogenous material (cast proteinaceous) and had a marked tubular hypertrophy (Figure 5C and 5D). Similar changes were identified in mice treated for 14 days (data not shown).

The sub-chronic exposure to diphenyl ditelluride at 50 μmol for 7 days induced degenerative changes in the lining epithelium of renal tubules; which had cytoplasmatic vacuoles and loss of brush border (Figure 6B). Some tubules also presented lumen filled with eosinophilic homogenous material, characterizing the cast proteinaceous formation (Figure 6C). Indeed, it was identified vascular congestion in cortical and medullar areas (Figure 6D). No additional alteration was observed in the kidney of mice sub-chronically exposed to diphenyl ditelluride at 50 $\mu\text{mol/kg}$ for 14 days (data not shown).

The histological analysis revealed that the renal tubules of mice acutely exposed to diphenyl ditelluride at 250 $\mu\text{mol/kg}$ contained epithelial cells free in the lumen and presented different stages of compression (Figure 7C). It was also observed the presence of hypertrophic tubules filled with cast proteinaceous and tubules containing a single layer of epithelial cells and small vacuoles (Figure 7C and 7D). The occurrence of casts within the hypertrophic tubules was confirmed by PAS (Periodic Acid Schiffer) staining (Figure 7E).

Pulmonary Tissue

No morphological alteration was observed in the pulmonary tissue of mice sub-chronically exposed to 10 $\mu\text{mol/kg}$ diphenyl ditelluride for 7 and 14 days when compared with the control group (data not shown).

The lung histopathology revealed that sub-chronic exposure to 50 $\mu\text{mol/kg}$ diphenyl ditelluride for 7 days was accomplished by development of edema intra alveolar and vascular congestion in some areas (Figure 8B). Similar tissue changes were observed in the lung of mice exposed to 50 $\mu\text{mol/kg}$ diphenyl ditelluride for 14 days (data not shown). The acute exposure to diphenyl ditelluride at 250 $\mu\text{mol/kg}$ did not cause changes in alveolar morphology (data not shown).

Discussion

Although Te compounds have been widely studied given their toxicity, there are few data in the literature on the detrimental effects of Te intoxication in the

microscopic anatomy of tissues. Regarding diphenyl ditelluride, most of studies are restricted to biochemical analysis and commonly show the pro-oxidant properties of compound in both *in vitro* and *in vivo* experiments. So, research that point the histopathology changes associated to diphenyl ditelluride intoxication are crucial since that this compound represents a human risk of occupational exposure due to be frequently used in organic synthesis reactions.⁸ In this sense, our work provides evidence that diphenyl ditelluride when administered s.c acute or sub-chronically is able to elicit several histological abnormalities in liver, kidney and lung of adult mice.

In a general way, diphenyl ditelluride exposure caused degenerative lesions of reversible and irreversible character, principally in liver and kidney. Unlikely, the lung tissue was little affected by diphenyl ditelluride intoxication. This difference may be related to the route of exposure, since the lungs are target organs for poisonings that occur mainly via inhalation.³³ In addition, the macroscopic findings showed that the kidneys, lungs, muscles and mucous membranes of mice intoxicated with diphenyl ditelluride developed a gray-black coloration. In analogy, a blackened appearance of tissues has already been observed in the mucosa of the bladder and ureter of two human fatally poisoning by compound sodium telluride during the necropsies analysis⁹. In these case reports is commented that the patients presented a peculiar garlic odor in the breath and severe cyanose. Although the tissue metabolism of diphenyl ditelluride is not well enlightened, other studies have suggested that the black color of some tissues observed in Te intoxication cases possibly reflects the deposition of reduced tellurium or elemental tellurium forms.³

Currently, the toxicological properties of diphenyl ditelluride have been investigated in *in vivo* and *in vitro* experimental models. Especially in liver, acute and/or chronic intoxication increases the organ-to-body weight ratio, inhibits δ -ALA-D

enzyme, increases thiobarbituric acid reactive substances, decreases non-protein SH levels and modify antioxidant enzymes activities in rodents.^{10,34,35} Combined, these results indicate that the oxidative stress seems to be involved in the toxicity triggered by diphenyl ditelluride. In terms morphologic, herein we observed that the liver of animals sub-chronically exposed to diphenyl ditelluride (10 and 50 μ mol/kg) contained hepatocytes with extensive cytoplasmic vacuolization, hydropic degeneration (edema) and hyperchromatic nuclei. The excessive accumulation of water associated to cytoplasmic vacuolization and hydropic degeneration usually results from increased permeability of cell membranes.³⁶ Indeed, sub-chronic exposure to 50 μ mol/kg diphenyl diselenide induced a focal or non-specific hepatitis and a focus of necrosis with dispersed cells followed by lymphocytic infiltration. Acute hepatitis with or without cholestasis is the most common histological pattern of drug-induced liver injury (DILI). It is widely recognized that DILI can be mediated by two main mechanisms: intrinsic and idiosyncratic hepatotoxicity. Commonly, intrinsic DILI is accompanied by hepatocellular necrosis and little inflammation, while the idiosyncratic DILI often with inflammation-dominant hepatic injury.³⁷ The liver of mice exposed acutely to diphenyl ditelluride presented marked steatosis and changes consistent with cellular necrosis such as nuclear piknosis and dense eosinophilic bodies unaccompanied by inflammation. Acute hepatocellular injury may result in necrosis affecting a single (spotty necrosis) or groups of hepatocytes (confluent necrosis). The necrosis signals induced by diphenyl ditelluride intoxication was characterized by a confluent necrosis in centrilobular zone (zone 3), that is commonly caused by others drugs such as acetaminophen, halothane and/or toxins like carbon tetrachloride. Frequently necrosis is accompanied by steatosis, which is characterized by presence of small fatty vesicles filling the cytoplasm of the

hepatocyte (foamy hepatocyte).³⁸ Here, the macrovesicular steatosis was represented by presence of single, large fat droplets in hepatocytes pushing the nucleus to the periphery of the cell. This change may be derived from the impaired egress of lipid from hepatocyte. Taken together, these set of results indicate that diphenyl ditelluride is a xenobiotic able to produce acute hepatitis and cellular death. Although there are few data on the liver histology in models of intoxication by Te compounds, our findings are in accordance with some studies that identified vacuolization and necrosis signals in hepatocytes of rats exposed to tellurium dioxide.^{29,31}

In vivo data on the renal deleterious action of diphenyl ditelluride are scarcer in the literature. Unlike to liver and brain, some biochemical analysis show that acute and/or chronic exposure to diphenyl ditelluride did not affect the activity of renal sulphhydryl enzyme δ -ALA-D, a marker of oxidative damage.¹⁶ Herein, the intoxication with diphenyl ditelluride provoked several renal damage including vacuolar degeneration, atrophy and hypertrophy of renal tubules, hyaline cast formation and acute tubular necrosis. These events reflect the cytotoxic effect of compound on renal parenchyma, which could impair the process of filtration glomerular and reabsorption tubular. Usually the hydropic changes and vacuolar degeneration appear whenever the cells are incapable of maintaining the ionic and fluid homeostasis. These are considered the first manifestations of almost all forms of cell injury and characterize a reversible injury type.³⁹ In renal analysis, the atrophic aspect of tubules was distinguished by a decrease of their size followed wrinkling and thickening of basal membrane. Some of atrophic tubules were also filled by cast proteinaceous, a pink mass in the lumen that corresponds to proteins filtered in glomerulus. In addition, the renal tubules of mice exposed sub-chronically to diphenyl

ditelluride present signals of acute tubular necrosis that was identified by presence of cytoplasm fragment projections towards tubular lumen and loosening of some of these microvesicles ("blebbing"); lost of the brush border and some free cells in the lumen. Based on these observations, it is plausible suppose that diphenyl ditelluride exposure induced injuries on the basal membrane, the principal filtration structure, making the glomerulus abnormally permeable. In this way, there is evidence that other Te compounds also provoke histological changes in the kidneys, ranging from cellular swelling to necrosis.^{29,30} For example, rats intoxicated with tellurium dioxide development vacuolization of tubular cells and glomerular hemorrhage, followed by albuminuria and hematuria.⁴⁰

Regarding to diphenyl ditelluride exposure and its impact in humans, it is important consider the growing use of this organochalcogen in the workplace and consequently the increased human exposure risk.^{8,41} In this context, the knowledge about the toxicological role of compound in the lungs is extremely important, since that the inhalation constitutes a direct via of intoxication. Although this route of exposure has not been used in this work and this fact may limit our findings, the results showed here are the first pathological data reporting the effects of diphenyl ditelluride on the histology of lungs. Of toxicological importance, a recent study showed that acute exposure to diphenyl ditelluride (via s.c, 0.3, 0.6, 0.9 $\mu\text{mol/kg}$) caused oxidative damage in rat lungs, which was associated with increase in the levels of lipid peroxidation, reactive species and non-protein thiol as well as alterations in antioxidant enzymes activities.⁴² In the histology analysis, we verified, that different of liver and kidney, the lung of mice intoxicated with diphenyl ditelluride did not present signals of severe lesions. However, it was possible observe that diphenyl ditelluride exposure induced edema and congestion pulmonary on some

areas in the higher dose tested (50 $\mu\text{mol/kg}$). It has been reported that other Te forms as cadmium telluride (via intratracheal) and tellurium hexafluoride (via inhalation) cause significant lung changes, including parenchymal inflammation, lung fibrosis, necrosis of bronchiolar epithelium, inflammation of alveolar epithelium and lung edema.^{43,44}

In conclusion, our results point that diphenyl ditelluride exposure provokes severe morphological changes in liver, kidney and lungs and consequently represents a potential risk to human health. Indeed, the data obtained herein will contribute to extend the knowledge on the toxicology of diphenyl ditelluride, since it is the first work that evaluates the histology of systemic tissues after intoxication with the compound.

References

1. Cooper WC. Tellurium. Van Nostrand Reinhold Co.: New York, 1971
2. Dittmer DC. Tellurium. Chem. Eng. News 2003, 36:81-128.
3. Duckett S, Ellem KAO. The location of tellurium in fetal tissues, particularly the brain. Exp Neurol 1971, 32:49-57.
4. Yarema MC, Curry SC. Acute tellurium toxicity from ingestion of metal-oxidizing Solutions. Pediatrics 2005, 116:319-321.

5. Green M, Harwood H, Barrowman C, Rahman P, Eggeman A, Festry F, Dobson P, Ng T. A facile route to CdTe nanoparticles and their use in bio -labelling. *J Mater Chem* 2007, 17:1989-1994.
6. Petraghani N, Stefani HA. *Tellurium in Organic Synthesis*, 2^a ed, 2007.
7. Navarro-Alarcon, M. and M.C. Lopez-Martinez,. Essentiality of selenium in the human body: Relationship with different diseases. *Sci. Total. Environ.*, 249: 347-371, 2000.
8. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organo-tellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004, 104:6255–6285.
9. Keall JH, Martin NH, Tunbridge RE. A report of three cases of accidental poisoning by sodium tellurite. *Br J Ind Med* 1946, 3:175-176.
10. Meinerz DF, Sudati JH, dos Santos DB, Frediani A, Alberto EE, Allebrandt J, Franco JL, Barbosa NBV, Aschner M, Rocha J.BT. Evaluation of the biological effects of (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate, a new telluroamino acid derivative of aspartic acid. *Arch Toxicol* 2011, 85, 43-49.
11. Wagner M, Toews AD, Morell P. Tellurite specifically affects squalene epoxidase: investigations examining the mechanism of tellurium-induced neuropathy. *J Neurochem* 1995, 64:2169-76.

12. Goodrum JF. Role of Organotellurium Species in Tellurium Neuropathy. *Neurochem Res* 1998, 23:1313-1319.
13. Blais FX, Onischuk RT, De Meio RH. Hemolysis by tellurite: I: The tellurite test for hemolysis. *J AOA* 1972, p.73.
14. Deuticke B, Lutkemeier P, Pose B. Telluride-induced damage of the erythrocyte membrane. Manifestations and mechanisms. *Biochem Biophys Acta* 1992, 1109: 97-107.
15. Barbosa NV, Rocha JBT, Zeni G, Emanuelli T, Beque MC, Braga AL. Effect of organic forms of selenium on aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. *Toxicol Appl Pharm* 1998, 149, 243-253.
16. Maciel EM, Flores EM, Rocha JBT, Folmer V. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 2003, 70:470–476.
17. Borges VC, Rocha JB, Nogueira CW. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)- ATPase activity in rat. *Toxicology* 2005, 215:191-197.
18. Zeni G, Ludtke DS, Panatieri RB, Braga AL. Vinylic Tellurides: From Preparation to their Applicability in Organic Synthesis *Chem Rev* 2006, 106:1032-1076.

19. Nogueira CW, Rotta LN, Perry ML, Souza DO, da Rocha JB. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res* 2001, 906:157-163.
20. Petraghani, N. Preparation of the principal classes of organic tellurium compounds. In:
Tellurium in organic synthesis. Academic Press, London 1994, 9–88.
21. Sailer BL, Liles N, Dickerson S, Chasteen TG. Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity promyelocitic (HL-60) cell line. *Arch of Toxicol* 2003, 77:30-36.
22. Moretto MB, Funchal C, Zeni G, Rocha JBT, Pessoa-Pureur, R. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. *Toxicology* 2005, 210:213-222.
23. Stangherlin EC, Fávero AM, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Teratogenic vulnerability of rats fetuses to diphenyl ditelluride: prenatal assessment. *Toxicology* 2005, 207:231-239.
24. Borges VC, Rocha JB, Savegnago L, Nogueira C W. Repeated administration of diphenyl ditelluride induces hematological disorders in rat. *Food Chem Toxicol* 2007, 45: 1453-1458.

