

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**

**ÁREA DO CONHECIMENTO DAS CIÊNCIAS  
DA VIDA**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE TEMOZOLOMIDA  
E DITELURETO DE DIFENILA EM LINHAGENS  
CELULARES DE GLIOBLASTOMA**

**JÉSSICA SILVEIRA SOLDATELLI**

Caxias do Sul

2018

JÉSSICA SILVEIRA SOLDATELLI

EFEITOS NA COMBINAÇÃO DE TEMOZOLOMIDA E DITELURETO  
DE DIFENILA EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOBLASTOMA

Dissertação apresentada ao  
programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia da Universidade de  
Caxias do Sul, visando à obtenção  
do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientação: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Co-orientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Mariana Roesch Ely

Caxias do Sul

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

S684e Soldatelli, Jéssica Silveira

Efeitos na combinação de temozolomida e ditelureto de difenila em linhagens celulares de glioblastoma / Jéssica Silveira Soldatelli. – 2018.  
71 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.

Orientação: João Antonio Pêgas Henriques.

Coorientação: Mariana Roesch Ely.

1. Cérebro - Tumores. 2. Gliomas. 3. Câncer. I. Henriques, João Antonio Pêgas, orient. II. Ely, Mariana Roesch, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 616.831-006

Catalogação na fonte elaborada pela(o)  
bibliotecária(o) Michele Fernanda  
Silveira da Silveira - CRB 10/2334

# JÉSSICA SILVEIRA SOLDATELLI

## EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE TEMOZOLOMIDA E DITELURETO DE DIFENILA EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOBLASTOMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientação: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Co-orientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Mariana Roesch Ely

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05 JULHO DE 2018.

---

Prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques

---

Profa. Dra. Mariana Roesch Ely

---

Profa. Dra. Mirian Salvador

---

Prof. Dr. Leandro Tasso

---

Profa. Dra. Daniela Steffens

*“The real voyage of discovery  
consists not in seeking new landscapes,  
but in having new eyes.”*

**Marcel Proust**

## AGRADECIMENTOS

Ao final desse trabalho, gostaria de começar agradecendo meus orientadores:

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques, a minha mais sincera e especial gratidão pela amizade, pela confiança e conhecimentos compartilhados de maneira constante. Desde o momento em que aceitou orientar-me mostrou-se não somente um grande pesquisador, mas um grande ser humano. Agradeço por ser uma de minhas inspirações científicas, pelos ensinamentos ao longo desses anos do mestrado, por possibilitar meu crescimento profissional e pessoal, prospectando meus passos futuros.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Mariana Roesch Ely, sou extremamente grata por me receber em seu laboratório, fazendo-se presente em cada etapa desse trabalho. Foi indispensável contar com seus ensinamentos, apoio de sempre e exemplo de profissional.

À Dra. Ana Paula Carneiro Brandalize sou grata por ter me apresentado assuntos que me fizeram amar ainda mais a pesquisa, pela importante contribuição ao meu projeto de mestrado e por ter auxiliado meus primeiros passos dentro do laboratório.

À Dra. Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar, da Universidade Federal de Santa Catarina, agradeço por ter gentilmente cedido a linhagem “GBM”, de glioma.

Muitos foram os colegas que se tornaram especiais na minha vida ao longo desse projeto. São grandes pessoas, que além de exemplos profissionais levo como queridos amigos de vida.

À Fernanda Munari, minha mais especial colega e amiga, da qual sou uma grande fã em inúmeros aspectos. Minha eterna gratidão por cada dia que passou comigo, me ajudando, ensinando, conversando, refletindo, estudando, trabalhando, dividindo momentos tão importantes dessa jornada. À ela, além do meu muito obrigada, desejo as melhores vibrações, que a vida a presenteie com alegrias diárias e sucesso profissional; que possamos ainda compartilhar muitas risadas e trabalho duro.

À Michelle Lima, sou imensamente grata por todo apoio, acompanhamento dos experimentos em Porto Alegre, por me receber em sua casa com ótimas conversas e refeições deliciosas. Mich, não canso de te agradecer, valeu por tudo

mesmo!!! Também espero dividir outros momentos contigo, de descontração e trabalho.

Igualmente, minha imensa gratidão ao André Juchem, o qual mesmo de longe esteve disposto a ensinar e ajudar. Valeu! Tenho um carinho especial por todos que conheci no “Lab de Porto”.

Ao Iuri Ufa! Parecia que não ia terminar nunca! Mas foi apenas a primeira parte que chegou ao fim. Quando um ciclo se fecha e fazemos uma pausa para colocar o ponto final, percebemos que outro já foi iniciado e, será muito bom poder contar com alguém como ele nos projetos futuros. Um pesquisador sério e competente; que em apenas um mês conversou comigo mais do que outros amigos de uma vida inteira. Obrigada pela parceria, pelas dicas (às vezes obedecidas) e conselhos (jamais seguidos)! Valeu pela importante contribuição ao trabalho e a pessoa diferenciada que é.

Aos colegas do Laboratório de Gênômica, Proteômica e Reparo de DNA, sou grata pelos ensinamentos, pela troca de ideias, pela ajuda e pela amizade. Cada um deixou uma importante contribuição em minha vida; aprendi imensamente com vocês. As horas de trabalho no laboratório permitiram-me conquistar amigas de vida, a quem desejo felicidades e conquistas diárias. Chene, Gabi, Allana, Jéssica: vocês foram indispensáveis nessa jornada. Não tenho palavras para expressar minha gratidão por terem estado comigo nos momentos mais alegres e mais difíceis também.

Emocionada e de coração, agradeço à minha família, sem a qual nada seria e nada teria. Em especial aos meus pais Jane e Jair, por serem meus exemplos de amor e dedicação e por quem eu sou. Igualmente, sou grata à Deus, pelo dom da vida, sem o qual nada disso seria possível.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1 CÂNCER .....	16
2.2 CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS GLIOMAS .....	18
2.3 TRATAMENTO ANTINEOPLÁSICO CONTRA GLIOBLASTOMAS ....	20
2.4 TELÚRIO E COMPOSTOS ORGANOTELURADOS.....	24
2.5 DITELURETO DE DIFENILA.....	27
2.6 RESISTÊNCIA A QUIMIOTERÁPICOS E COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS .....	30
3. OBJETIVO GERAL.....	34
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
4. RESULTADOS .....	35
4.1 CAPÍTULO 1 .....	36
5. DISCUSSÃO GERAL .....	55
6. CONCLUSÃO GERAL.....	60
6.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	60
7. PERSPECTIVAS .....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura química da temozolomida ( $C_6H_6N_6O_2$ ), abreviada 21  
TMZ, de massa molar de 194,1 g/mol.
- Figura 2** - Estrutura química do ditelureto de difenila ( $C_6H_5Te$ )<sub>2</sub>, abreviado 28  
Ph<sub>2</sub>Te<sub>2</sub>, de massa molar de 409,42 g/mol.

### Capítulo I

- Figure 1** - Cell viability of M059J and GBM cell lines after TMZ exposure 43  
for 120 h. Data were analyzed by One Way ANOVA Dunnet: \*  $p < 0.001$ ; \*\*  
 $p < 0.05$ . Results are expressed in by the mean  $\pm$  standard deviation.
- Figure 2** - Cumulative Population Doubling. The M059J (A) and GBM (B) 44  
cells were treated with 25, 50, 100  $\mu$ M TMZ for 120 h, followed by growth  
in the drug-free medium (DFM).
- Figure 3** - Flow cytometry analysis of AO staining in (A) M059J cells 45  
treated with 120 h of TMZ; (B) GBM cells treated with 120 h of TMZ.
- Figure 4** - (A) Viability of M059J and GBM cell lines after 24 h of DPDT 46  
exposure. Bars indicate standard deviation. (B) Viability of M059J and  
GBM cell lines after 120 h of DPDT exposure. Data were analyzed by One  
Way ANOVA Dunnet: \*  $p < 0.001$ . Results are expressed in by the mean  $\pm$   
standard deviation.
- Figure 5** - Comparative graph of cell viability using IC<sub>50</sub> of isolated TMZ 47  
and DPDT and on a co-exposure (TMZ IC<sub>50</sub> +DPDT IC<sub>50</sub>). Each bar  
represents the mean survival percentage  $\pm$  SD relative to the control, which  
was normalized to 100% and correspond to the statistical difference using  
one way ANOVA Tukey's multiple comparison test (a, b, c  $p < 0.0001$ ).