25. Schiar VP., Dos santos DB., Paixão MW., Nogueira CW., Rocha JB., Zeni G. Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: a possible involvement of reactive oxygen species. *Chem Biol Interact.* 2009, 177: 28-33.
26. Pinton S, Luchese C, Stangherlin EC, Roman SS, Nogueira CW. Diphenyl ditelluride Induces neurotoxicity and Impairment of Developmental Behavioral in Rat Pups. *J Braz Chem Soc* 2010, 11:2130-2137.
27. Comparsi B, Meinerz DF, Franco JL, Posser T, Prestes ASP, Stefanello ST, Santos DB, Wagner C, Farina M, Aschner M, Dafre AL, Rocha JBT. Diphenyl ditelluride targets brain selenoproteins in vivo: inhibition of cerebral thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in mice after acute exposure. *Mol Cell Biochem* 2012, 370:173-182.
28. Santos DB, Schiar VPP, Paixão MW, Meinerz DF, Nogueira CW, Aschner M, Rocha JBT, Barbosa NBV. Hemolytic and genotoxic evaluation of organochalcogens in human blood cells in vitro. *Toxicol in Vitro* 2009, 23:1195–1204.
29. Degrandi TH, Oliveira IM, D'Almeida GS, Garcia CR, Villela IV, Guecheva TN, Rosa RM, Henriques JA. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 2010, 25:257-269.
30. De Meio RH, Jetter WW. Tellurium: the toxicity of ingested tellurium dioxide for rats. *J Ind Hyg Toxicol* 1948, 30:53-58.

31. Sandrackaja SE. Experimental research into the characteristics of tellurium as an industrial poison. *Gig Tr Prof Zabol* 1962, 2:44-50.
32. Carlton WW, Kelly WA. Tellurium toxicosis in Pekin ducks. *Toxicol Appl Pharmacol* 1967, 2:203-214.
33. Nyska A, Waner T, Pirak M, Albeck M, Sredni B. Toxicity study in rats of a tellurium based immunomodulation drug, AS-101: a potential for AIDS and cancer patients. *Arch Toxicol* 1989, 63: 386-393.
34. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. Fármacos que atuam sobre o sistema respiratório. In: *farmacologia ilustrada*. 2.ed, 1998. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda 22:217-222.
35. Maciel EM, Bolzan RC, Braga AL, Rocha JBT. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect delta-aminolevulinatase from liver, kidney and brain of mice. *J Biochem Mol Toxic* 2000, 14:310-319.
36. Meotti FC, Borges VC, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett* 2003, 143:9-16.
37. Davies TS, Monro A. Marked human pharmaceuticals reported to be tumorigenic in rodents. *J Am Coll Toxicol* 1995, 14:90-107.

38. Ramachandran R, Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease. *J Clin Pathol* 2009, 62:481-492.
39. Cheville NF. Interpretation of acute cell injury: Degeneration Chapter 2. In *Ultrastructural Pathology: An introduction to interpretation*. (Cheville, N. Ed.), 1st edn 1994, pp. 51-79. Iowa State University Press Ames, IA.
40. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. : 8th ed. Saunders/Elsevier 2010. Philadelphia, PA.
41. Sandrackaja SE. Experimental research into the characteristics of tellurium as an industrial poison. *Gig Tr Prof Zabol* 1962, 2: 44-50.
42. Paulmier C. Selenorganic functional groups. In: Paulmier, C. (Ed.) *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, 1st ed. Pergamon Press. Oxford, England 1986, 25-51.
43. Pinton S, Luchese C, Stangherlin EC, Nogueira CW. Acute exposure to diphenyl ditelluride causes oxidative damage in rat lungs. *Ecotox Environ Safe* 2011, 74(3):521-6.
44. Morgan DL, Shines CJ, Jeter SP, Wilson RE, Ward SM, Price HC, Moskowitz PD. Comparative Pulmonary Absorption, Distribution, and Toxicity of Cooper Gallium Diselenide, Cooper Indium Diselenide, and Cadmium Telluride in Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, 147:399-410.

45. Kimmerle G. Comparative studies on the inhalation toxicity of selenium sulfide and tellurium hexafluoride. Arch Toxicol 1960, 18:140-144.