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1.</b> IC <sub>50</sub> Values for 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide Assay – Temozolomide and Diphenyl Ditelluride exposure .....	46
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AS-101</b>	Telurato de tricloro amônio dioxoetileno-O,O'
<b>ACNU</b>	Nimustina (3-[(4-amino-2-metil-5-pirimidinil) metil]-1-(2-chloroetil)-1-nitrosourea hidrocloreto)
<b>AKT</b>	Proteína quinase B ( <i>Protein kinase B</i> )
<b>BCNU</b>	Camustina (1,3-Bis[2-chloroetil]-1-nitrosourea)
<b>BER</b>	Reparo por excisão de base ( <i>Base excision repair</i> )
<b>Chk1</b>	Checkpoint de Cinase 1 ( <i>Checkpoint kinase 1</i> )
<b>Chk2</b>	Checkpoint de Cinase 2 ( <i>Checkpoint kinase 2</i> )
<b>DDR</b>	Resposta de dano ao DNA ( <i>DNA damage response</i> )
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DTDF</b>	Ditelureto de difenila
<b>GBM</b>	Glioblastoma multiforme
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial ( <i>Glial fibrillary acidic protein</i> )
<b>GPx</b>	Glutationa peroxidase
<b>GSCS</b>	Células-tronco do glioma ( <i>Glioma stem cells</i> )
<b>GSH</b>	Glutationa
<b>GSSH</b>	Glutationa oxidada
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>MGMT</b>	O-6-metilguanina-metiltransferase
<b>MMR</b>	Reparo de bases mal-pareadas ( <i>Mismatch repair</i> )
<b>MTIC</b>	5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida
<b>Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase</b>	Sódio-potássio ATPase
<b>OT</b>	Organotelurados
<b>δ-ALA-D</b>	Ácido delta-aminolevulínico desidratase ( <i>δ-Aminolevulinic acid dehydratase</i> )
<b>PARP-1</b>	Poli (ADP-ribose) polimerase 1
<b>TMZ</b>	3,4-dihidro-3-metil-4-oxoimidazo-[5,1-de]-1,2,3,5-tetrazin-8-carboxamida (temozolomida)
<b>TOPOI</b>	Topoisomerase I
<b>TrxR</b>	Tiorredoxina redutase
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> )

## RESUMO

Os gliomas representam mais de 70% dos tumores cerebrais primários. Os glioblastomas multiformes são gliomas malignos caracterizados por baixa incidência, mas altas taxas de mortalidade. Apesar da responsividade inicial ao tratamento padrão realizado com o quimioterápico alquilante temozolomida (TMZ), poucos foram os avanços para o prognóstico dos pacientes nos últimos 10 anos. Isso deve-se ao fato desses tumores serem raramente passíveis de ressecção cirúrgica e apresentarem alta taxa de recorrência. Além disso, a eficácia de seu tratamento encontra barreiras como efeitos colaterais indesejáveis e resistência quimioterápica. Nesse cenário, a descoberta de novas substâncias que possam atuar com efeito aditivo ou sinérgico e aumentem a sensibilização de células tumorais ao tratamento, torna-se uma estratégia terapêutica no campo da oncologia. O ditelureto de difenila (DTDF) é um composto orgânico contendo telúrio que apresenta interessantes efeitos biológicos *in vitro*, como antioxidante, quimioprotetivo, citotóxico e antitumoral. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do DTDF e do quimioterápico TMZ, em regimes isolados e em associação. Para tal foram investigados seus efeitos citotóxicos, após exposição aguda e crônica, em culturas celulares de glioma não-resistente (M059J) e resistente à TMZ (GBM). No ensaio de viabilidade celular a TMZ apresentou citotoxicidade para as linhagens celulares testadas, com valor de IC<sub>50</sub> maior na linhagem resistente do que quando comparado à linhagem não-resistente. Este dado foi confirmado pelo teste de duplicação cumulativa de população e, também, pela coloração com laranja de acridina, após o tratamento de 120 h, por observar-se um aumento na frequência de células positivas para a formação de organelas vesiculares ácidas em ambas as linhagens, sendo predominantemente em células GBM. Além disso, foi observado que o tratamento associando DTDF e a TMZ apresentou uma maior citotoxicidade quando comparado aos tratamentos isolados, após 120 h de tratamento. Portanto, o DTDF sensibilizou as células ao tratamento com TMZ. Essa sensibilização ocorreu em níveis aproximados para ambas as linhagens, sendo os efeitos do DTDF independentes do perfil de resistência à TMZ. Em conjunto, os dados desse trabalho sugerem o uso do DTDF em associação à TMZ como uma estratégia para reduzir as doses de TMZ empregadas na clínica e diminuir efeitos colaterais aos pacientes em tratamento de glioma.

Palavras-chave: gliomas malignos, temozolomida, ditelureto de difenila, antitumoral.

## ABSTRACT

Gliomas represent more than 70% of primary brain tumors. Malignant gliomas are characterized by low incidence, but high mortality rates. Despite the initial responsiveness to the standard treatment with the chemotherapeutic alkylating temozolomide (TMZ), few advances have been made in the prognosis of patients in the last 10 years. This is due to the fact that these tumors are rarely amenable to surgical resection and have a high rate of recurrence. Moreover, the effectiveness of this treatment encounters barriers such as undesirable side effects and chemotherapeutic resistance. In this scenario, the discovery of new substances that may act with additive or synergistic effect and increase the sensitization of tumor cells to the treatment becomes a therapeutic strategy in the field of oncology. Diphenyl ditelluride (DPDT) is a derivative of tellurium used in various reactions of organic synthesis and has interesting *in vitro* biological effects, as antioxidant, chemoprotective, cytotoxic and antitumor agent. Therefore this work aimed to evaluate the cytotoxic effects of this organotellurium compound and the chemotherapeutic, TMZ, in isolated and in association regimens, after acute and chronic exposure, of non-resistant (M059J) and TMZ-resistant (GBM) glioma cells. Through the cell viability assay, it was shown that TMZ is cytotoxic for both cell lines tested, showing a higher  $IC_{50}$  value in the resistant line when compared to the other line. This data was confirmed by the cumulative population doubling test. In addition, by the acridine orange staining, it was verified that autophagy might favor the chemoresistance, although not being the main resistance mechanism in the lines tested. It was observed that DPDT clearly has a dose-dependent cytotoxic effect on the M059J and GBM cell lines, in a lower concentration range than that used with TMZ. DPDT sensitized the cells to TMZ treatment as evidenced by the decline in cell viability. It is important to point out that this sensitization occurred in low and approximate  $IC_{50}$  values after both 24 h and 120 h of treatment, being the effects of the DPDT independent of the resistance profile to TMZ. Taken together, data from this work suggest the use of DPDT in association with TMZ as an interesting strategy to reduce the doses of TMZ used in the clinic and to reduce side effects to patients under treatment of glioma.

Key words: malignant gliomas, temozolomide, diphenyl ditelluride, atitumor.

## 1. INTRODUÇÃO

O elemento telúrio (Te) foi descoberto durante uma exploração em minas de ouro na Hungria em 1782. Ele pertence à família dos calcogênios, grupo 16 da tabela periódica, assim como o enxofre e o selênio. As propriedades desse semi-metal são amplamente exploradas na área industrial, como na produção de aço, vidro, na manufatura de componentes eletrônicos e na indústria petroquímica. Esse elemento ainda pode ser utilizado em lubrificantes sólidos ou como um aditivo antidetonante de gasolina e na vulcanização da borracha. Mais recentemente, ele tem sido empregado no processo de síntese de explosivos e no desenvolvimento de alguns fármacos.

O Te está presente nas plantas e animais, mas é considerado um elemento não-essencial. Em humanos, geralmente não ultrapassa a presença de 500 mg no organismo, sendo sua principal fonte de exposição a ocupacional ou pela ingestão de alimentos, como carne, laticínios e cereais. Em casos de exposição aguda como ocupacionais e ambientais, mostra-se tóxico, dependendo do seu estado de oxidação, dose administrada e tipo do organismo exposto e pode causar dores de cabeça, sonolência, náusea, alteração da frequência cardíaca e um odor característico no hálito e na urina.

Mesmo que os mecanismos envolvidos nos efeitos farmacológicos e toxicológicos do Te em células eucariotas ainda sejam pouco conhecidos, as aplicações das suas formas inorgânica e orgânica (teluritos,  $\text{TeO}_3^{2-}$ , teluratos,  $\text{TeO}_4^{2-}$ , de metal alcalino), têm sido amplamente exploradas, por exibirem atividade antifúngica e antibiótica. Da mesma forma, o composto AS-101 (telurato de tricloro amônio dioxoetileno-O,O') se encontra em ensaios clínicos de fase II, devido seu potencial imunomodulador em pacientes com psoríase. Essa molécula foi capaz de diminuir a progressão da nefropatia diabética em ratos e apresentou atividade de modulação redox, potencial imunomodulador e potencial antitumoral em ratos e culturas celulares. Além disso, compostos orgânicos contendo Te são considerados promissoras moléculas com potencial antitumoral, relacionado com as suas propriedades citotóxicas, e/ou efeito quimioprotetor.

Frente ao exposto, o composto orgânico contendo telúrio, ditelureto de difenila (DTDF), é uma molécula simples e estável, que apresenta efeitos genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos em roedores, devido à sua capacidade de oxidar grupamentos tiólicos, tendo reflexo no metabolismo proteico celular. Além disso, seu efeito citotóxico também foi observado nas linhagens HL-60, HT-29 e Caco-2, nas quais induziu apoptose. Esses resultados sugerem um potencial antiproliferativo da molécula. Por outro lado, em baixas concentrações, esse composto pode apresentar potencial quimioprotetivo, reduzindo os efeitos genotóxico e mutagênico de diferentes mutágenos em fibroblastos de hamster chinês (células V79). No caso da terapêutica anticâncer, essas duas faixas são interessantes: no intervalo de concentração segura, investiga-se o potencial quimiopreventivo dos compostos, porém em concentrações mais elevadas, investiga-se a atividade citotóxica, a qual é importante do ponto de vista de erradicação das células tumorais.

Apesar do avanço tecnológico que tornou as técnicas diagnósticas mais sensíveis e as estratégias terapêuticas mais eficazes, a falta de seletividade dos fármacos e a resistência quimioterápica contribuem para o aumento da malignidade de cânceres, principalmente como os gliomas. Esses são tumores primários do sistema nervoso central originados de transformações malignas das células da macróglia, caracterizados pelo seu crescimento rápido e progressivo, baixas taxas de incidência e altas taxas de mortalidade.