FIGURES

Figure 1 Macroscopic analysis

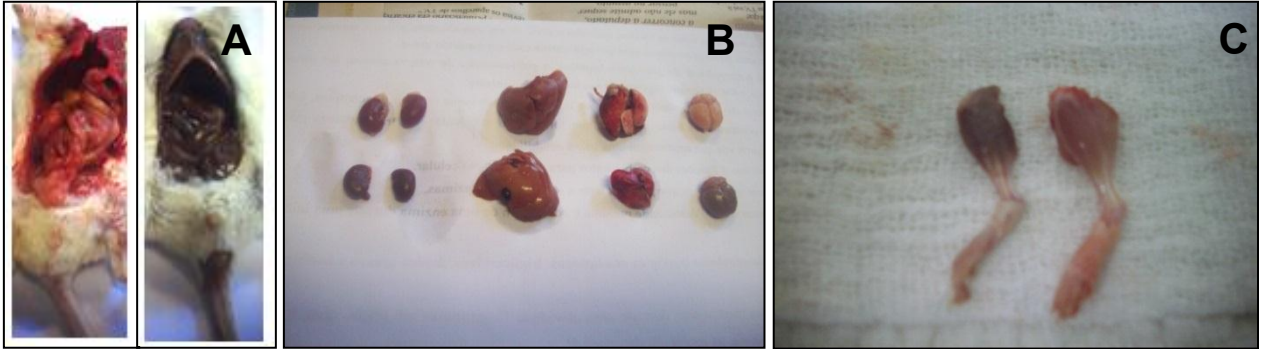


Figure 2 Liver (PhTe)₂ 10 μmol/kg 7 days/ 14 days

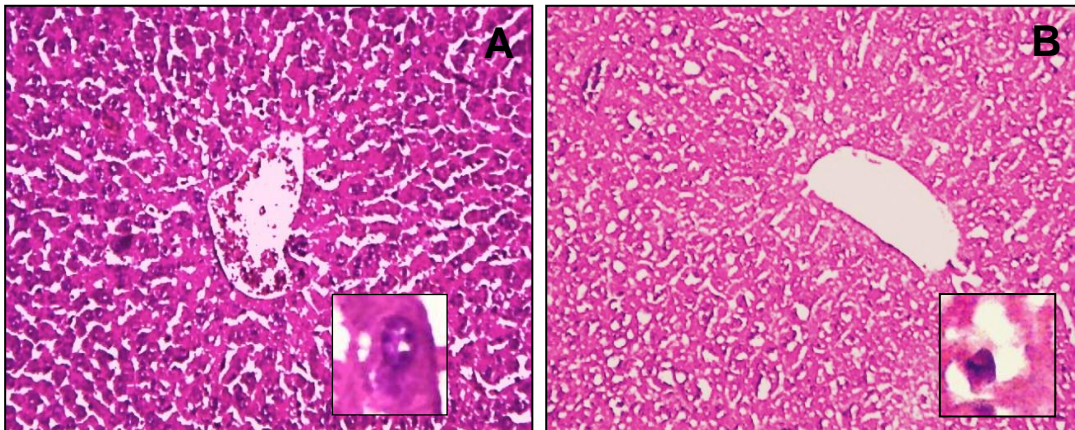


Figure 3 Liver (PhTe)₂ 50 µmol/kg 7days

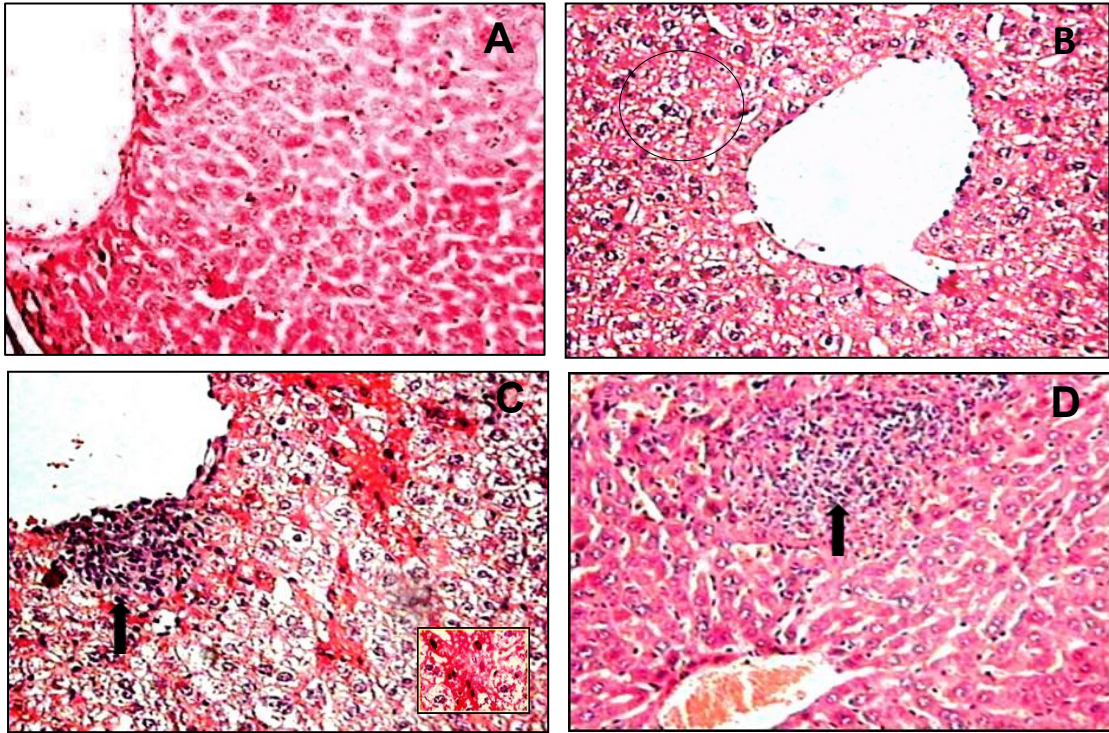


Figure 4 Liver (PhTe)₂ 250 µmol/kg single dose

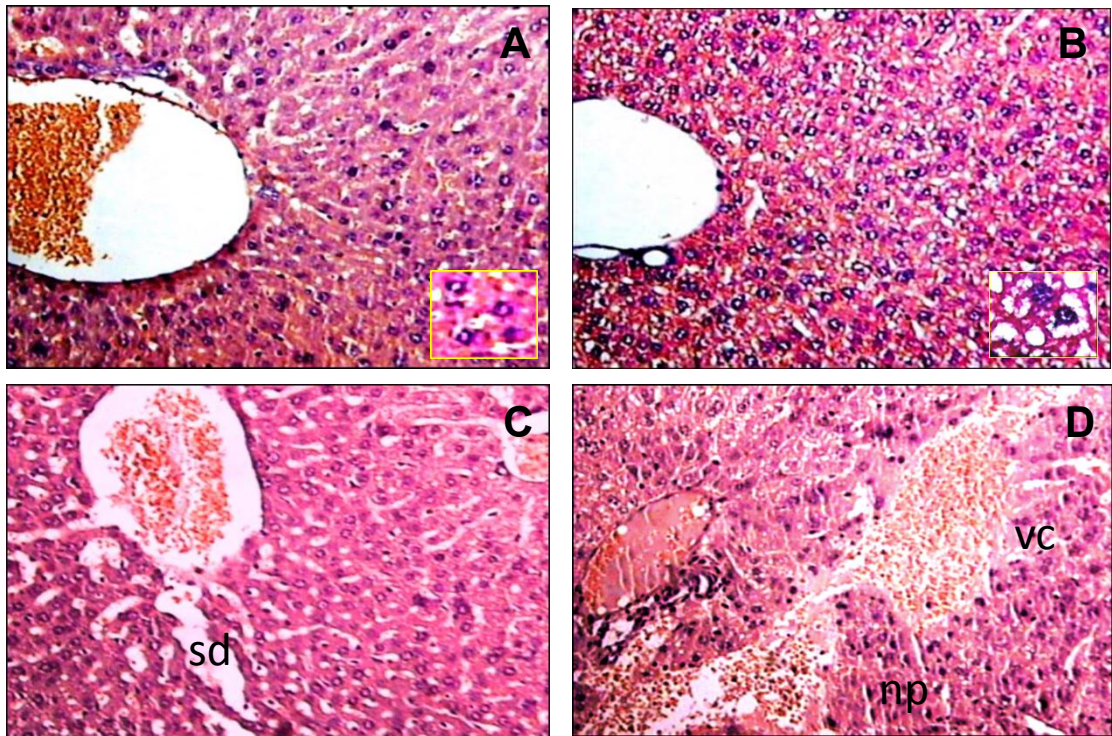


Figure 5 Kidney (PhTe)₂ 10 μmol/kg 7 days /14 days

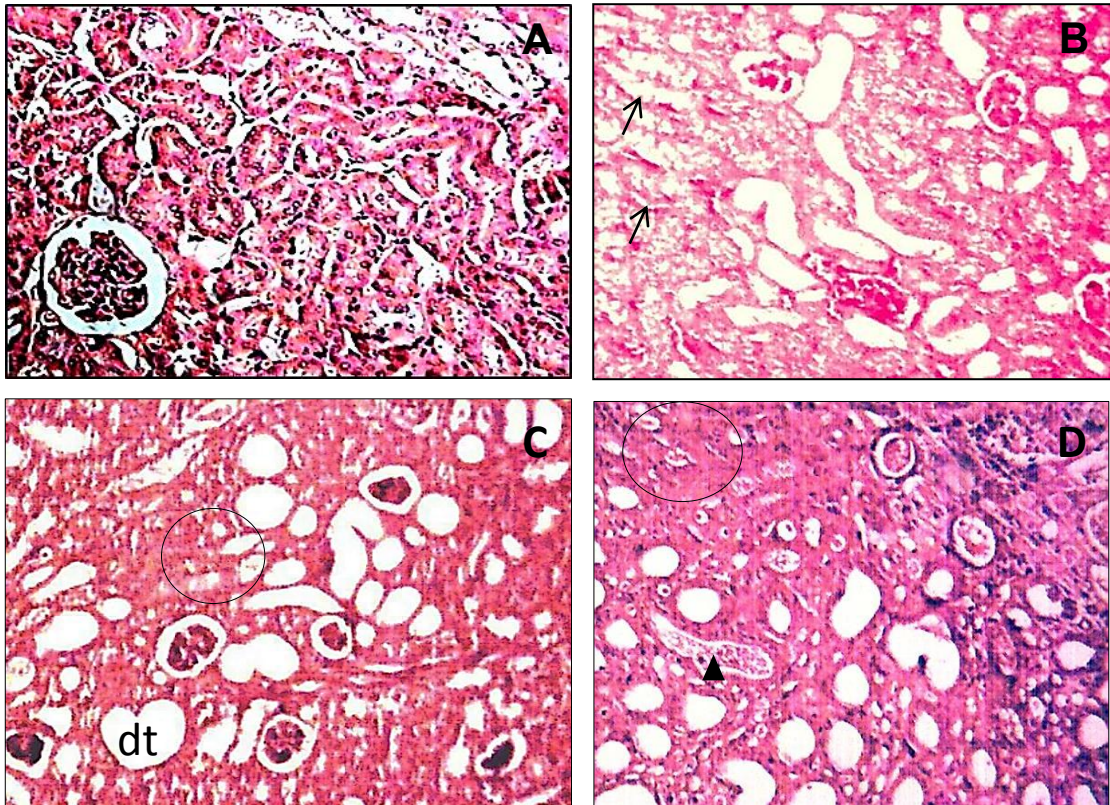


Figure 6 Kidney (PhTe)₂ 50 μmol/kg 7 days/ 14 days

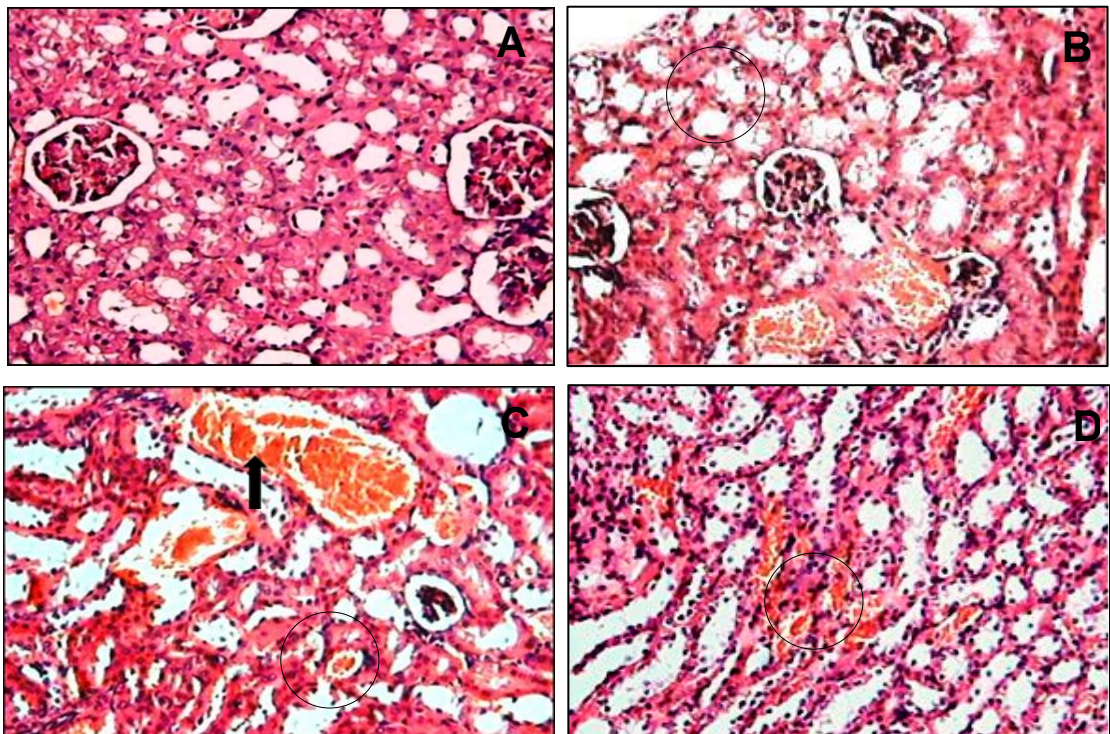


Figure 7 (PhTe)₂ 250 μmol/kg single dose

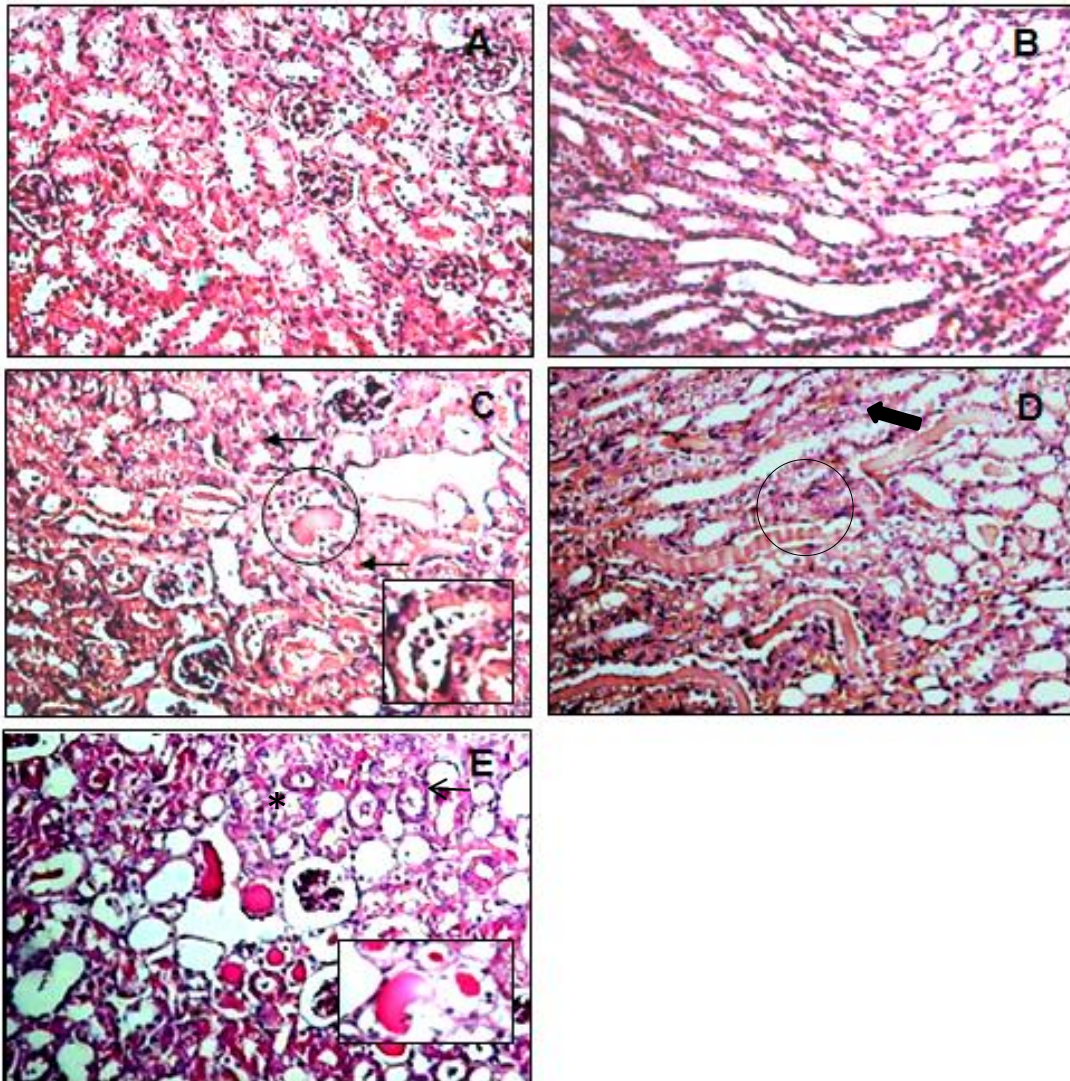
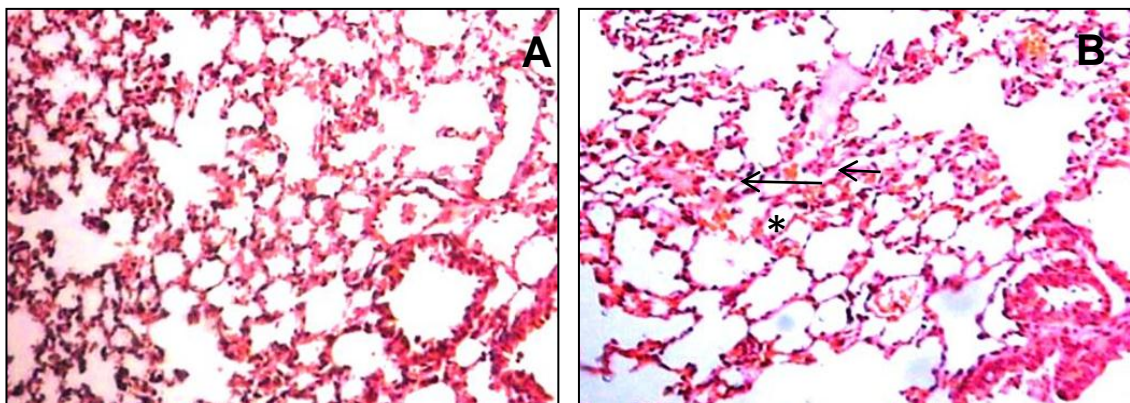


Figure 8 Lung (PhTe)₂ 50 μmol/kg 7 days/14 days



LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Internal cavity and organs of mice acute or sub-chronically exposed to different diphenyl ditelluride treatments: **(A)** internal cavity of control (left) and diphenyl ditelluride (right) treated mice; **(B)** kidneys, liver and lungs of control (upper line) and diphenyl ditelluride (lower line) treated mice; **(C)** muscles of lower limbs of control (left) and diphenyl ditelluride (right) treated mice. The picture is a representation of three independent experiments in all doses tested.

Figure 2. Liver histological analysis of mice exposed to diphenyl ditelluride 10 $\mu\text{mol/kg}$ for 7 days. **(A)** Liver section of control group showing polygonal hepatocytes with oval-shaped nuclei, dispersed chromatin and prominent nucleolus cordially arranged towards hepatic central vein (detail in 40X); **(B)** liver section of mice treated with diphenyl ditelluride showing cytoplasmic vacuolation, edema and hyperchromatic nuclei (detail in 40X) (H&E 10X). The picture is a representation of three independent experiments.

Figure 3. Liver Histological analysis of mice exposed to diphenyl ditelluride 50 $\mu\text{mol/kg}$ for 7 days. **(A)** Liver section of control group showing polygonal hepatocytes with oval-shaped nuclei, dispersed chromatin and prominent nucleolus cordially arranged towards hepatic central vein (detail in 40X); **(B)** liver section of diphenyl ditelluride treated mice showing hepatocytes with manifestation of hydropic degeneration; **(C)** piknotic nuclei and eosinophilic cytoplasm (detail in 40X) and mononuclear infiltrate in centrilobular (zona 3) (arrow) and **(D)** mediolobular (zona 2)

area (arrow) (H&E 10X). The picture is a representation of three independent experiments.

Figure 4. Liver Histological analysis of mice acutely exposed to diphenyl ditelluride 250 $\mu\text{mol/kg}$. **(A)** Liver section of control group showing preserved polygonal hepatocytes with oval-shaped nuclei, dispersed chromatin and prominent nucleolus cordially arranged towards hepatic central vein (detail in 40X); **(B)** liver section of diphenyl ditelluride treated mice showing microvesicular steatosis and macrovesicular steatosis (circle); **(C)** presence of sinusoidal dilatation (sd) mainly in centrilobular and mediolobular areas; **(D)** Hepatocytes with piknotic nuclei (circle) surrounded area with vascular congestion (vc) and hepatic laminae disorganized (H&E 10X). The picture is a representation of three independent experiments.