Dentre os gliomas de grau IV, o glioblastoma multiforme (GBM) merece destaque, por que não ocorreram avanços nos últimos dez anos, no que se refere a novas estratégias terapêuticas. Atualmente, a terapia padrão do GBM é composta por cirurgia, radioterapia e quimioterapia concomitante e adjuvante com o agente temozolomida (TMZ), enquanto que para o GBM recorrente utiliza-se o bevacizumabe. No entanto, o tratamento com fármacos isolados vem mostrando-se ineficaz em induzir respostas completas ou parciais significativas nos pacientes.

Portanto, faz-se necessário o estudo das neoplasias de natureza extremamente agressiva e a validação de novos agentes quimioterápicos que atinjam populações celulares em diferentes fases do ciclo celular. Desta forma, busca-se diminuir o desenvolvimento de resistência às drogas, promover avanço na resposta terapêutica e aumentar a qualidade de vida do paciente.

Considerando tal cenário e os recentes estudos farmacológicos com os compostos organotelurados, o presente trabalho procurou avaliar os efeitos do DTDF, e do quimioterápico amplamente utilizado, TMZ, em regimes isolados e em associação. Para tal, foram avaliados seus efeitos citotóxicos, após exposição aguda e crônica, de culturas celulares de glioma não-resistente e resistente à TMZ.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER

O câncer é uma doença crônica cujas projeções estatísticas mundiais revelam 10 milhões de novos diagnósticos a cada ano (WHO, 2017) e mostram que essa irá superar as doenças cardíacas como principal causa de morte nos próximos anos (Siegel, Miller & Jemal, 2015). No cenário mundial, verifica-se que o câncer é a causa de uma em cada sete mortes. Nos Estados Unidos, uma em cada quatro mortes está relacionada a esta patologia (ACS, 2015), mesma proporção observada no Reino Unido (Cancer Research UK, 2014). No cenário brasileiro, para o biênio 2018-2019, estima-se o registro de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer para cada ano, com prevalência aproximada de 217/100 mil nos homens, e 191/100 mil nas mulheres (INCA, 2018).

Sabe-se que o câncer é uma condição patológica complexa (Phillips & Currow, 2010; Fayyaz *et al.*, 2016). Trata-se de um conjunto de doenças geradas pelo acúmulo de mutações genéticas, as quais conferem vantagens adaptativas para multiplicação e disseminação descontroladas das células, formando tumores (Sale, 2013; Schaefer & Serrano, 2016). Este processo de transformação é caracterizado pela angiogênese sustentada, autossuficiência em sinais de crescimento, resistência a sinais de anti-crescimento, antiproliferação e pró-apoptóticos, potencial replicativo ilimitado pela sobrevivência celular prolongada, capacidade de gerar metástase e invasão tecidual, evasão da destruição imunológica, instabilidade genômica e mutação, reprogramação do metabolismo energético e inflamação promotora de tumores (Hanahan & Weinberg, 2011).

O progresso nas áreas da genética e biologia molecular propicia novas possibilidades para o diagnóstico mais sensível e específico de doenças, bem como acompanha o aumento da expectativa de vida da população mundial. Isso se deve ao melhoramento de diretrizes terapêuticas, as quais se direcionam para ações de suporte e manejo de um tratamento cada vez mais individualizado e personalizado (Pritchard *et al.*, 2017).

O aumento da expectativa de vida, a melhoria e a evolução dos métodos diagnósticos e da qualidade dos sistemas de informação dos países é proporcional às taxas de incidência e prevalência de diversas doenças, sendo uma delas o câncer (GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2016).

Quanto à terapêutica, o regime padrão para grande parte dos cânceres é feita pela tríade terapêutica, composta de ressecção cirúrgica, quando possível, seguida de radioterapia e/ou a utilização de fármacos que podem alcançar altos índices de citotoxicidade (quimioterapia), principalmente, em células com alta taxa proliferativa (INCA, 2018). Além da abordagem terapêutica convencional, outros agentes biológicos são testados em um grande número de ensaios clínicos, mas revelam em sua maioria pequenas melhorias ao paciente no momento em que esbarram em barreiras como efeitos colaterais indesejáveis, falta de seletividade dos fármacos e a resistência quimioterápica (Padma, 2015). Esses são fatores que contribuem para o aumento da malignidade de cânceres como os gliomas (Andren-Sandberg, 2011; Omuro & Deangelis, 2013).

Muitos são os desafios para o tratamento do câncer, sendo ainda que sua etiologia é caracterizada, principalmente, pelo acúmulo de alterações genéticas em uma ou em um pequeno grupo de células, conhecidas como células-tronco do tumor, que se mantêm silenciosas e indetectáveis por, até mesmo, muitos anos (Hu & Kesari, 2018). Portanto, o câncer acaba mostrando um caráter de doença crônica em que, de acordo com o perfil de cada neoplasia e organismo, seu desenvolvimento pode se estender por anos, período em que o paciente passa por modificações no seu processo vital, com significativa morbidade física e psicológica. Desta forma, mesmo que não haja cura para tal condição é necessária a elucidação de mecanismos envolvidos desde o processo carcinogênico até a quimiorresistência e metástase. Aliado a isso, os avanços nas pesquisas clínicas e o uso combinado de fármacos buscam atingir diferentes vias nos estágios da progressão tumoral, promovendo sobrevida, monitorando o desenvolvimento do tumor e promovendo a manutenção da terapêutica (Phillips & Currow, 2010).

## 2.2 CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS GLIOMAS

Os gliomas são tumores primários do sistema nervoso central originados de transformações malignas das células da macróglia: oligodendrócitos, astrócitos, células de Schwann e células endoteliais. São caracterizados pelo seu crescimento rápido e progressivo, baixas taxas de incidência e altas taxas de mortalidade, ambas com tendência a aumentar nos próximos anos, especialmente nos países em desenvolvimento (Chesler, Berger & Quinones-Hinojosa, 2012; Ghotme *et al.*, 2017; Lenting *et al.*, 2017).

Em 2007, a Organização Mundial da Saúde (OMS), com base em dados histológicos e epidemiológicos, classificou os tumores do sistema nervoso central nos seguintes parâmetros: tipo celular, grau de malignidade e localização tumoral. Em 2016, a OMS utilizou parâmetros moleculares aliados aos histológicos para classificar entidades tumorais, variantes e padrões recém-reconhecidos e eliminar alguns já descritos que não possuem mais diagnóstico e/ou relevância biológica. Assim, formulou-se um meio de nomear estes tumores com maior precisão e estruturou-se um novo modo de diagnosticá-los (Louis *et al.*, 2016).

A nova classificação da OMS reestrutura gliomas difusos, meduloblastomas e outros tumores embrionários. Também, reorganiza os glioblastomas de acordo com seu perfil de mutação no gene IDH. E, adiciona a invasão cerebral como critério de meningioma atípico e o diagnóstico de tumor fibroso solitário/ hemangiopericitoma como uma entidade única e não mais como dois tumores distintos (Louis *et al.*, 2016).

No que diz respeito a nomenclatura dos tumores, propõe-se uma associação do diagnóstico morfológico à sua assinatura molecular. Sendo, por exemplo, o diagnóstico de glioblastoma, já citado acima, acompanhado da sua característica genética de apresentar ou não a mutação no gene IDH. O mesmo ocorre com os diagnósticos de astrocitoma e oligodendroglioma, os quais devem ser acompanhados pelas suas características moleculares de ter ou não a mutação neste mesmo gene (Louis *et al.*, 2016).

Na nova classificação foram ainda incluídas as nomenclaturas: astrocitomas difuso (IDH-mutante e não-mutante) e anaplásico (IDH-mutante e não-mutante); os gliomas difusos, incluindo os astrocíticos de graus II e III; os oligodendrogliomas de graus II e III; glioblastomas de grau IV; gliomas difusos relacionados à infância e glioma

difuso da linha média; ependinoma H3 K27M-mutante; meduloblastoma Wnt- ativado e SHH-ativado; e tumor embrionário com múltiplas camadas de rosetas, C19MC alterado (Louis *et al.*, 2016).

Além disso, houve a inclusão de uma categoria provisória, classificada como “Não Especificado de Outra Forma” (da sigla em inglês, NOS), utilizada quando os tumores não apresentam um perfil molecular característico ou não for possível realizar a pesquisa destas alterações genóticas, seja por indisponibilidade de proceder a análise por estudo imunohistoquímico ou por indisponibilidade de realizar o sequenciamento do material genético do tumor (para revisão ver: Louis *et al.*, 2016; Reifengerger *et al.*, 2016).

Os tumores, também, podem ser classificados com base no tipo celular. Conhecidos como astrocitomas, oligodendrogliomas ou ependinomas, com base nas suas características histológicas, como semelhança fenotípica destas células com os diferentes tipos de células da glia, astrócitos, oligodendrócitos ou ependimais, respectivamente (Jiang & Uhrbom, 2012). Há ainda, os tumores “mosaico”, os quais apresentam características tanto de astrocitomas quanto de oligodendrogliomas, sendo nomeados oligoastrocitomas. Além das diferenças morfológicas, há a classificação em subtipos de acordo com semelhanças e particularidades dos tumores, a qual envolve aspectos genéticos, de malignidade, desenvolvimento tumoral, sensibilidade terapêutica e prognóstico dos pacientes (para revisão ver: Brat *et al.*, 2007; Fuller & Scheithauer, 2007; Louis *et al.*, 2007; Nakazato, 2008).

A malignidade tumoral está classificada em uma escala que varia de I a IV. Com base em aspectos histológicos, os gliomas de baixo grau I e II são de crescimento lento, diferenciados e passíveis de ressecção cirúrgica, sendo tumores de grau I encontrados tipicamente em crianças. Entre os gliomas de baixo grau os 5 principais subtipos são: astrocitoma difuso (acomete principalmente indivíduos adultos da faixa de 30 a 40 anos), astrocitoma pilocítico (ocorre quase exclusivamente em indivíduos com idade inferior a 25 anos), oligodendroglioma (o segundo tipo mais comum de glioma de baixo grau), gangliogliomas (misto de astrocitoma pilocítico e células neuronais; acomete indivíduos na faixa dos 20 anos), gliomas mistos (normalmente apresentam características de astrocitoma difuso e oligodendroglioma (Brat *et al.*, 2007; Fuller & Scheithauer, 2007; Louis *et al.*, 2007; Nakazato, 2008).

No que se refere aos gliomas de alto grau III e IV, os mesmos são tipicamente não-diferenciados ou anaplásicos, apresentam alta agressividade, alta proliferação,

raramente são passíveis de ressecção cirúrgica, resistentes à terapia, com prognóstico desfavorável aos pacientes e possuem alta taxa de recorrência. Os dois subtipos mais comuns e agressivos são o astrocitoma anaplásico (grau III, com alto índice proliferativo e histologicamente definido pela atipia nuclear e atividade mitótica pronunciada) e o glioblastoma multiforme (grau IV, representa mais de 70% dos gliomas de alto grau diagnosticados e o tipo mais agressivo de tumor primário cerebral) (Brat *et al.*, 2007; Fuller & Scheithauer, 2007; Louis *et al.*, 2007; Nakazato, 2008).

A terceira classificação é feita com base na localização tumoral, referente ao local onde os tumores se desenvolvem. Ela é baseada em uma estrutura membranosa que separa o cérebro do cerebelo, o *tentorium* cerebelar (ou “teto” cerebelar). Assim, os gliomas podem ser definidos como supratentoriais, que se desenvolvem acima do *tentorium* (no cérebro) e correspondem a 70% dos gliomas em pacientes adultos, e infratentoriais, que se desenvolvem abaixo do *tentorium* (no cerebelo) e correspondem a 70% dos gliomas em pacientes pediátricos (Brat *et al.*, 2007; Fuller & Scheithauer, 2007; Louis *et al.*, 2007; Nakazato, 2008).

### 2.3 TRATAMENTO ANTINEOPLÁSICO CONTRA GLIOBLASTOMAS

A história do glioblastoma multiforme (GBM) não apresenta grandes avanços nos últimos 10 anos, no que se refere a novas estratégias terapêuticas. O tratamento padrão para GBM é composto por cirurgia, radioterapia e quimioterapia concomitante e adjuvante, geralmente realizada com o agente alquilante citostático temozolomida (TMZ) (Zhang, Stevens & Bradshaw, 2012; von Neubeck *et al.*, 2015; Ensign *et al.*, 2016).

A TMZ (3,4-dihidro-3-metil-4-oxoimidazo-[5,1-de]-1,2,3,5-tetrazin-8-carboxamida) (Fig. 1) é administrada via oral por 5 dias a cada 28 dias, e facilmente absorvida via oral, atravessa rapidamente a barreira hemato-encefálica e é melhor tolerada do que outros compostos do grupo dos triazenos, como a mitozolomida e a dacarbazina. Segundo Friedman, Kerby & Calvert, (2000), os efeitos colaterais não-hematológicos mais frequentes são náuseas, cefaleia, vômito e fadiga (grau 1 e 2; leves), sendo estes controlados com o uso de antieméticos e analgésicos (Friedman, Kerby & Calvert, 2000; Koukourakis *et al.*, 2009; Wesolowski, Rajdev & Mukherji, 2010;

Johnson & O'Neill, 2012). TMZ é um pró-fármaco derivado de imidazotetrazona que, quando metabolizado, gera o metabólito MTIC (5-[3-metiltriazeno-1-il]imidazol-4-carboxamida), responsável por seu efeito tóxico, capaz de formar o íon metildiazonium, que metila o DNA nas posições N<sup>7</sup> da guanina e O<sup>6</sup> da metilguanina. Dependendo da deficiência de reparo e magnitude do dano, pode levar à morte celular nas fases G2/M, desempenhando, assim, atividade antitumoral em uma variedade de tipos de câncer (Nagasawa, 2012; Chen, 2015; Sang, 2016).

No entanto, a história da TMZ teve início quase 30 anos antes, na década de 70, na Universidade de Aston, na Inglaterra, quando uma série de novas imidazotetrazinonas foram sintetizadas (Stevens, Gescher & Turnbull, 1979; Stevens *et al.*, 1984). Tais agentes continham três átomos de nitrogênio adjacentes que lhes conferiam propriedades físico-químicas e atividade antitumoral desconhecidas até então, o que, após estudos em modelos murinos e constatação de baixos efeitos colaterais, levou ao desenvolvimento da temozolomida (Stevens *et al.*, 1984). Disponível comercialmente desde o ano 2000, é um pró-fármaco de baixo peso molecular (194,1g/mol) e praticamente eliminada após 8h da ingestão (T<sub>1/2</sub>: 1,8 h) (Friedman, Kerby & Calvert, 2000; Johnson e O'Neill, 2012).

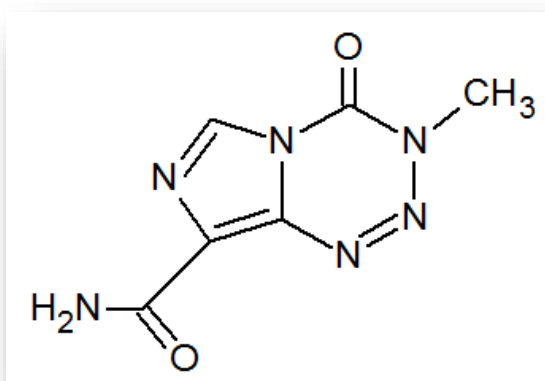


Figura 1 – Estrutura química da temozolomida (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>).

No que diz respeito ao tratamento padrão para GBM recorrente, utiliza-se o bevacizumabe, um anticorpo monoclonal que bloqueia a ação do fator de crescimento endotelial vascular (da sigla em inglês, *VEGF*) e impede o crescimento de vasos sanguíneos que alimentam tumores malignos, produzindo uma taxa de resposta entre 25 - 60% (Wong *et al.*, 2011). Outra estratégia terapêutica frente à recorrência tumoral

é a nitrosureia (BCNU ou Camustina) altamente lipossolúvel, que atua como um agente alquilante de ciclo celular inespecífico, ao induzir ligações cruzadas nas moléculas de DNA e RNA e inibir o funcionamento de diversas enzimas através de carboxilação. O acúmulo destes danos na molécula de DNA desencadeia o processo de morte celular, mas apenas um modesto aumento na sobrevida dos pacientes, em média 2 meses, e uma série de efeitos colaterais, como a redução do volume de líquido cerebrospinal, aumento da pressão intracraniana e edema (Westphal *et al.*, 2006; Gutenberg *et al.*, 2013). Ainda, outras nitrosureias, irinotecano e cisplatina têm demonstrado eficácia no tratamento adjuvante de gliomas, em casos de recorrência e progressão de tumores (para revisão ver: Carrilho & Munoz, 2012; Weller *et al.*, 2013; Glaser *et al.*, 2017).

Uma vez que o GBM é também caracterizado como resistente a terapias multimodais com baixo índice de sobrevivência, há a possibilidade das terapias alvo tumoral (Glaser *et al.*, 2017). Esforços científicos nesse sentido têm proporcionado um melhor entendimento da carcinogênese e o desenvolvimento de agentes mais especificamente direcionados a novos alvos terapêuticos, bem como, subgrupos de pacientes estratificados de acordo com a idade e perfil de marcadores moleculares para cada tipo de tumor (Chen, 2015; Mukaihara & Suehara, 2015). Tais medidas devem continuar revolucionando o tratamento de câncer, tornando-o mais eficaz e acessível (Gore, DeGregori & Porter, 2013).

A quimiorresistência caracteriza-se como um efeito citotóxico diferente do esperado, irresponsivo ao tratamento (Holohan *et al.*, 2013). É um evento multifatorial, que envolve múltiplos mecanismos inter-relacionados ou independentes, os quais se manifestam de diferentes formas como, por exemplo: o aumento do efluxo do fármaco; a inativação desse; alterações nos alvos terapêuticos, processamento do dano induzido pelo fármaco e alterações na solubilidade, distribuição sistemática, metabolismo e excreção desse (Longley & Johnston, 2005; Gatti & Zunino, 2005; Wong & Goodin, 2009; Holohan *et al.*, 2013; Kartal-Yandim, Adan-Gokbulut & Baran, 2015).

Exemplos de alguns alvos terapêuticos relacionados a GBM é a O-6-metilguanina-metiltransferase (MGMT), enzima que reduz a citotoxicidade de agentes O<sup>6</sup>-alquilantes, como a TMZ, pela catalização da transferência de grupos metil da posição O6 da guanina para o resíduo de cisteína por meio do sítio ativo da enzima MGMT. A transferência de grupos alquil para MGMT leva a inativação desta, levando a sua degradação via proteossomal, daí a expressão “enzima suicida”. Infelizmente, muitos GBMs exibem aumento na expressão de MGMT, o que reduz a efetividade dos

agentes alquilantes como a TMZ, ou seja, uma redução na sua expressão em tumores é clinicamente relevante e um fenótipo celular importante a ser considerado durante o tratamento (Zhang, Stevens & Bradshaw, 2012; Chen *et al.*, 2015; Annovazzi *et al.*, 2015).