Figure 5. Kidney histological analysis of mice exposed to diphenyl ditelluride 10 $\mu\text{mol/kg}$ for 7 days. (A) Kidney section of control group showing conserved architecture of cortex with convoluted tubules outlined for a single layer of cuboidal cells and preserved glomeruli. Kidney section of diphenyl ditelluride treated mice showing: (B) vacuolar degeneration represented for marked epithelial cells swelling of renal tubules (arrows); (C) dilated distal tubules (dt) and proximal tubules in different stages of compression (circle) loss of brush border and some tubular cells free in lumen (arrow); (D) hypertrophic tubules filled with eosinophilic homogeneous substance (cast proteinaceous) (circle) and tubular cells free in lumen (head arrow) (H&E 10X). The picture is a representation of three independent experiments.

Figure 6. Kidney histological analysis of mice exposed to diphenyl ditelluride 50 $\mu\text{mol/kg}$ for 7 days. **(A)** Kidney section of control group showing conserved architecture of cortex with convoluted tubules outlined for a single layer of cuboidal cells and preserved glomeruli; kidney section of diphenyl ditelluride treated mice revealing: **(B)** vacuolar degeneration represented for marked epithelial cells swelling of renal tubules; **(C)** hypertrophic tubules filled with eosinophilic homogeneous substance (cast proteinaceous) and presence of vascular congestion in cortical (circle) and **(D)** medullar area (H&E 10X). The picture is a representation of three independent experiments.

Figure 7. Kidney histological analysis of mice exposed acutely to diphenyl ditelluride 250 $\mu\text{mol/kg}$. Kidney section of control group showing: **(A)** conserved architecture of renal cortex with convoluted tubules outlined for a single layer of cuboidal cells and preserved glomeruli and **(B)** renal medullar area with collecting tubule of normal morphology. Kidney of diphenyl ditelluride treated mice showing: **(C)** tubules in different stages of compression (arrows), epithelial cells free in tubular lumen (detail); presence of hypertrophic tubules filled with eosinophilic homogeneous substance (cast proteinaceous) (circle); **(D)** presence of tubules containing a single layer of epithelial cells and small vacuoles (circle), presence of tubules filled with eosinophilic homogeneous substance (cast proteinaceous) (arrows); **(E)** Kidney section with PAS stain, confirming the presence of cast proteinaceous in hypertrophic tubules (*) (Positive PAS stain/detail in 40X) (H&E 10X). The picture is a representation of three independent experiments.

Figure 8. Lung histological analysis of mice exposed to diphenyl ditelluride 50 $\mu\text{mol/kg}$. **(A)** Lung section of control group showing bronchioles, blood vessels and adjacent alveoli with normal morphology. **(B)** Lung section of diphenyl ditelluride treated mice showing the presence of some isolated areas with intra alveolar edema (arrows) and vascular congestion (*) (H&E10X). The picture represents the sum of three independent experiments.

6.2 Manuscrito 2

**A intoxicação pelo ditelureto de difenila induz alterações histológicas em
cérebro de camundongos**

**Diphenyl Ditelluride Intoxication Induces Histopathological Changes in Mice
Brain**

Sônia Cristina Almeida da Luz, Matheus Mulling dos Santos, Alessandro dos Santos Prestes, João Batista Teixeira da Rocha, Nilda Berenice de Vargas Barbosa.

Artigo em fase de redação

Diphenyl Ditelluride Intoxication Induces Histopathological Changes in Mice Brain

Sônia Cristina Almeida da Luz^a, Matheus Mulling dos Santos^a, Alessandro dos Santos Prestes^a, João Batista Teixeira da Rocha^a, Nilda Berenice de Vargas Barbosa^a.

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

Text pages: 25

Tables: 0

Figures: 5

*Corresponding author:

Dra. Nilda Vargas Barbosa and Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Tel: 55-55-3220-8140

Fax: 55-55-3220-8978

E-mail: nvbarbosa@yahoo.com.br/ jbtrocha@yahoo.com.br

Abstract

The diphenyl ditelluride (PhTe)₂ is an organic tellurium compound widely used as an intermediate in organic synthesis that presents important toxicological properties associated to increased risk of human exposure to occupational and environmental toxicity. The aim of this histological study was to determine the histologic changes that might be associated with exposure to (PhTe)₂, at different concentrations and time in brain. Male Swiss albino mice (25-35g) from our own breeding colony were used for this study that lasted for 7 and 14 days. They were divided into six groups. Group DMSO mice (n=4 each group) served as the control while the groups treated with (PhTe)₂ were divided into: Subchronic Exposure: 7 and 14 days (PhTe)₂ 10 μmol/kg (n=5) or 50 μmol/kg (n=5) and Acute Exposure Single dose: (PhTe)₂ 250 μmol/kg (n=5). The stained brain tissue micrographs showed neurodegenerative changes (vacuolations, pyknosis and cavitations) in the brain of the test rats respective of the dosage. Our findings suggest that exposure to (PhTe)₂ via subcutaneous route can induce brain tissue damage, which is probably concentration-dependent.

Material and Methods

Materials

Hematoxylin eosin (H&E) was acquired from Renylab and Luxol Fast Blue (LFB) of Easypath. Glial Fibrillar Acid Protein (GFAP) (Mouse Monoclonal, Clone GA-5; dilution 1:100); Synaptophysin (Mouse Monoclonal, Clone 27G12; dilution 1:100), were acquired from Biocare Medical and Vimentin (Mouse Monoclonal V-9; dilution 1:250) were acquired from Zymed. Diphenyl ditelluride (PhTe)₂ was synthesized in laboratory organic chemistry by the method previously described (Petragnani, 1994). Analysis of ¹H NMR and ¹³C NMR spectra showed that the (PhTe)₂ presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structures. The chemical purity of compounds (99.9%) was determined by CGMS. The vehicle utilized to dissolve the compound was DMSO (1% Dimethyl sulfoxide).

Animals

A total of 30 male Swiss albino mice (25-35g) from our own breeding colony were used. The animals were kept on a 12h light/dark cycle, at a room maintained at constant temperature (22 ± 2 °C), with free access to food and water and housed in solid plastic-bottomed cages. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, at the Federal University of Santa Maria, Brazil.

Experimental procedure

Diphenyl ditelluride treatment

The animals were exposed acute and sub-chronically to different concentrations of (PhTe)₂. The animals were randomly divided into 2 experimental groups (n=5): (1) control and (2) diphenyl ditelluride groups. Diphenyl ditelluride groups were subcutaneously administered with the compound once a day at 10 and 50 µmol/kg during 7 and 14 days and with 250 µmol/Kg to 1 day. The compound was dissolved in DMSO and the control group was similarly treated with the vehicle (DMSO 1ml/kg). All solutions were prepared fresh daily and the doses used were based on an previous LD50 study (Meotti et al, 2003), when the LD50 for (PhTe)₂ s.c., was > 500 µmol/Kg.

Methods

Brain Perfusion

After the end of treatment, following the criteria of exposure time and dose of each group, the mice were euthanized by cervical dislocation. Afterwards, the animals were perfused transcardially with 0.9% saline followed by ice-cold 4.0% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer solution (PBS). The brains were marked using a pin in the bregma point (zero coordinate), a landmark visible on the skull, situated between sagittal suture and coronal suture. After marking, the brain was removed excluding the olfactory bulb and cranial nerves. The brains were placed in 10% paraformaldehyde in PBS for 72 hours.

Tissue sampling

The brains were divided in two portions: anterior part and posterior part. The posterior part corresponded to area encephalic posterior, of part toward of lambda and cerebellum up to

the bregma zero point, toward area anterior of brain. The anterior part was constituted for segment started in side of surface of cut toward to posterior segment containing remaining of anterior brain. This procedure was adopted to acquisition of histological cuts coronal serial of brain tissue of fragments appropriate (Silva et.al., 2006). The brains were cut in coronal sections at 5 μ m on a sliding microtome. Some tissues were mounted on slides and stained with H&E, Luxol Fast Blue/ Cresyl violet, while others were processed for immunohistochemical analysis (reactivity of GFAP and Synaptophysin).

Histochemical procedure

The two portions (anterior part and posterior part) of the brain were incubated for 72 hours in 20% formalin and embedded in paraffin wax. Histologic cuts of 4 μ m were obtained by horizontal microtome (Lupetec Model MRP 09), mounted on glass slides and covered with glass slide. The cuts obtained previously underwent the histologic procedure and different techniques of marking: Hematoxylin and eosin (H&E), for observation of general histologic features and Luxol Fast Blue (LFB) that mapped the arrangement and concentration of myelin. All microscopic lesions were anatomically and morphologically characterized. The complete maps relating anatomic distribution to severity of lesions were produced for 15 randomly selected cases (5 groups n=3).

The criteria used in selecting slides for the histologic analysis were the entirety of cuts, the good marking with respective stain and the recognition of boundaries of brain areas, that were performed through comparison with stereotaxic atlas.

For histological analysis using H&E stain, each slide was analyzed in its entire length, comprising cortex and white matter and without distinction between brain hemispheres. The slides with histopathological changes compatible with demyelination (presence of vacuolation, rarefaction of neuropil) were selected for Luxol fast Blue stain. Slides to submission for immunohistochemistry were selected based on the slides H&E stained that presented morphologic changes.

H&E stain

H&E staining was initially performed on coronal sections of the brain that had been formalin fixed and paraffin embedded. Paraffin was removed using xylene. The sections were then dehydrated in ethyl alcohol, cleared with xylene, and coverslipped using an Entelan mounting medium (MERCK). Lesions were considered mild if they had prominent gemistocytic astrocytes but minimal to no myelin or axonal loss; moderate lesions had more extensive astrocytosis with white matter degeneration; severe lesions had marked astrocytosis and extensive white matter degeneration with rarefaction and vacuolar changes. Cerebral samples from 5 mice (10, 50 and 250 $\mu\text{mol/kg}$) with mild, moderate, and severe histopathologic lesions were selected for special staining procedures, including Luxol fast blue (LFB), GFAP and Synaptophysin.

Luxol Fast Blue (LFB) counterstained with Cresyl Violet (CV)

The slides with histopathologic changes compatible with demyelination in H&E were prepared in paraffin sections of 5 μm . The sections were stained by Luxol Fast Blue to emphasize the neuronal bodies (nissl substance - dark blue to purple, nuclei - dark blue to purple; non-myelinated fibers in pink-purple, and myelin fibers in blue-green). Cresyl Violet stain is used to visualize Nissl substance in the cytoplasm of normal neurons, and so evaluate the viability and surviving neurons in the brain. The stain neuropil assumes a purple-blue granular aspect.

Immunohistochemical marking of GFAP and Synaptophysin

To detect astrocytic reactions, an immunohistochemical method with an antibody against GFAP was used. In addition, an antibody against Synaptophysin was also used to investigate presynaptic behavior in lesion areas.

The immunohistochemical stains for GFAP (glial fibrillary acidic protein) were performed using an indirect method with Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) (Hsuetal.,1981; Raine,1981).

The transversal cuts of 5µm were performed on samples to mount histologic slides. For each sample, two cuts were submitted to marker immunohistochemical marker, which were placed on slides previously treated with 3-aminopropyltriethoxysilan (APTS). The slides with the cuts were taken to an oven at 60° C and left to better prepare them for tissue accession. The immunohistochemical probe was performed in the laboratory of the Department of Pathology of Federal University of Santa Maria, observing the method reported for Alves et al. (1999) with small alterations.

Results

Histochemical analysis

The coronal sections of the brain from the mice showed histological changes in all the groups treated with (PhTe)₂. Histopathology of the samples in H&E stain demonstrated that diphenyl ditelluride at different concentrations caused degeneration in the brain. The lesions were characterized by vacuolar change and rarefaction of neuropil in the thalamus, hippocampus and cerebral cortex which varied in intensity and extension. These changes were of diffuse localization in the cerebral tissue and without cerebral hemisphere preference.

The ventropostero medial and lateral nucleus in the thalamus of the treated groups with diphenyl ditelluride revealed several cellular degenerative changes in the group exposed to 50 µmol/kg for 14 days (Fig 6E and 6F). The group exposed to 50 µmol for 7 days presented sparse cellular population as well as some vacuolar changes in the hippocampus and thalamus (Fig 4E and 4F). The group exposed to a single dose of 250 µmol/kg diphenyl ditelluride presented mild vacuolar changes in the hippocampus (Fig 3A), spongiform change

in the focal area of the cerebral cortex in the form of panlaminar degeneration (Fig 3C). In addition, the thalamus presented confluent spongiform change, taking to abnormal cerebral cytoarchitecture (Fig 3A and 3B). In the groups exposed to 10 $\mu\text{mol/kg}$ for 7 and 14 days, we observed moderate vacuolation and rarefaction of neuropil in the hippocampus (Fig 2B and 2C) and perineuronal edema and piknotic nucleus in the thalamus (Fig 2D).

The neuronal viability was lost in the hippocampus in the subfield CA1 and CA3 in all the groups, except in the group exposed to 10 $\mu\text{mol/kg}$ diphenyl ditelluride for 7 days (data confirmed by Cresyl Violet stain). The histopathology of the samples in Luxol Fast Blue stain revealed in the group exposed to 50 $\mu\text{mol/kg}$ for 14 days, there were marked structural abnormalities of rarefaction and fragmentation (Fig 6C and 6D). The other treated groups (10 $\mu\text{mol/kg}$ 7 and 14 days; 50 $\mu\text{mol/kg}$ 7 days; 250 $\mu\text{mol/kg}$ single dose) showed no changes when compared with the control group.