De maneira semelhante, ocorrem modificações na poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1), uma enzima fundamental para o reparo de quebra de fita simples, que mantém a integridade do genoma (Chen *et al.*, 2015). Ela atua como componente do reparo por excisão de bases (da sigla em inglês, *BER*), ligando-se ao dano de DNA de cadeia simples e recrutando enzimas de reparo adicionais para o local do dano. A inibição de PARP-1 em células proliferativas sensibiliza as células ao dano de DNA gerado pelo quimioterápico, resultando na parada do ciclo celular (Chen *et al.*, 2015). Além da via de reparo BER, o reparo de bases mal-emparelhadas (da sigla em inglês, *MMR*) interfere na resposta a tratamentos em diversos tipos tumorais, uma vez que qualquer defeito em algum de seus componentes pode resultar na aquisição de resistência a agentes alquilantes, independente da expressão de MGMT (Johannessen *et al.*, 2008). Inúmeros estudos demonstraram que mutações em genes dessa via contribuíram para o aumento da irresponsividade no tratamento, por meio da resistência a indução de apoptose induzida por TMZ (D'atri *et al.*, 1998; Taverna *et al.*, 2000; Cahill *et al.*, 2007; Cancer Genome Atlas Research, 2008; Yip *et al.*, 2009; Stark *et al.*, 2010; Felsberg *et al.*, 2011). Dessa forma, a superexpressão da enzima MGMT, o correto funcionamento do sistema BER e o mal funcionamento do sistema MMR configuram o pior quadro de resistência possível à TMZ em células de GBM.

Mais recentemente, outro mecanismo relacionado à resistência é a autofagia (White, 2012; Filippi-Chiela *et al.*, 2015). Ela é uma via onde organelas e proteínas são degradadas via lisossomal. Essa via tem a finalidade de manter a biossíntese celular e a viabilidade durante estresses metabólicos como, por exemplo, a privação de nutrientes. Em células de câncer, seu papel é paradoxal. Ora funciona como uma via supressora de tumor, ao inibir a iniciação do tumor, ora como um mecanismo de resistência ao fármaco, ao facilitar a sobrevivência das células com tensões metabólicas causadas pelos agentes anticancerígenos (White, 2012; Filippi-Chiela *et al.*, 2015).

Tendo-se em mente que fatores como a heterogeneidade presente na etiopatogenia e resistência do glioblastoma (para revisão, ver Sang, 2016) levam a defeitos na capacidade de processamento das vias de reparo, recrutando vias



alternativas, as quais podem permitir que as células cancerígenas continuem sua proliferação, faz-se necessário elucidar meios que interfiram nessas vias. Assim, algumas estratégias para induzir células específicas de câncer à morte, principalmente pelo uso da letalidade sintética, com aumento na sensibilização destas células a agentes com alto índice terapêutico são evidenciadas (Kaelin, 2005; Holohan *et al.*, 2013).

## 2.4 TELÚRIO E COMPOSTOS ORGANOTELURADOS

Os elementos do grupo 16 da tabela periódica possuem propriedades físico-químicas semelhantes as quais caracterizam a família dos calcogênios (do grego *khalkos*, cobre ou minério; e *genos*, aquilo que dá origem; assim, “*originário do cobre*” ou “*que vem do minério*”) que, quando na forma orgânica, são denominados organocalcogênios. Fazem parte dessa família, os seguintes elementos: oxigênio (O), enxofre (S), selênio (Se), telúrio (Te) e polônio (Po) (Chastenn *et al.* 2009).

Desde os anos 80, o selênio teve suas farmacologia e toxicologia amplamente estudadas, o que possibilitou a síntese de compostos orgânicos contendo selênio (compostos organoselenados), os quais apresentam interessantes propriedades farmacodinâmicas, entre elas atividade antitumoral (Kim *et al.*, 2014). Neste sentido, alguns compostos selenados inorgânicos apresentam potencial antitumoral ao passo que, ao induzirem uma superexpressão da proteína Bax e dano no DNA na linhagem MT-4 (leucemia linfoblástica humana) induzem apoptose (Philchenkov *et al.*, 2007).

Foi também durante os anos 80 que as descobertas com compostos selenados inspiraram o estudo de outro elemento da mesma família, com propriedades físico-químicas semelhantes, o telúrio (Te) (Comasseto *et al.*, 1997; Comasseto, 2010). Originado do latim *tellus* (terra), o Te foi descoberto por Franz Joseph Müller Reichstein, durante um trabalho em minas de ouro na Hungria, em 1782 (Chasteen *et al.*, 2009). Trata-se de um semi-metal ou metaloide, pois possui propriedades intermediárias a metais e não-metais; é amplamente explorado na área industrial como liga para troca de fase de discos magnéticos ópticos, painéis solares, dispositivos termoelétricos, desenvolvimento de nanomateriais, produção de vidro e aço, na indústria petroquímica, produção de explosivos, lubrificantes sólidos, soluções

oxidantes e na vulcanização de borracha, entre outras aplicações (Taylor, 1996; Ogra, 2017).

Considerado um elemento raro em seu estado livre, o Te não possui depósitos de minério que possam ser extraídos. Já na sua forma metálica é mais frequentemente encontrado como telurídeo de ouro (calaverita) ou ligado a outros metais, como a prata e o bismuto. Quanto a isso, estima-se que a produção global de Te foi de aproximadamente 450 toneladas em 2016 (USGS, 2016). Constatada sua presença na natureza e contato com o solo, a principal fonte de exposição a humanos é, em geral, pela ingestão de alimentos, como carne, laticínios e cereais (Gerhardsson, 2015).

Outras características consideráveis do Te são que ele é um elemento não-essencial e não-benéfico, podendo ser tóxico para plantas e animais (Gerhardsson, 2015). No organismo humano, é relatada a presença de 500 mg de Te, valor este que excede os níveis de todos os outros elementos em humanos, exceto ferro, zinco e rubídio. Sua ocorrência é principalmente nos rins, mas também no sangue, coração, pulmões, baço, músculos e ossos (Schroeder, Buckman & Balassa, 1967; Cohen, 1984; Nogueira, Zeni & Rocha, 2004; Chasteen *et al.*, 2009; Gerhardsson, 2015). Ainda, o metabolismo das suas formas inorgânica e orgânica (teluritos,  $\text{TeO}_3^{2-}$ , e teluratos,  $\text{TeO}_4^{2-}$ , de metal alcalino) é amplamente explorado em bactérias e fungos, por exibirem atividade antifúngica e antibiótica, em especial contra bactérias Gram-negativas (para revisão ver: Cooper & Few, 1952; Marwin, 1958; Chasteen *et al.*, 2009).

Informações sobre a toxicologia de moléculas orgânica contendo Te, em ambientes biológicos, são escassas na literatura (Nogueira, Zeni & Rocha, 2004). O que se sabe até o momento, é que a toxicidade dos compostos OT pode depender em grande parte da sua via de exposição, dose aplicada e estado de oxidação (Nogueira, Zeni & Rocha, 2004). Alguns autores afirmam que compostos OT são mais tóxicos que compostos análogos de enxofre e selênio (Nogueira, Zeni & Rocha, 2004; Cunha, Gouvea & Juliano, 2009), enquanto outros descrevem que compostos OT são menos tóxicos que compostos organoselenados (Engman, 1985). Ainda, a ampla aplicação na indústria e o potencial farmacológico do Te aumentam a exposição de humanos a seus compostos derivados, tornando essencial a elucidação da sua toxicidade, em todos os aspectos – genotoxicidade, citotoxicidade, toxicidade sistêmica e reprodutiva (Guillamet *et al.*, 2008; Ogra, 2017).

Quanto à citotoxicidade de compostos orgânicos contendo Te, os mecanismos associados a este efeito envolvem a ação direta ou indireta em biomoléculas como

lipídeos, proteínas e DNA. Neste sentido, altas concentrações de telureto de hidroxifenila, telureto de fenilamina e telureto de N,N-dimetila induzem quebras ao DNA, avaliadas pelo ensaio cometa em células TK6 (linfoblastoma humano) em cultivo (Guillamet *et al.*, 2008). Outro exemplo, é a interação dos compostos ditelureto de dimetila e dicloreto de dimetil com grupamentos sulfidríla da enzima esqualeno monooxigenase, a segunda enzima na via da biossíntese do colesterol, levando a inibição desta proteína. Assim, o bloqueio dessa via resulta na desmielinização transitória de nervos periféricos, o que explica um quadro patológico, observado em ratos, *in vivo*, conhecido como neuropatia induzida por Te (Goodrum, 1998; Laden & Porter, 2001). O mesmo efeito foi observado com selenito e outros compostos de metilselênio (Gupta & Porter, 2002).

No que se refere à sua aplicação farmacológica, os compostos organotelurados (OT) possuem propriedades antioxidantes, imunomoduladoras, quimiopreventivas e antitumorais bastante interessantes, embora muito complexas (Nogueira *et al.*, 2004). Podem ser citados como exemplo o aminoácido modificado Te-fenil-L-telurocisteína, capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio e algumas isoenzimas do sistema citocromo P-450, as quais são responsáveis pela ativação de pró-carcinógenos (Roosebom *et al.*, 2002).

Dentre os compostos OT, destaca-se o Telurato de tricloro amônio dioxoetileno-O,O' (AS-101) visto suas aplicações farmacológicas. Em pacientes com doenças auto-imunes, é potencial imunomodulador (Halpert & Sredni, 2014). Enquanto que, em pacientes com nefropatia diabética é potencial clínico na inibição da via AKT (proteína quinase B) e diminui a progressão da doença (Shemesh *et al.*, 2014). E, em roedores, inativou proteases de cisteína, como a catepsina B, proteínas de sobrevivência do tumor, como a survivina e obstrui a produção de IL-10 tumoral (Sredni, 2012).

É de interesse na área de terapia anticâncer o fato de compostos OT e organoselenados interagirem diretamente com grupamentos tióis, oxidando-os a dissulfetos. Por exemplo, foi reportado que compostos OT foram capazes de inibir a enzima tioredoxina redutase (TrxR) e, assim, induzir estado de estresse oxidativo, parada de ciclo celular e apoptose, em cultura de células tumorais de mama (MCF-7) (Engman *et al.*, 2003).

Outro exemplo quanto a mimetização de atividade enzimática, os diaril teluretos, como o bis(4-aminofenil) telureto e o bis-[p-(dimetilamino)fenil] telureto são

capazes de mimetizar a atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx), a qual participa de um dos sistemas antioxidantes mais importantes do corpo humano e pode contribuir para a resistência a agentes oxidantes na terapia anticâncer. O fato de compostos OT serem capazes de oxidar GSH (glutationa) em GSSH (glutationa oxidada) pode ser um dos principais motivos pelo qual esses compostos são tóxicos e potenciais agentes para a sensibilização de tumores à terapia (Engman *et al.*, 1995; Nogueira *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2018).

## 2.5 DITELURETO DE DIFENILA

O derivado orgânico de Te, ditelureto de difenila (DTDF) (Fig. 2) é um composto sólido e hidrofóbico. O mesmo é utilizado em reações de síntese orgânica que, dependendo da forma e quantidade de exposição pode ser tóxico e mutagênico em animais. O DTDF mostrou-se capaz de oxidar grupamentos tiólicos em proteínas. Por isso, afeta uma série de enzimas importantes, como a  $\delta$ -ALA-D (ácido delta-aminolevulínico desidratase), a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  (sódio-potássio ATPase) e a TrxR. A TrxR é atuante na resposta a estresse, reparo de proteínas e proteção contra o dano oxidativo (Árner & Holmgren, 2000; Lillig & Holmgren, 2007). Esta enzima é superexpressa em diversos tumores primários, como pulmão, cólon, cervical, fígado, pâncreas, colorretal e de células escamosas (Engman *et al.*, 2003; Rocha & Nogueira, 2005; Cunha, Gouvea & Juliano, 2009; Borges, Souza *et al.*, 2010). Além disso, a TrxR relaciona-se a efeitos deletérios nas células, levando a citotoxicidade e morte celular (Carvalho *et al.*, 2008). Sendo assim, o sistema TrxR é outro promissor alvo redox para a terapia anticâncer (Urig & Becker, 2006).

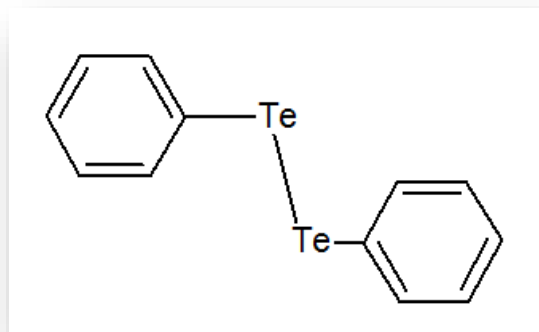


Figura 2 – Estrutura química do ditelureto de difenila ( $C_6H_5Te$ )<sub>2</sub>, abreviado Ph<sub>2</sub>Te<sub>2</sub>, de massa molar de 409,42 g/mol.

A neurotoxicidade do DTDF em roedores já foi descrita na literatura. Esta substância interrompe a homeostase do citoesqueleto visto que, em diferentes concentrações, foi capaz de desencadear hipofosforilação da proteína ácida fibrilar glial (da sigla em inglês, *GFAP*), alterações nos níveis de vimentina e subunidades de neurofilamento (NFL, NFM e NFH) e desorganização de actina em astrócitos co-cultivados e neurônios do córtex cerebral de ratos (Heimfarth *et al.*, 2017). E, em ratos em desenvolvimento, utilizando ensaios *in vivo* e *in vitro*, é neurotóxico ao induzir hiperfosforilação/hipofosforilação de proteínas de filamentos intermediários neuronais e gliais, em diferentes estruturas cerebrais, além de neurodegenerativo, ao influenciar a regulação diferencial por quinases/fosfatases das proteínas de citoesqueleto e nos mecanismos mediados por  $Ca^{2+}$  (para revisão, ver: Duckett & Ellem, 1971; Pessoa-Pureur, Heimfarth & Rocha, 2014; Heimfarth *et al.*, 2016; Heimfarth *et al.*, 2017).

Esse composto OT também pode provocar neuropatia periférica, devido à sua capacidade de desmielinização, pela inibição da enzima sulfidrílica importante na biossíntese do colesterol, principal lipídio presente na mielina, a esqualeno monooxigenase (Toews *et al.*, 1997; Goodrum, 1998; Laden & Porter, 2001). Além disso, relata-se sua toxicidade renal e hepática, observadas pelo aumento da atividade plasmática das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase quando há dano aos hepatócitos (Meotti *et al.*, 2003; Maciel *et al.*, 2000). E seu potencial teratogênico em fetos de ratos, pela observação de hidrocefalia, edemas e alterações nas medidas corporais fetais, altas taxas de mortalidade pré e pós-natais, além de efeitos tóxicos para a rata mãe (Stangherlin *et al.*, 2005).

Em um estudo do nosso grupo, O DTDF demonstrou efeito genotóxico e mutagênico em diferentes modelos biológicos (Degrandi *et al.*, 2010). Houve alteração no quadro de leitura, por DTDF, na bactéria *Salmonella typhimurium* e na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A elevada sensibilidade ao DTDF foi verificada em mutantes de *S. cerevisiae* deficientes na reparação por excisão de bases (BER) e na reparação por recombinação homóloga (HR) (Degrandi *et al.*, 2010), sugerindo a participação dessas vias na reparação dos danos no DNA provocados pela molécula. Degrandi e colaboradores (2010) verificaram ainda que, em concentrações acima de 1  $\mu\text{M}$ , em células V79, o DTDF foi citotóxico.

No entanto, os mecanismos relacionados à redução da viabilidade celular pelo DTDF são pouco conhecidos. Aparentemente, o estresse oxidativo é um mecanismo que contribui no potencial citotóxico do DTDF. Neste sentido, de acordo com Degrandi e colaboradores (2010), foi relatado que o DTDF em doses acima de 50  $\mu\text{M}$  em leveduras e  $>0,5$   $\mu\text{M}$  em células V79, induziu aumento nos níveis de peroxidação lipídica e redução na relação GSH/GSSH, devido a oxidação da GSH provavelmente provocada pela molécula. Complementarmente, em outro estudo, linhagens de leveduras deficientes em topoisomerase I (TopoI) foram mais resistentes a exposição ao DTDF do que a linhagem selvagem. Esse resultado sugeriu que o DTDF fosse capaz de inibir a enzima Topo I em levedura, o que foi confirmado no mesmo trabalho pelo ensaio *in vitro* de relaxamento de DNA plasmidial (Jorge *et al.*, 2015). Assim, possivelmente pela capacidade do DTDF de induzir um estado de estresse oxidativo na célula e a capacidade da molécula de inibir a enzima Topo I, esse composto cause lesões no DNA, como danos oxidativos, quebras simples e duplas (Jorge *et al.*, 2015). Consistentemente, o DTDF induziu a formação de quebras simples e duplas e danos oxidativos no DNA em células V79, evidências estas obtidas pelos ensaios de cometa neutro e alcalino. E, também, demonstrou potencial mutagênico, evidenciado pelo aumento da frequência de micronúcleos (Degrandi *et al.*, 2010). Como consequência, a exposição ao DTDF resultou em apoptose/necrose e parada no ciclo celular em fase S (Jorge *et al.*, 2015).

Tendo em vista a citotoxicidade do DTDF e os possíveis mecanismos relacionados, ele já foi testado *in vitro*, em linhagens de câncer colorretal, HT-29 e Caco-2, em uma faixa de 62,5 até 1000  $\mu\text{M}$ . Nesse estudo, observou-se um decréscimo significativo da viabilidade celular para ambas as linhagens e aumento da atividade de caspases 3/7 e 9 em células HT-29 (500-1000  $\mu\text{M}$ ) (Vij & Hardej, 2012). Resultados

semelhantes foram observados na linhagem de leucemia promielocítica humana (HL-60), frente aos ditelureto de 3,3'-diaminodifenila, ditelureto de 4,4'-diisopropildifenila, ditelureto de 2,2'-dimetoxidifenila e ditelureto de 2,2'-diamino-3,3',5,5'-tetrametildifenila, com indução de morte por apoptose, demonstrando-se o efeito antiproliferativo desses compostos (Sailer *et al.*, 2003; Sailer *et al.*, 2004).

Ainda neste sentido, nosso grupo de pesquisa realizou a exposição de linhagens celulares de fibroblasto humano (MRC5) e câncer do colón humano (HCT116) ao DTDF por 3 horas, e observou maior citotoxicidade na linhagem tumoral em relação a não tumoral. De forma coerente, a parada de ciclo celular em fase G2/M foram mais acentuados na linhagem tumoral, possivelmente devido à inibição de topoisomerase I (topoI) ou por estresse oxidativo (dados ainda não publicados) (Juchem, 2016). No entanto, em doses baixas, até 0,5 µM, o pré-tratamento com o DTDF apresentou efeito antimutagênico e antigenotóxico em linhagens V79 expostas a diversos mutágenos, como o terc-butil hidroperóxido (*t*-BOOH), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o metil metanossulfonato (MMS) e a luz ultravioleta (Trindade *et al.*, 2015).