Cresyl Violet was used to identify the neuronal structure in CA1, CA2 and CA3 of the hippocampus. Extensive apoptosis are observed in the groups exposed to 50 $\mu\text{mol/kg}$ for 7 days (CA1 and CA3) (Fig. 8A and 8B), 50 $\mu\text{mol/kg}$ for 14 days (Fig 8C and 8D). In terms of apoptosis area the neurons presented shrinkage, the cells were smaller in size, the cytoplasm was dense and the organelles were more tightly packed. The group 250 $\mu\text{mol/kg}$ single dose (Fig. 8E and 8F) shows extensive neuronal degeneration, represented by vacuolar changes in neuron of dentate girus.

Immunohistochemical analysis

The analysis of cuts marked for GFAP and Synaptophysin was made according to the distribution and morphology of positive or negative cells for both proteins. The cells were considered positive for GFAP and Synaptophysin when stained in dark brown color. GFAP (Glial fibrillary acidic protein), an intermediate-filament (IF) protein, is specifically expressed in cells of astroglial lineage and is widely used to mark astroglia in the brain. The sections of treated animals and with degeneration shown by H&E, showed diffuse labeling along the

entire extension of tissue, especially in white matter and focal areas of the cerebral cortex. Immunohistological sections of the white matter showed a noticeable number of GFAP-Positive astrocytes at the edges of vacuolar change in the group exposed to 50 μ mol/kg for 14 days. The areas with absent vacuolar change showed least marking for GFAP, presenting less stained cells and more scant cytoplasm. GFAP immunoreaction was absent into lesioned areas (Fig 7E and 7F).

Synaptophysin staining in treated groups and with degeneration; presented decrease or absence of immunihistochemical reaction by the protein in the areas of vacuolar change (Fig 7G and 7H).

FIGURES



Figure 1. Photograph showing the gray-black coloration in the brain of mouse treated with (PhTe)₂ 50 μ mol/kg (under) when compared with the control with an normal coloration (up).

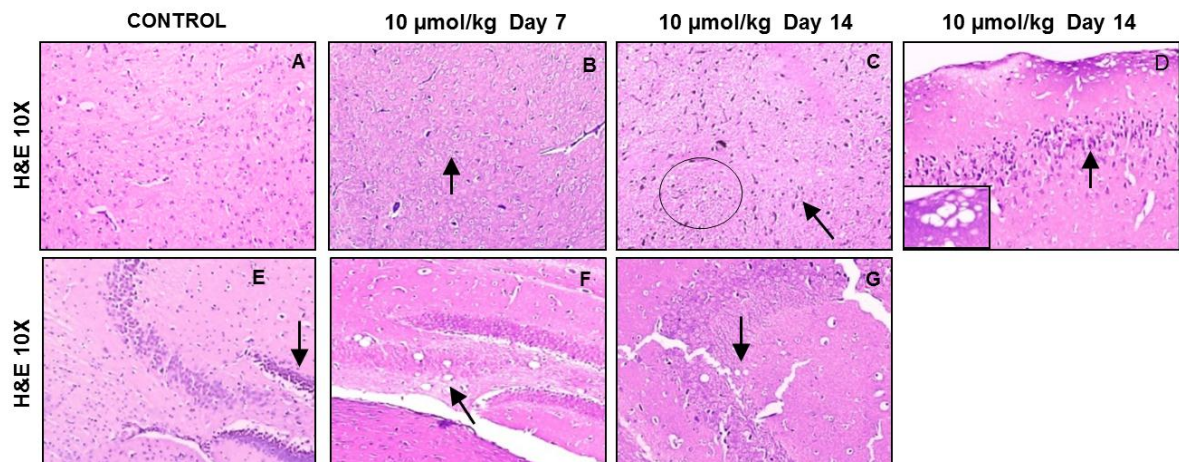


Figure 2. Histopathologic analysis of mouse brain exposed to diphenyl ditelluride in concentration of 10 $\mu\text{mol/kg}$ diphenyl ditelluride 7 and 14 days. s.c route. (A) Control group thalamus: shows brain tissue with axon, myelin sheath and glial cell of usual appearance (H&E 10X). (B)(C) Thalamus area shows perineuronal edema (black arrow) in adjacent glia cells that also present piknotic nucleus (circle). In addition, moderate vacuolation and rarefaction of neuropil is observed (H&E 10X). (D) Presence of vacuolar changes (spongiosis) (detail in 40x), perineuronal edema and piknotic nucleus (black arrow) in the cerebral cortex (H&E 4x). (E) Control group of hippocampus: show pyramidal layer and dentate girus (black arrow) without morphologic changes (H&E 10X). (F)(G) Hippocampal area shows mild vacuolar changes in the CA3 subfield (black arrow).

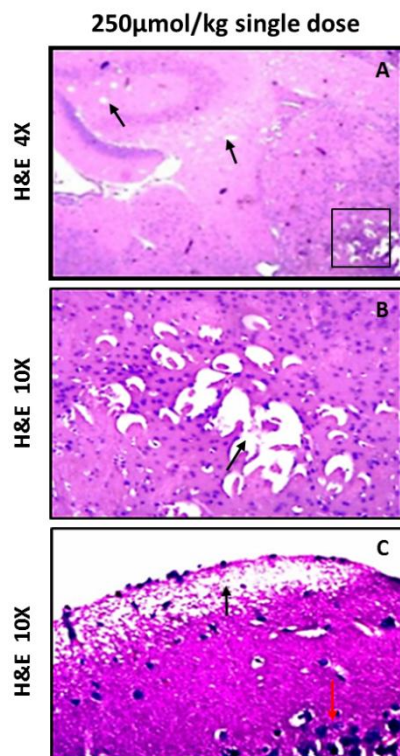


Figure 3. Histopathologic analysis of mouse brain exposed to diphenyl ditelluride in concentration of 250 μ mol/Kg single dose, s.c route. Spongiform change in brain tissue: A) micro-vacuolation characterised by multiple small rounded vacuoles within the neuropil of the white matter (black arrow) and severe spongiform vacuolation in focal area of white matter results in (B)confluent spongiform change (circle) with extensive neuronal loss, reactive astrogliosis (black arrow) and abnormal cerebral cytoarchitecture (H&E 10X,Detail in 20X). (C) Cerebral cortex shows extensive cortical vacuolation, panlaminar degeneration (black arrow), reactive astrogliosis and neurons with piknotic nuclei (red arrow).(H&E 10X).

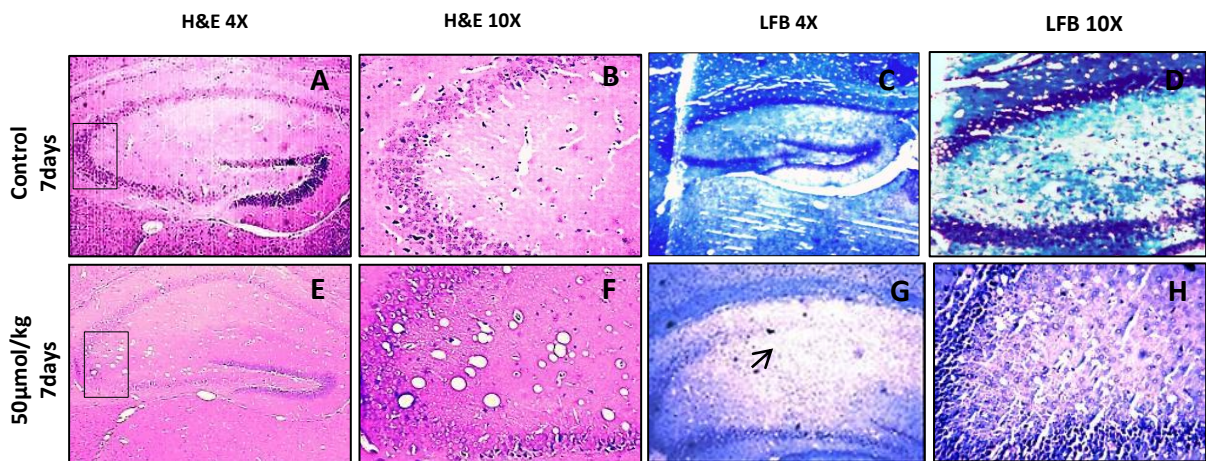


Figure 4. Histopathologic analysis of mouse brain exposed to 50 $\mu\text{mol/kg}$ diphenyl ditelluride for 7 days, s.c route. (A)(B) Control group without morphologic changes (H&E). (C)(D) Control group with usual distribution of myelin (blue) (LFB). (E)(F) Presence of moderate vacuolation and rarefaction of neuropil in hippocampus. Thalamus area (*) without morphologic changes (H&E).(G)(H) Observation of very low myelin sheath density (black arrow) (LFB).

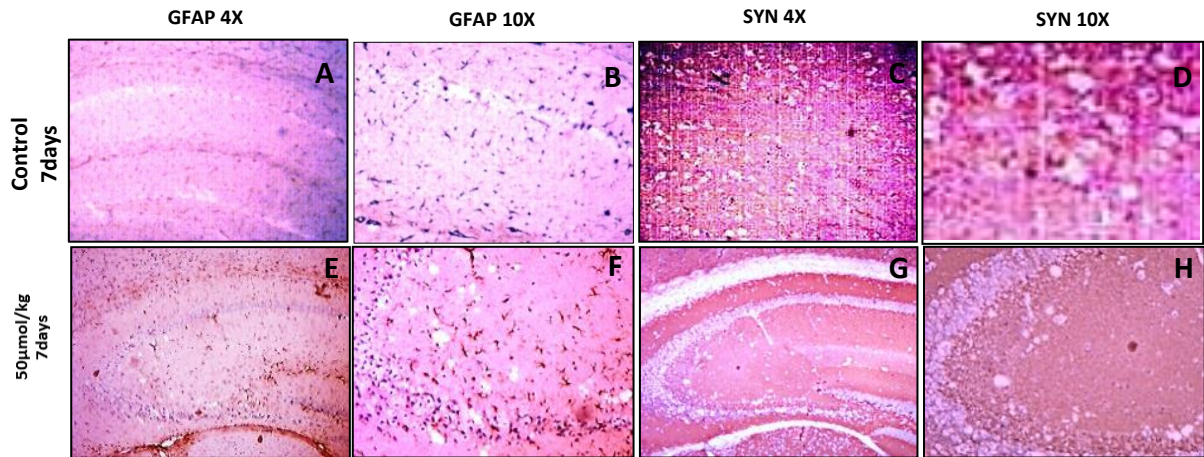


Figure 5. Histopathologic analysis of mouse brain exposed to 50 $\mu\text{mol/kg}$ diphenyl ditelluride for 7 days, s.c route. (A)(B) Control group without morphologic changes (H&E). (C)(D) Control group shows homogeneous distribution of synaptophysin (SYN). (E)(F) Astrocytic immunoreaction with moderate positive marking in adjacentes degeneration areas (astrocytic reaction) (black arrow)(GFAP).(G)(H)The section shows loss of immunohistochemical reaction to protein synaptophysin in degeneration areas (SYN).

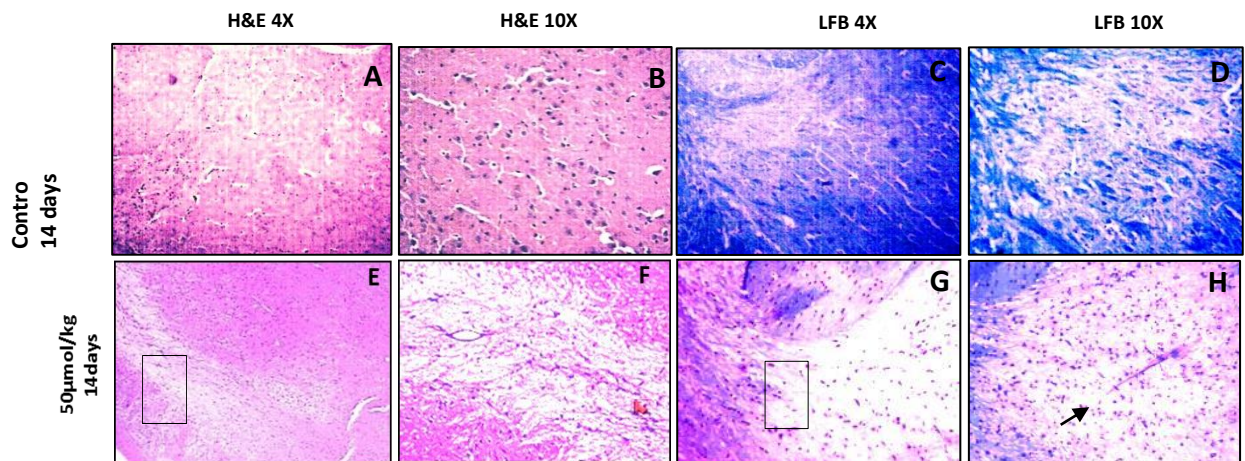


Figure 6. Histopathologic analysis of mouse brain exposed to 50 $\mu\text{mol/kg}$ diphenyl ditelluride for 7 days, s.c route. (A)(B) Control group without morphologic changes (H&E). (C)(D) Control group with usual distribution of myelin (blue). (E)(F) Presence of severe vacuolation (status spongiosus) and rarefaction of neuropil in thalamus (ventroposterior medial and lateral nucleus) (black arrow) (H&E). (G)(H) Presence of structural abnormalities of rarefaction of neuropil in thalamus area, with accented loss of myelin (black arrow)(LFB).