No contexto da terapia anticâncer, cabe estabelecer um intervalo de concentração segura para investigar o potencial quimiopreventivo do DTDF, visto sua propriedade antioxidante, bem como para investigar seu potencial citotóxico, ambos importantes no processo quimioterápico (Letavayova *et al.*, 2006; Brozmanová *et al.*, 2010).

## **2.6 RESISTÊNCIA A QUIMIOTERÁPICOS E COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS**

Sabe-se que a quimioterapia induz à morte celular interagindo em múltiplas vias metabólicas, entre elas, com agentes tóxicos que danificam o DNA. Como as células tumorais dividem-se mais rapidamente que as saudáveis, o acúmulo de lesões é maior, o que aumenta a eficácia do tratamento (Panczyk, 2014). No entanto, a maquinaria celular dos organismos vivos ainda assim consegue encontrar meios de contornar e/ou reparar os danos causados pela quimioterapia (Torgovnick & Schumacher, 2015).

Visto que o DNA está sob constante ataque de toxinas endógenas, como os radicais livres e, toxinas exógenas, como os carcinógenos, ele desenvolve uma resposta adaptativa para preservar sua integridade por meio de múltiplos mecanismos. Estes são conhecidos como vias de reparo do DNA, as quais constituem a resistência secundária ou adquirida (Kartal-Yandim *et al.*, 2015). Ou ainda, o tumor pode não responder a terapia inicial, conhecido como resistência primária ou intrínseca. Sendo assim, a resistência quimioterápica tornou-se um desafio para estudiosos da área nos últimos 20 anos (Longley & Johnston, 2005; Shu & Liu, 2007; Holohan *et al.*, 2013; Panczyk, 2014; Kartal-Yandim *et al.*, 2015).

Após o processo de indução de dano ao DNA, é desencadeado uma resposta celular a qual envolve a detecção da lesão, a amplificação do sinal emitido, por meio de uma cascata de proteínas quinases e a mobilização de numerosos efetores promotores de parada do ciclo celular e consequente tentativa de reparo (Méndez- Acuña *et al.*, 2010). Apesar da existência desses mecanismos de *checkpoint* atuantes nas etapas do ciclo celular, alguns danos conseguem escapar destes mecanismos e parar a forquilha de replicação. Se este dano não é reparado, pode originar quebras de fita-dupla, aumentando assim a instabilidade genética. A maquinaria celular, ao longo da evolução, reestruturou-se para que esta parada do ciclo celular não ocorra frequentemente, por meio da resposta de dano ao DNA (da sigla em inglês, *DDR*). Isto foi possível graças a habilidade celular de replicar diretamente o DNA danificado, restaurando em DNA *duplex* antes da tentativa de reparo por excisão (Lange, Takata, & Wood, 2011; Sale, 2013; Pearl *et al.*, 2015).

Alguns aspectos dificultam e/ou reduzem a eficiência de terapias antitumorais em gliomas em geral, especialmente os de alto grau. Estes aspectos podem ser divididos em aspectos tumorais intrínsecos e aspectos relacionados às características peculiares do cérebro (estes últimos também comprometendo a terapia de gliomas de baixo grau). Exemplos desses aspectos são: o fato do cérebro ser um tecido altamente complexo e sensível, o que pode impossibilitar algumas abordagens cirúrgicas, dependendo do local de desenvolvimento do tumor; a dificuldade que alguns fármacos encontram para atravessar a barreira hematocefálica e a toxicidade exacerbada de alguns fármacos ao tecido neural sadio (Blakeley, 2008).

No GBM, as maiores responsáveis pelo seu crescimento e recorrência são as denominadas células-tronco do glioma (da sigla em inglês, *GSCS*), as quais demonstram uma relativa resistência à apoptose e uma maior capacidade de reparo do



DNA. Posto que, pode-se verificar que a ativação da DDR, um aumento na atividade de Chk1/Chk2 (do inglês, *checkpoint kinases Checkpoint 1 and Checkpoint* e o atraso no ciclo celular seja provavelmente o maior mecanismo de resistência (Annovazzi *et al.*, 2015).

Atualmente, para manter-se a eficácia da terapia, tem-se buscado o desenvolvimento de novos agentes ou a combinação de fármacos comumente utilizados capazes de atingir diferentes vias do tumor e atuar com a dose máxima citotóxica contra o tecido tumoral, ao mesmo tempo em que se minimiza a toxicidade ao paciente (Panczyk, 2014). Portanto, é necessária a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos no reparo de DNA, a redução do risco de efeitos colaterais graves e o consequente aumento da expectativa de vida (Wu, Chang & Huang, 2006; Silvestri *et al.*, 2013).

Para isso, o estudo das neoplasias de natureza extremamente agressiva e possíveis formas de interferência sobre elas é essencial para que se potencialize o efeito de fármacos e haja avanços na resposta terapêutica. Além disso, a resistência a quimioterápicos é o maior e mais recente desafio a ser superado pelos pesquisadores da área do câncer. Por isso, a combinação de dois ou mais tratamentos terapêuticos que atuem sobre diferentes vias do tumor mostra-se como uma abordagem mais eficaz do que as monoterapias. As técnicas monoterapêuticas convencionais não somente atingem a proliferação de células cancerígenas, mas também saudáveis. A quimioterapia pode ser tóxica ao paciente com múltiplos efeitos colaterais e riscos e pode também reduzir fortemente seu sistema imunológico, afetando células da medula óssea e aumento da suscetibilidade do organismo a doenças. Embora a terapia combinada possa ser tóxica se um dos agentes utilizados for quimioterápico, a toxicidade é significativamente menor, assim como a resistência a drogas, porque as células cancerosas são frequentemente incapazes de se adaptar aos efeitos tóxicos simultâneos de dois agentes terapêuticos (Bayat *et al.*, 2017).

A combinação de fármacos pode apresentar um efeito sinérgico – há a potencialização dos efeitos terapêuticos – e ou um efeito aditivo – os efeitos dos fármacos isolados se somam –, portanto, uma dose terapêutica mais baixa de cada fármaco individual é necessária. Além disso, a terapia combinada pode ser capaz de prevenir efeitos sobre as células normais enquanto produz simultaneamente efeitos citotóxicos em células cancerígenas. Isso pode ocorrer se as drogas no regime de combinação forem antagônicas, em termos de citotoxicidade e a outra droga, em

células normais, protege-las dos efeitos citotóxicos (Bayat *et al.*, 2017). Existem muitos possíveis agentes que podem se combinar para potencialmente resultar em eficácia terapêutica, mas que ainda não entraram em investigação completa. A elucidação do mecanismo de ação de compostos amplamente utilizados, como a TMZ e de novos e potenciais agentes antitumorais, como o DTDF, em regimes isolados bem como em associação, devem facilitar o desenho racional de novos agentes, constituindo uma nova abordagem na terapia oncológica.

### **3. OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste estudo é avaliar os efeitos citotóxicos do DTDF, e do quimioterápico TMZ, amplamente utilizado, em regimes isolados e em associação, após exposição aguda e crônica, de culturas celulares de glioma não-resistente (M059J) e resistente (GBM) à TMZ.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

- Determinar a viabilidade das células tumorais em cultura, M059J e GBM, após exposição crônica à temozolomida;
- Avaliar a presença de autofagia nas células tumorais em cultura, M059J e GBM, após exposição crônica à temozolomida.
- Avaliar a viabilidade das células tumorais em cultura, M059J e GBM, após exposição aguda e crônica ao ditelureto de difenila;
- Determinar a viabilidade das células tumorais em cultura, M059J e GBM, após exposição crônica ao combinado de temozolomida e ditelureto de difenila;
- Verificar os efeitos crônicos quanto a duplicação cumulativa da população de células M059J e GBM expostas a concentrações crescentes de temozolomida;

#### 4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de um artigo científico intitulado ***“Diphenyl Ditelluride Sensitizes Temozolomide Resistant Glioblastoma Multiforme Cells”***.

# 4.1 Capítol I

## **Diphenyl Ditelluride Sensitizes Temozolomide Resistant Glioblastoma Multiforme Cells**

*Jéssica Silveira Soldatelli<sup>1</sup>, Fernanda Mosen Munari<sup>1</sup>, Iuri Marques de Oliveira<sup>2</sup>, Michelle de Souza Lima<sup>2</sup>, André Luiz Mendes Juchem<sup>2</sup>, Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar<sup>3</sup>, Mariana Roesch-Ely<sup>1</sup>, João Antonio Pêgas Henriques<sup>1,2</sup>.*

### **Affiliation**

<sup>1</sup> Laboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre - RS, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina – UFSC, Florianópolis – SC, Brazil.

### **Correspondence**

Prof. João Antonio Pêgas Henriques, Laboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas Street, 1130, BL 57, Caxias do Sul, Brazil. E-mail: pegas.henriques@gmail.com Phone: +55 54 3218 2100  
Fax: 55 54 3218 26 64

### **Highlights**

- At doses that represent 50% of cell viability, the GBM cell line was more resistant to the TMZ doses when compared to the M059J cell line after chronic exposure (120 h).
- Resistance to TMZ of the GBM cell line was also evidenced in the cumulative population doubling test.
- Using acridine orange staining, autophagy has been shown to favor TMZ resistance in both GBM and M059J cell lines.
- DTDF sensitized resistant and non-resistant cells to TMZ treatment, considerably reducing the cell viability of these lines and its effect is independent of TMZ resistance profile.