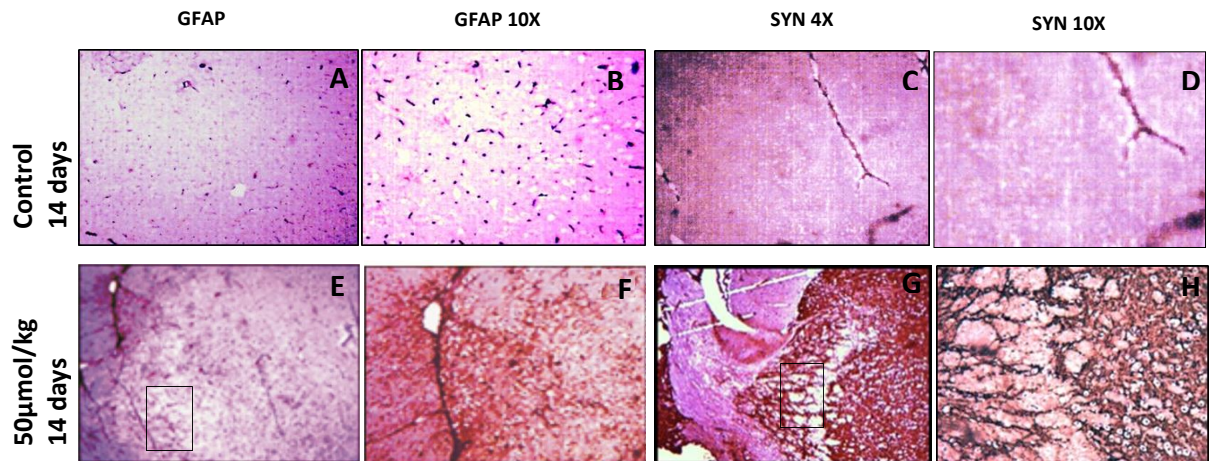


Figure 7. Histopathologic analysis of mouse brain exposed to 50 $\mu\text{mol/kg}$ diphenyl ditelluride for 14 days, s.c route. (A)(B) Control group shows astrocytes of sparse distribution (GFAP). (C)(D) Control group shows homogeneous distribution of synaptophysin (SYN). (E)(F) Astrocytic immunoreaction with accentuated positive marking in adjacent degeneration areas (astrocytic reaction) (black arrow). Absent reaction is observed in the center of the degeneration areas (astrocyte loss) (GFAP). (G)(H) The section shows loss of immunohistochemical reaction to protein synaptophysin in degeneration areas (SYN).

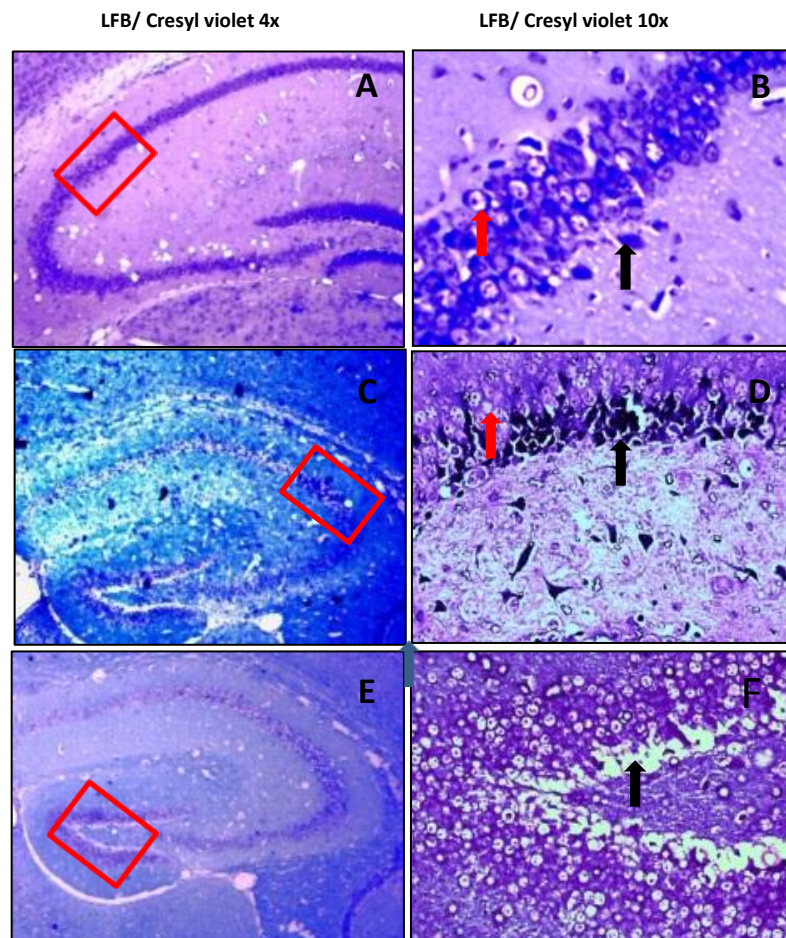


Figure 8. Histopathologic analysis of hippocampus of mouse brain exposed to 50 $\mu\text{mol/Kg}$ diphenyl ditelluride for 7 and 14 days and 250 $\mu\text{mol/Kg}$ single dose s.c route. (A)(B) Group treated with 50 $\mu\text{mol/kg}$ 7 days; (C)(D) 50 $\mu\text{mol/kg}$ 14 days shows cells that are shrunken with condensed cytoplasm. The nuclei are pyknotic and fragmented (arrow black) intermingling with neurons without changes, which show prominent perinuclear nissl granules (arrow red). (E)(F) Group treated with 250 $\mu\text{mol/kg}$ shows extensive neuronal degeneration, represented by vacuolar changes in neuron of dentate girus (arrow black) (Cresyl violet 4X and 10X).

7 DISCUSSÃO

Embora os compostos de Telúrio tenham sido amplamente estudados com relação a sua toxicidade, há poucos dados na literatura mostrando os efeitos prejudiciais da intoxicação por Telúrio através da anatomia microscópica dos tecidos. Com relação ao ditelureto de difenila (PhTe)₂, muitos estudos são restritos à análise bioquímica e comumente mostram as propriedades pro-oxidantes do composto em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Também, a pesquisa sob o ponto das alterações histopatológicas associadas à intoxicação pelo (PhTe)₂ são cruciais visto que o composto representa risco ocupacional para humanos devido ao frequente uso em reações de síntese orgânica (NOGUEIRA, ZENI e ROCHA, 2004). Neste sentido, nosso trabalho fornece evidências de que o (PhTe)₂ quando administrado por via subcutânea, de forma aguda ou subcrônica é capaz de provocar severas anormalidades histológicas no fígado, rim, pulmão e cérebro de camundongos adultos.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a exposição de camundongos ao (PhTe)₂ por via subcutânea causou desde lesões degenerativas de caráter reversível até lesões irreversíveis como morte celular no fígado, rim e cérebro. O tecido pulmonar foi minimamente afetado, fato que pode ser relacionado à rota de exposição, uma vez que a atuação sobre o órgão de maneira deletéria é através da via inalatória (MYCEK, HARVEY e CHAMPE, 1998)

A avaliação anatômica macroscópica demonstrou coloração enegrecida dos órgãos, incluindo membranas mucosas interna, pele e músculos. Esta característica macroscópica dos tecidos foi observada durante exame de necropsia na mucosa da bexiga e ureter de dois homens fatalmente envenenados pelo composto ditelureto de sódio (KEALL et al., 1946). Este fato pode estar relacionado à deposição de Telúrio reduzido ou formas de telúrio elementar (DUCKETT e ELLEM, 1971).

A avaliação de parâmetros bioquímicos tem revelado em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* no fígado que a exposição ao (PhTe)₂ inibe a enzima δ-ALA-D, aumenta as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, diminui os níveis de SH não proteicas e modificam a atividade de enzimas antioxidantes em roedores (MEINERZ et al., 2011; MACIEL et al., 2000; MEOTTI et al., 2003). A avaliação

morfológica microscópica após a exposição subcrônica ao $(\text{PhTe})_2$ (10 e $50\mu\text{mol/kg}$) demonstrou alterações degenerativas nos hepatócitos, esteatose hepática, necrose focal e hepatite focal não específica, que é o padrão histológico mais comum da injúria hepática induzida por droga. Examinados em conjunto, esses resultados indicam que o $(\text{PhTe})_2$ é um xenobiótico capaz de produzir hepatite aguda e morte celular. Apesar de haver poucos dados sobre histologia do fígado em modelos de intoxicação por compostos orgânicos de Telúrio, nossos achados estão de acordo com alguns estudos que identificaram vacuolização e sinais de necrose em hepatócitos de ratos expostos ao dióxido de telúrio (DEMEIO e JETTER, 1948).

No rim, ao contrário do fígado e cérebro, algumas análises bioquímicas mostram que a exposição aguda e/ou crônica ao $(\text{PhTe})_2$ não afeta a atividade da enzima δ -ALA-D renal, um marcador de dano oxidativo (MACIEL et al., 2003). O $(\text{PhTe})_2$ provocou dano renal severo, incluindo degeneração vacuolar, atrofia e hipertrofia de túbulos renais, formação de moldes hialinos e necrose tubular aguda (NTA). Esses eventos refletem o efeito citotóxico do composto no parênquima renal, que pode prejudicar o processo de filtração glomerular e reabsorção tubular. Usualmente, a alteração hidrópica e a degeneração vacuolar aparecem toda vez que as células são incapazes de manter a homeostasia iônica e fluída. Estas são consideradas as primeiras manifestações de quase todas as formas de injúria celular e caracteriza um tipo de injúria reversível (ROBBINS, KUMAR e COTRAN, 2010). Em adição, os túbulos renais de camundongos expostos de forma subcrônica ao $(\text{PhTe})_2$ apresentou sinais de necrose tubular aguda, podendo levar à alteração da estrutura de filtração, tornando o glomérulo anormalmente permeável.

Considerando o crescimento do uso e exposição ao $(\text{PhTe})_2$ e consequente aumento do risco ocupacional é importante a análise do pulmão, principalmente pelo fato de que a inalação constitui-se como via direta de intoxicação. Embora essa rota de exposição não tenha sido usada neste trabalho e esse fato tenha limitado nossos achados, os resultados mostrados aqui são os primeiros dados patológicos relatando os efeitos do $(\text{PhTe})_2$ na histologia dos pulmões. A avaliação histológica microscópica do pulmão não demonstrou lesões severas associadas à exposição do $(\text{PhTe})_2$. Contudo edema e congestão pulmonar é possível observar em grupos tratados com altas doses do composto ($50\mu\text{mol/kg}$ and $250\mu\text{mol/kg}$). Outras formas de telúrio, como telureto de cádmio (via intratraqueal) e hexafluoreto de telúrio (via inalatória), foram relacionadas à inflamação do parênquima, fibrose pulmonar,

necrose do epitélio bronquiolar, inflamação do epitélio alveolar e edema pulmonar (KIMMERLE, 1960; MORGAN et al., 1997).

Adicionalmente, os resultados deste estudo no tecido cerebral revelaram que a administração de $(\text{PhTe})_2$ induziu alterações neurodegenerativas, como: alteração vacuolar ou alteração espongiiforme, espongirose e status espongioso. Além disso, foi observada, na região do hipocampo, presença de picnose nuclear, perda de viabilidade e morte neuronal nos camundongos tratados. Em tratamento paralelo, o uso de marcação imunoistoquímica possibilitou a visualização de reação glial e perda da imunorreatividade na membrana pré-sináptica. A neurodegeneração é um termo amplo para a perda progressiva da estrutura ou função dos neurônios. O aparecimento de sinais histopatológicos de toxicidade foram dependentes da dose e do tempo após a exposição ao $(\text{PhTe})_2$. Os grupos 50 $\mu\text{mol/kg}$, durante 7 e 14 dias de exposição apresentaram alterações histológicas mais expressivas, que foram observadas no hipocampo, córtex cerebral e tálamo.

É conhecido que os compostos orgânicos de telúrio são altamente tóxicos para o sistema nervoso central (SNC) de roedores, mas os mecanismos envolvidos com os efeitos induzidos pelo $(\text{PhTe})_2$ não foram ainda elucidados. No sistema nervoso periférico (SNP), esses efeitos provavelmente ocorrem pelo rompimento na síntese de colesterol, nas células de Schwann, através da inibição da escaleno monooxigenase (WAGNER-RECIO et al., 1991). No SNC, foram relatados efeitos *in vitro* e *in vivo* nas amostras de córtex cerebral expostos a uma concentração tóxica de $(\text{PhTe})_2$ sobre a atividade da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ e sobre a fosforilação das proteínas do citoesqueleto (MORETTO et. al., 2005; HEIMFARTH et.al., 2008).

Os achados de processos neurodegenerativos são caracterizados pela astrogliose persistente e ativação da morte neuronal por apoptose, através dos mecanismos mediados pela caspase 3 (HEIMFARTH et. al., 2013). Também foi demonstrado em estudos anteriores, que fêmeas grávidas expostas a baixas concentrações de $(\text{PhTe})_2$ podem alterar a sinalização celular, atingindo o citoesqueleto do corpo estriado e cerebelo (HEIMFARTH et. al., 2012b). No presente estudo histológico, a intoxicação com $(\text{PhTe})_2$ foi capaz de provocar alteração espongiiforme ou vacuolar, observada em áreas mielinizadas junto ao tálamo e ao hipocampo, e, também, em pontos focais do córtex cerebral, onde é denominada espongirose. Essas alterações foram de localização difusa no parênquima e sem preferência por hemisfério cerebral. A alteração espongiiforme é formada por

numerosos e finos vacúolos redondos ou ovais à microscopia de luz e maiores de 50 µm de diâmetro de diferentes tamanhos, alguns coalescentes, opticamente vazios, bem delimitados. Esses vacúolos podem ser extracelulares ou intracelulares e, frequentemente, deslocam organelas como núcleo e mitocôndria. Vacúolos intramielínicos dentro da substância branca correspondem a uma fenda nas camadas de mielina (GONATAS et al., 1965; MACHADO-SALAS, 1986). Além dessa alteração vacuolar, o neurópilo, nomeadamente, o tecido localizado entre os corpos celulares, pode também exibir microvacuolização ou também ocorrer status espongioso, que são cavidades irregulares rodeadas por trama de glia. Ultraestruturalmente, as alterações espongióticas foram atribuídas a processos astrocíticos edemaciados, espaço extracelular distendido, oligodendrócitos vacuolados, axônios dilatados, vacúolos dentro das bainhas de mielina, dendritos neuronais edemaciados e desmielinização (LAMPERT, SCHOCHET, 1968).

Nossos achados histológicos estão de acordo com os dados de Nogueira et al. (2001), que concluíram que a exposição a simples ou múltiplas doses de (PhTe)₂ causou efeito neurotóxico histopatológico, que demonstrou acentuada vacuolização dos corpos celulares e neurópilo (NOGUEIRA et al., 2001).

Neurônios viáveis sobreviventes no hipocampo foram estimados pela coloração de violeta de cresil. No presente estudo, foi observada significativa perda de neurônios e presença de células apoptóticas na subcamada CA1 e CA3 do hipocampo evidenciadas nos grupos 50 µmol/kg 7 e 14 dias e 250 µmol/kg dose única. A degeneração neuronal tem sido relatado resultar em morte celular, que pode ser de 2 tipos, denominados apoptose e necrose.

A coloração do tecido cerebral através do Luxol Fast Blue (LFB) é comumente usada para detectar desmielinização no SNC. Este processo é caracterizado por morte da glia e vacuolização, bem como a perda do lençol de mielina não mais sustentado por oligodendrócitos degenerados e mortos (GRAÇA, BLAKEMORE, 1986). Com relação à baixa densidade do lençol de mielina, estudos anteriores demonstraram que (PhTe)₂ causou hipomielinização mais do que desmielinização em filhotes de ratos (PINTON et al., 2010). Aqui, o exame histológico com a coloração por LFB revelou severa perda de densidade de mielina junto às áreas de alteração vacuolar, no grupo tratado com (PhTe)₂ 50 µmol/kg 14 dias em camundongos adultos. No entanto, nos outros grupos tratados com (PhTe)₂, foi observada discreta rarefação do lençol de mielina.

Astrócitos contêm proteína glial fibrilar ácida (GFAP) como nenhum outro elemento celular contém tal proteína; ela serve como marcador específico para identificá-los. Os níveis de GFAP são regulados no baixo desenvolvimento e condições patológicas. A super expressão da GFAP é uma das mais características reações dos astrócitos, comumente observada após lesão no SNC (GOMES et. al., 1999). Neste estudo, foi observado desaparecimento dos astrócitos normais, marcados pela GFAP, no centro da lesão. No entanto, nas bordas da lesão, houve reação astrocítica evidenciada por aumento do corpo celular, prolongamentos celulares longos e grossos, fortemente marcados pela GFAP. Gliose é uma alteração reativa não específica das células gliais em resposta ao dano no SNC. Em muitos casos, a gliose envolve a proliferação ou hipertrofia de diferentes tipos de células gliais, incluindo astrócitos. Gliose é uma característica do dano no SNC.

As desordens degenerativas no cérebro são caracterizadas pela contínua perda de neurônios na área cortical e subcortical e, provavelmente, por uma extensa perda sináptica. A fim de localizar a perda de sinapses em camundongos expostos a $(\text{PhTe})_2$ foi usada imunoreatividade para um anticorpo que identifica a proteína sinaptofisina. A sinaptofisina é uma glicoproteína de membrana (Mr 38,000) presente nas vesículas pré-sinápticas dos neurônios e em vesículas similares na medula da glândula adrenal. Em nossos achados, a exposição aguda e subaguda de camundongos adultos ao $(\text{PhTe})_2$ provocou perda da imunoreatividade à proteína nas áreas de alteração vacuolar. Isso significa a redução ou perda completa de terminais sinápticos, indicando diminuição ou ausência da função sináptica nas áreas afetadas.

O presente estudo foi conduzido utilizando um modelo experimental de exposição de camundongos adultos ao $(\text{PhTe})_2$, visando avaliar as condições anatomopatológicas do fígado, rim, pulmão e cérebro. Os resultados apontam que a exposição ao $(\text{PhTe})_2$ provoca severas alterações morfológicas nesses órgãos, que vão desde processos patológicos reversíveis até os irreversíveis, como morte celular. Particularmente no cérebro, os achados histológicos demonstraram que o composto foi capaz de causar danos teciduais, como vacuolização, representada por espongirose e status espogioso, perda da viabilidade neuronal e astrocitária, ativação astrocitária, gliose reativa, desmielinização, e sugere um importante papel desse composto na perda de sinapses e possível prejuízo na transmissão sináptica. Esses

achados associados com disfunções neuroquímicas demonstraram respostas neurotóxicas após a exposição ao $(\text{PhTe})_2$.

8 CONCLUSÕES

- As alterações morfológicas teciduais observadas no fígado incluíram degeneração hidrópica, hepatite focal e não específica, necrose; demonstraram injúria hepática induzida por (PhTe)₂ em concentrações de 10 µmol/kg e 50 µmol/kg durante 7 e 14 dias e 250 µmol/kg em dose única.
- As alterações morfológicas teciduais observadas no rim incluíram degeneração vacuolar, atrofia de túbulos renais, hipertrofia de túbulos renais, formação de moldes hialinos e necrose tubular aguda (NTA) após indução por (PhTe)₂ em concentrações de 10 µmol/kg e 50 µmol/kg durante 7 e 14 dias e 250 µmol/kg em dose única.
- As alterações morfológicas teciduais observadas no pulmão incluíram edema e congestão pulmonar em áreas focais do parênquima após indução por (PhTe)₂ em concentrações altas de 50 µmol/kg durante 7 e 14 dias e 250 µmol/kg em dose única.
- As alterações morfológicas teciduais observadas no cérebro incluíram vacuolização tecidual representada por espongiose e status espogioso, perda da viabilidade neuronal e astrocitária, ativação astrocitária, gliose reativa, desmielinização e sugerem um papel desse composto na perda de sinapses e possível prejuízo na transmissão sináptica.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Tendo em vista a escassez de estudos relacionados à avaliação anatomopatológica dos tecidos do organismo após a exposição ao $(\text{PhTe})_2$, este trabalho apresenta-se como um dos poucos sobre o assunto. Resultados interessantes ligados a alterações teciduais em diferentes concentrações e tempo de exposição ao composto no fígado, rim, pulmão e cérebro puderam ser demonstrados. A análise microscópica do fígado revelou degeneração hidrópica, hepatite focal e necrose. De acordo com evolução do processo, tempo de exposição e tipo de agente injuriante, a hepatite poderá assumir formas clínicas mais graves, incluindo hepatite colestática (com acúmulo de bile nos hepatócitos), hepatite com necrose maciça ou submaciça, podendo levar à falência hepática fatal. O tecido renal mostrou-se vulnerável à exposição ao $(\text{PhTe})_2$ por via s.c, uma vez que apresentou alterações teciduais tubulares, como atrofia, hipertrofia de túbulos, degeneração hidrópica de células tubulares e necrose tubular aguda. Diante desses resultados, a fisiologia renal será extremamente prejudicada, podendo haver alteração da filtração e reabsorção renal com albuminúria, hematúria e, dependendo do grau de acometimento, levar à insuficiência renal. Apesar de o pulmão não ter sido exposto à inalação, sua via direta de intoxicação, os resultados da análise microscópica, neste estudo, demonstraram os primeiros dados anatomopatológicos relatando edema e congestão vascular pulmonar. Essas alterações estão relacionadas à hipertensão pulmonar e, em estágios avançados do processo, à edema agudo de pulmão, por vezes, fatal ao indivíduo. A neurotoxicidade, sob a visão anatomopatológica, trouxe confirmação de estudos anteriores, como as alterações espongiiformes ou vacuolares. Também, demonstrou degeneração do tecido cerebral, que pode levar à atrofia cerebral, já relatada anteriormente em estudos com o $(\text{PhTe})_2$. A reação astrocitária, presente nos bordos das lesões, demonstra a ação lesiva do composto no tecido cerebral. Outro achado, neste estudo, de grande importância sob o ponto de vista anatomopatológico e funcional, é a morte neuronal por apoptose no hipocampo. Essa estrutura do SNC é considerada a principal sede da memória e importante componente do sistema límbico. Além disso, com a avaliação imunoistoquímica das vesículas pré-sinápticas, é plausível a

sugestão de um papel desse composto na perda de sinapses e possível prejuízo na transmissão sináptica.

Este estudo poderá ser ampliado com a concretização de novos objetivos:

- Identificar, através de métodos imunoistoquímicos com anticorpo anti-NOGO-A, o qual demonstra membranas mielínicas e oligodendrócitos, a quantificação de perdas (morfometria) dos componentes mielínicos.
- Realizar testes comportamentais ligados à avaliação das transmissões sinápticas.
- Avaliar, através de técnica de imunofluorescência, a presença de astrócitos (GFAP) e ativação da micróglia (CD 11B).
- Realizar estudo anatomopatológico de cérebro, através de cortes sagitais seriados a fim de realizar mapeamento das alterações morfológicas.

REFERÊNCIAS

ABDELHALIM, M. A.; JARRAR, B. M. Gold nanoparticles induced cloudy swelling to hydropic degeneration, cytoplasmic hyaline vacuolation, polymorphism, binucleation, karyopyknosis, karyolysis, karyorrhesis and necrosis in the liver. **Lipids Health Disease**, v. 10, p. 166, 2011.

ALCOCER-VARELA, J. et al. Effect of the new immunoregulator AS-101 on in vitro functions of mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 77, n. 3, p. 319-323, 1989.

AMOOZEGAR, M. A. et al. Isolation and initial characterization of the tellurite reducing moderately halophilic bacterium, *Salinicoccus* sp. strain QW6. **Microbiological Research**, v. 163, p. 456-465, 2008.

ÁVILA, D. S. et al. A possible neuroprotective action of a vinylic telluride against Mn-induced neurotoxicity. **Toxicological Science**, v. 115, p. 194-201, 2010.

BARDEHLE, S. et al. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. **Nature Neuroscience**, v. 16, p. 580-586, 2013.

BLANK, M. et al. The effect of the immunomodulator agent AS101 on interleukin-2 production in systemic lupus erythematosus (SLE) induced in mice by a pathogenic anti-DNA antibody. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 79, n. 3, p. 443-447, 2008.

BORGES, V. C.; ROCHA, J. B. T.; NOGUEIRA, C. W. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. **Toxicology**, v. 15, n. 215(3), p. 191-197, 2005.

BRIGHAM, K. L. Role of free radicals in lung injury. **Chest**, v. 89, n. 6, p. 859-863, 1986.

BUJA, L. M.; EIGENBRODT, M. L.; EIGENBRODT, E. H. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 117, p. 1208-1214, 1993.

CARLTON, W. W; KELLY, W. A. Tellurium toxicosis in Pekin ducks. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 2, p. 203-214, 1967.

CASTRO, M. E. et al. Expression of *Aeromonas caviae* ST pyruvate dehydrogenase complex components mediate tellurite resistance in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 380, p. 148-152, 2009.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress, **Free Radic Biol Med**, 29(3-4), p. 323-333, 2000.

CHASTEEN, T.; BENTLEY, R. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. **Chemical Reviews**, v. 103, p. 1-26, 2003.

CIRILO, G.; IEMMA, F. **Antioxidant Polymers: Synthesis, Properties, and Applications**. New Jersey: Scrivener Publishing, 2012.

COMPARSI, B. et al. Diphenyl ditelluride targets brain selenoproteins in vivo: inhibition of cerebral thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in mice after acute exposure. **Molecular & Cellular Biochemistry**, v. 370, v. 1-2, p. 173-182, 2012.

CULLEN, J. M. Mechanistic classification of liver injury. *Toxicologic Pathology*, v. 33, p. 6-8, 2005.

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

DEMEIO, R. H.; JETTER, W. W. Tellurium: the toxicity of ingested tellurium dioxide for rats. **The Journal of industrial hygiene and toxicology**, v. 30, p. 53-58, 1948.

DITTMER, D. C. Tellurium. **Chemical and Engineering News**, v. 81, p. 81-128, 2003.

DUCKETT, S. Teratogenesis caused by tellurium. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 17, n. 192, p. 220-226, 1972.

EMANUELLI, T. et al. 5-Aminolevulinic acid inhibits [3H]muscimol binding to human and rat brain synaptic membranes. **Neurochemical Research**, v. 26, n. 2, p. 101-105, 2001.

ENGMAN, L. et al. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 23, p. 5091-5100, 2003.

ENGMAN, L. Synthetic applications of organotellurium chemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 18, n. 9, p. 274-279, 1985.

ENGMAN, L. et al. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium antioxidants. **Anti-Cancer Drugs**, v. 14, n. 2, p. 153-161, 2003.

ENGMAN, L. Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, p. 441-452, 1995.

FAIRHILL, L. T. Tellurium. In: **Industrial Toxicology**. New York: Hafner Publishing Co., 1969.

FAWCETT, J. W.; ASHER, R. A. The glial scar and central nervous system repair. **Brain Res Bull**, v. 49, n. 6, p. 377-391, 1999.

FRIBERG, L.; NORDBERG, G.; VOUK, V. B. **Handbook on the Toxicology of Metals: specific metals**. New York, NY: Elsevier, v. 2, 1986.

GERHARDSSON, L.; GLOVER, J. R.; NORDBERG, G. F.; VOUK, V. Tellurium. In: FRIBERG, L.; NORDBERG, G. F.; VOUK, V. B. (Eds). **Handbook on the toxicology of metals**. 2nd Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1986. p. 532-548.

GLYNNE, P. A.; PICOT, J.; EVANS, T. J. Coexpressed nitric oxide synthase and apical beta(1) integrins influence tubule cell adhesion after cytokine-induced injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 11, p. 2370-2383, 2001.

GOMES, F. C. A.; PAULIN, D.; MOURA NETO, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 5, p. 619-631. 1999.

GONATAS, N. K.; TERRY, R. D.; WEISS, M. Eletronmicroscopic study in two cases of Jakob-Creutzfeld disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 24, p. 575-598, 1965.

GONÇALVES, T. L. et al. δ -ALA-D activity is a reliable marker for oxidative stress in bone marrow transplant patients. **BMC Cancer**, v. 9, v. 138, p. 1-10, 2009.

GOODRUM, J. F. Role of Organotellurium Species in Tellurium Neuropathy. **Neurochemical Research**, v. 23, p. 1313-1319, 1998.

GRACA, D. L.; BLAKEMORE, W. F. Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, 12: 593–605, (1986).

GREAVES, P. et al. "Have you seen this?" Diffuse hepatic apoptosis. **Toxicology and Pathology**, v. 29, p. 398-400, 2001.

GREEN, M. et al. A facile route to CdTe nanoparticles and their use in bio-labelling. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, p. 1989-1994, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTIERRE, J. M. C. **Free radical in medicine and biology**. Claredon Press: London, 2000.

HEIMFARTH, L. et al. Cross-talk among intracellular signaling pathways mediates the diphenyl ditelluride actions on the hippocampal cytoskeleton of young rats. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 10, p. 1754-1764, 2011.

HEIMFARTH, L. et al. Diphenyl ditelluride induces hypophosphorylation of intermediate filaments through modulation of DARPP-32-dependent pathways in cerebral cortex of young rats. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 2, p. 217-230, 2012a.

HEIMFARTH, L. et al. Disrupted cytoskeletal homeostasis, astrogliosis and apoptotic cell death in the cerebellum of preweaning rats injected with diphenyl ditelluride. **Neurotoxicology**, v. 34, p. 175-188, 2013.

HEIMFARTH, L. et al. Effects of in vivo treatment with diphenyl ditelluride on the phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex and hippocampus of rats. **Neurotoxicology**, v. 29, pp. 40-47, 2008.

HEIMFARTH, L. et al. In vivo treatment with diphenyl ditelluride induces neurodegeneration in striatum of young rats: implications of MAPK and Akt pathways. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 264, n. 2, p. 143-52, 2012b.

HIDROPIC change. Disponível em: <<http://howmed.net/pathology/hydropic-change>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

JORGENSEN, P. L. Structure, function and regulation of Na⁺K⁺ ATPase in the kidney. **Kidney International**, v. 29, p. 10-20, 1986.

KAPLOWITZ, N. Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. **Seminars in Liver Disease**, v. 22, p. 137-144, 2002.

KEALL, J. H.; MARTIN, N. H.; TUNBRIDGE, R. E. A report of three cases of accidental poisoning by sodium tellurite. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 3, p. 175-176, 1946.

KIMMERLE, G. Comparative studies on the inhalation toxicity of selenium sulfide and tellurium hexafluoride. **Archives of Toxicology**, v. 18, p. 140-144, 1960.

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

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, v. 16: p. 3-11, 2009.

KUMAR, D. et al. Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin-diabetic rat kidney. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 96, p. 77-88, 2004.

LAMPERT, P. W.; GAJDUSEK, D. C.; GIBBS, J. C. J. Subacute spongiform virus encephalopathies. Scrapie, Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: a review. **The American Journal of Pathology**, v. 68, p. 626-652, 1972.

LAMPERT, P. W.; SCHOCHET, S. S. 1968. Electron microscopic observations on experimental spongy degeneration of the cerebellar white matter. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 27, p. 210-220, 1968.

LEE, J. H. et al. Tellurium compound AS101 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by VLA-4 inhibition and suppression of monocyte and T cell infiltration into the CNS. **Neuromolecular Medicine**, v. 16, n. 2, p. 292-307, 2014.

LIMA, C. B. C. et al. A Novel Organotellurium Compound (RT-01) as a New Antileishmanial Agent. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. 3, p. 213-218, 2009.

MACHADO-SALAS, J. P. Dendritic and axonal spherules in the neocortex of a patient with Creutzfeldt-Jakob disease: a golgi study. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 89, p. 93, 1989.

MACIEL, E. M. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 310-319, 2000.

MACIEL, E. M.; ROCHA, J. B. T.; FOLMER, V. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, p. 470-476, 2003.

MASTERS, C. L.; RICHARDSON, E. P. J. Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change. **Brain**, v. 101, p. 333-344, 1978.

MCCMAHON, H. T. et al. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. **Neurobiology**, v. 93, pp. 4760-4764, 1996.

MEDINA, J. et al. Approach to the pathogenesis and treatment of Non-alcoholic steatohepatitis. **Diabetes Care**, v. 27, n. 8, p. 2057-2066, 2004.

MEINERZ, D. F. et al. Evaluation of the biological effects of (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate, a new telluroamino acid derivative of aspartic acid. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 43-49, 2011.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 712-750, 1983.

MELOV, S. et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. **Nature Genetics**, v. 18, p. 159-163, 1998.

MEOTTI, F. C. et al. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicology Letters**. v. 5, n. 143, p. 9-16, 2003.

MORETTO, M. B. et al. Voltage-dependent ebselen and diorganochalcogenides inhibition of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into brain synaptosomes. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 3, p. 154-160, 2003.

MORETTO, M. B. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. **Toxicology**, v. 210, p. 213-222, 2005.

MORGAN, D. L. et al. Comparative Pulmonary Absorption, Distribution, and Toxicity of Cooper Gallium Diselenide, Cooper Indium Diselenide, and Cadmium Telluride in Sprague-Dawley Rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 147, p. 399-410, 1997.

MÜLLER, R. et al. Tellurium-intoxication. **Klinische Wochenschrift.**, v. 67, n. 22, p. 1152-1155, 1989.

MYCEK, M. J.; HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C. **Farmacologia ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre : Artmed, 1998.

NÁDASDY, T. et al. Tubular atrophy in the end- stage kidney: a lectin and immunohistochemical study. **Human Pathology**, v. 25, p. 22-28, 1994.

NEFROPATIA do mieloma Lâm. A. 142. **Unicamp**. Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/lamuro8.html>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

NOGUEIRA, C. W. et al. Organochalcogens effects on δ -aminolevulinatase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology**, v. 191, n. 2-3, p. 169-178, 2003a.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. **Organic Selenium and Tellurium Compounds**, 2012.

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

NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. **Brain Research**, v. 906, p. 157-163, 2001.

OKUN, E. et al. The organotellurium compound ammonium trichloro (dioxoethylene-0,0') tellurate enhances neuronal survival and improves functional outcome in an ischemic stroke model in mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 4, p. 1232-1241, 2007.

PERROT, R.; EYER, J. Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders. **Brain Research Bulletin**, v. 28, n. 80(4-5), p. 282-295, 2009.

PESSOA-PUREUR, R.; HEIMFARTH, L.; ROCHA, J. B. T. Signaling Mechanisms and Disrupted Cytoskeleton in the Diphenyl Ditelluride Neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 34, p. 175-188, 2014.

PETRAGNANI, N.; STEFANI, H. A. **Tellurium in Organic Synthesis**, 2. ed. Academic Press: London, 2007.

PINTON, S. et al. Diphenyl ditelluride induces neurotoxicity and impairment of developmental behavioral in rat pups. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 21, n. 11, p. 2130-2137, 2010.

PUNTEL, R. L. et al. Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: effect of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. **Chemico-biological interactions**, v. 165, n. 2, p. 87-98, 2007.

RACUSEN, L. C. Epithelial cell shedding in acute renal injury. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 25, n. 3-4, p. 273-275, 1998.

REDDY, J. K.; RAO, M. S. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 5, p. 852-858, 2006.

REN, X. A novel cyclodextrin-derived tellurium compound with glutathione peroxidase activity. **ChemBiochem**, v. 2, n. 3(4), p. 356-363, 2002.

RIVERA-ZENGOTITA, M.; YACHNIS, A. T. Gliosis Versus Glioma?: Don't Grade Until You Know. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 19, n. 4, p. 239-249, 2012.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2010.

ROMAN, S. S. et al. Diphenyl ditelluride effect on embryo/fetal development in mice: Interspecies differences. **Toxicology**, v. 231, p. 243-249, 2007.

ROOSEBOOM, M. et al. Comparative study on the bioactivation mechanisms and cytotoxicity of Te-phenyl-L-tellurocysteine, Se-phenyl-L-selenocysteine, and S-phenyl-L-cysteine. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 12, p. 1610-1618, 2002.

ROVER JR., L.; HEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

ROY, S.; HARDEJ, D. Tellurium tetrachloride and diphenyl ditelluride cause cytotoxicity in rat hippocampal astrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2564-2574, 2011.

SAILER, B. L. et al. Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Archives of Toxicology*, v. 77, n. 1, p. 30-36, 2003.

SAILER, B. L. et al. Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 4, p. 475-482, 2004.

SAVEGNAGO, L. et al. Evaluation of antioxidant activity and potential toxicity of 1-buthyltelurenyl-2-methylthioheptene. **Life sciences**, v. 79, n. 16, p. 1546-1552, 2006.

SOUZA, A. C. et al. 2-Phenylethynyl-butyltellurium enhances learning and memory impaired by scopolamine in mice. **Behavioral Pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 249-254, 2013.

SOUZA, A. C. et al. Antioxidant effect of a novel class of telluroacetylene compounds: studies in vitro and in vivo. **Life Science**, v. 84, n. 11-12, p. 351-357, 2009.

SOUZA, A. C. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride: neurotoxic effect in brain of young rats, in vitro. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 340, n. 1-2, p. 179-185, 2010.

SREDNI, B. et al. A new immunomodulating compound (AS-101) with potential therapeutic application. **Nature**, v. 330, p. 173-176, 1987.

SREDNI, B. et al. The biological activity and immunotherapeutic properties of AS-101, a synthetic organotellurium compound. **Nat Immun Cell Growth Regul**, v. 7, n. 3, p. 163-168, 1988.

STANGHERLIN, E. C. et al. Exposure to diphenyl ditelluride, via maternal milk, causes oxidative stress in cerebral cortex, hippocampus and striatum of young rats. **Archives of Toxicology**, v. 83, n. 5, p. 485-491, 2009.

STANGHERLIN, E. C. et al. Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. **Toxicology**, v. 207, n. 2, p. 231-239, 2005.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 6, p. 563-58, 1999.

TAKAHASHI, T. Experimental study on segmental demyelination in tellurium neuropathy. **Hokkaido Igaku Zasshi**, v. 56, n. 2, p. 105-131, 1981.

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

TOPCHIEVA, A. et al. An inducible tellurite-resistance operon in *Proteus mirabilis*. **Microbiology**, v. 149, p. 1285-1295, 2003.

WAGNER, M.; TOEWS, A. D.; MORELL, P. Tellurite specifically affects squalene epoxidase: investigations examining the mechanism of tellurium-induced neuropathy. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, p. 2169-2176, 1995.

WAGNER-RECIO, M.; TOEWS, A. D.; MORELL, P. Tellurium blocks cholesterol synthesis by inhibiting squalene metabolism: preferential vulnerability to this metabolic block leads to peripheral nervous system demyelination. **Journal of Neurochemistry**, v. 57, p. 1891-1901, 1991.

WAKEFORD, R. The Windscale reactor accident- 50years on. **Journal of Radiological Protection**, v. 27, p. 211-215, 2007.

WARE, L. B.; MATTAY, M. A. Clinical practice. Acute pulmonary edema. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 26, p. 2788-2796, 2005.

WHITELEY, J. D.; MURRAY, F. Determination of platinum group elements (PGE) in environmental samples by ICP-MS: a critical assessment of matrix separation for the mitigation of interferences. **Geochemical Journal**, v. 5, p. 3-10, 2005.

WILSON, D. M. et al. Evaluation of genotoxicity, pathological lesions, and cell proliferation in livers of rats and mice treated with furan. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 19, p. 209-222, 1992.

XIE, L. et al. The immunomodulator AS101 suppresses production of inflammatory cytokines and ameliorates the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 15, n. 273(1-2), p. 31-41, 2014.

ZHANG, D. et al. Astroglialosis in CNS Pathologies: Is There A Role for Microglia? **Molecular Neurobiology**, v. 41, n. 2-3, p. 232-241, 2010.

ZIMMERMAN, H. J. Drug-induced liver disease. **Clinics in Liver Disease**, v. 4, p. 73-96, 2000.