## ABSTRACT

Despite advances in the oncology field, malignant gliomas are characterized by low incidence and high mortality rates, both of which are likely to increase in coming years, especially in developing countries. They present high aggressiveness, high proliferation, are rarely amenable to surgical resection, resistant to therapy, with unfavorable prognosis and have a high recurrence rate. Diphenyl ditelluride (DPDT), solid and hydrophobic, is an organotellurium compound used in various organic synthesis reactions, studied due to antioxidant, chemoprotective, cytotoxic and antitumor activities *in vitro*. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effects of DPDT and the widely used chemotherapeutic agent temozolomide, in isolated and associated regimens, after acute and chronic exposure of non-resistant (M059J) and resistant glioma cells (GBM). In the analysed results, cumulative population doubling showed to be significantly lower in the cell number for M059J and GBM treated with TMZ, during the 120 h of drug exposure, after drug withdrawal and these cells still decreased their number indicating the long-term effect of TMZ. These results confirmed the resistance of GBM cell line, because of the high IC<sub>50</sub> value found in viability assay. In addition, autophagy may contribute somewhat to resistance, but it is not the main mechanism of the cells here tested. Furthermore, it was possible to determine that DPDT clearly has a dose-dependent cytotoxic effect on the M059J and GBM lines, in a lower concentration range than that used with TMZ. Evidenced by the decline in cell viability, DPDT sensitized the cells to TMZ treatment. It is important to point out that this sensitization occurred in low and approximate IC<sub>50</sub> values after both, 24 h and 120 h of treatment, being the effects of the DPDT independent of the resistance profile to TMZ. Therefore, observing the effects of DPDT on M059J and GBM cells, there was a potentiation of the effects of TMZ, with a decline in cell viability to around only 20% survival. The data here presented suggest using DPDT and its association to TMZ in the treatment of gliomas, aiming to reduce the doses of TMZ used in the clinic and to allow a real decrease of the side effects to the patients.

**Keywords:** malignant gliomas, temozolomide, diphenyl ditelluride, antitumor.

## Introduction

Cancer has global statistical projections that reveal 8.8 million new diagnoses each year (WHO, 2017). Among the malignant neoplasias, gliomas are important primary tumors of the central nervous system, which represent more than 70% of primary brain tumors, originated from malignant transformation of macroglia cells. They are characterized by rapidly and progressive growing, low incidence and high mortality rates, both of which are likely to increase in the next years, especially in developing countries (Ohgaki, 2009; Chesler, Berger & Quinones-Hinojosa, 2012; Ghotme *et al.*, 2017; Lenting *et al.*, 2017). Regarding antitumor therapy, the most malignant and common form of gliomas in adults is the glioblastoma multiforme (GBM), which presented no significant improvement in the prognosis of patients in the last 10 years (von Neubeck *et al.*, 2015; de Souza *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017). Despite the technological progress, in the standard treatment consisting of maximal surgical resection, when possible, followed by radiotherapy and concurrent and adjuvant chemotherapy generally performed with the cytostatic alkylating agent temozolomide (TMZ) (Zhang, Stevens & Bradshaw, 2012; von Neubeck *et al.*, 2015). The standard treatment for recurrent GBM is bevacizumab, an antibody that produces a response rate between 25-60% (Wong *et al.*, 2011). In addition, irinotecan, cisplatin and nitrosureas have shown efficacy in the adjuvant treatment of gliomas in cases of tumor recurrence and progression (Carrilho & Munoz, 2012). Because the majority of patients are TMZ-intrinsically-resistant or develop resistance during treatment (Hiddingh *et al.*, 2014; Lee, 2016), other biological agents are tested in a large number of clinical trials, but most of them reveal little improvements in outcomes to the patient when they encounter barriers such as undesirable side effects, lack of drug selectivity and chemotherapeutic resistance (Padma, 2015). One of the mechanisms related to resistance is autophagy (White, 2012; Filippi-Chiela *et al.*, 2015). It is a pathway where organelles and proteins are degraded via lysosomal. This pathway has the purpose of maintaining cellular biosynthesis and viability during metabolic stresses, such as nutrient deprivation. In cancer cells, their role is paradoxical. It functions as a tumor suppressor pathway by inhibiting tumor initiation, or as a mechanism of drug resistance, by facilitating the survival of cells with metabolic stresses caused by anticancer agents (White, 2012; Filippi-Chiela *et al.* 2015). Because of this last reason, one investigated possibility for glioma treatment is an inhibitor of autophagy, chloroquine, which enhanced tumour regression in response to alkylating agents in a mouse model of lymphoma (Amaravadi,



*et al.*, 2007) and hydroxychloroquine was found to sensitize human cancer cells to cancer therapy (Sasaki *et al.*, 2010). For the mentioned reasons, the study of neoplasms of extremely aggressive nature and the validation of new chemotherapeutic agents seek to reach populations of cells at different stages of the cell cycle. At the same time, decrease the development of drug resistance, promoting advancement in the therapeutic response and increase the life quality of the patient (Lewis & Petritsch, 2013).

In this scenario, we highlight the antiproliferative and anticancer potentials of organotellurium (OT) compounds. For example, the modified amino acid Te- phenyl-L-telurocysteine, capable of inhibiting the generation of reactive oxygen species and some isoenzymes of the cytochrome P-450 system, which are responsible for the activation of pro-carcinogens (Roosebom *et al.* 2002). In rodents, ammonium trichloro (dioxoethylene-o,o') tellurate (AS-101) inactivated cysteine proteases, such as cathepsin B, inhibited tumor survival proteins such as survivin and obstructed tumor IL-10 production (Sredni, 2012). Another study using human promyelocytic (HL-60) cell line as an experimental model also showed that an OT compound, known as RT-04, which also inhibits the action of cathepsin B, is capable of inducing apoptosis in this cell line by increasing the activity of caspases 3, 6 and 9. The mechanism involved in this phenomenon includes the reduction of Bcl-2 expression (Abondanza *et al.*, 2008). In addition, others OT compounds were able to inhibit the thioredoxin reductase enzyme (TrxR) and thereby induce oxidative stress, cell cycle arrest and apoptosis in cultured breast tumor cells (MCF-7) (Engman *et al.*, 2003).

The diphenyl ditelluride (DPDT) is a solid, hydrophobic OT compound used in various organic synthesis reactions (Chasteen *et al.*, 2009). In low concentrations, this compound may present a chemoprotective potential, reducing the genotoxic and mutagenic effects of oxidants and alkylants mutagens (Degrandi *et al.*, 2010; Meinerz *et al.*, 2014; Trindade *et al.*, 2015). In high dosages, it can be genotoxic and mutagenic *in vitro* and *in vivo* models (Cunha, Gouvea & Juliano, 2009; Souza *et al.*, 2010). Furthermore, in chinese hamster fibroblasts (V79) cells, DPDT shows cytotoxic effect by apoptosis induction and cell cycle arrest in S-phase, due to simple and double DNA strand breaks and oxidative stress induction, possible as a consequence of an interaction with the enzyme topoisomerase I (Jorge *et al.*, 2015). This may be the major reason why these compounds are toxic and potential agents for the sensitization of tumors to therapy. In this sense, its cytotoxic effect was also observed in the lines promyelocytic leukemia (HL-60) and colorectal adenocarcinoma (HT-29 and Caco-2), in

which it induced apoptosis (Sailer *et al.*, 2003; Sailer *et al.*, 2004; Vij & Hardej, 2012). These data suggest an anticancer potential of the DPDT. Therefore, in order to better elucidate the potential and efficacy of DPDT and TMZ, the present work aims to evaluate the cytotoxic effects of this two compounds, in isolated and associated regimens, after acute and chronic exposure of human glioma cell cultures.

## Materials and Methods

**Chemicals and Cell lines.** DPDT (CAS registry number 32294-60-3), TMZ (CAS registry number 85622-93-1), dimethyl sulfoxide (DMSO) (CAS registry number: 67- 68-5) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyl-tetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, and antibiotics were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). All other reagents were of analytical grade. Non-resistant glioma tumor cells, M059J (CRL-2366™), purchased from the American Type Culture Collection (ATCC®) and TMZ-chemoresistant glioma tumor cells (GBM), obtained from the resection of a patient with glioblastoma from Celso Ramos Hospital, Florianopolis, SC, Brazil, ethics committee of UFSC (CEPSH - 108,286).

**Cell Culture and Treatments.** M059J and GBM cells were cultivated in standard conditions with Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) and supplemented with 10 % inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic (penicillin-streptomycin). Cells were maintained in 25 cm<sup>2</sup> culture bottles at 37 °C and humid atmosphere with 5 % CO<sub>2</sub>. Cells were seeded in 5 mL of complete medium in 25 cm<sup>2</sup> bottles and incubated for growth for at least 24 h to reach 60-80 % of confluence. All cell lines were periodically tested for Mycoplasma contamination with DAPI staining. For harvesting and culture establishment, PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4) and 0.25 % trypsin-EDTA were used. For the experiments, TMZ and DPDT were diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) and further diluted in DMEM culture medium, obtaining different concentrations. The final concentration of DMSO used in the cultures was 0.5 % to prevent DMSO cytotoxicity. Glioma tumor cells were treated with the concentrations 25, 50, 100, 250 μM of the chemotherapeutic TMZ for 120 h. From 1 to 3 μM of DPDT for 24 h; from 0.0025 to 2.5 nM for 120 h; 50 μM of TMZ + 2.5 nM of DPDT for M059J; and 100 μM of TMZ + 2.0 nM of DPDT for GBM, for 120 h. Prior to treatment the cells were washed with PBS buffer

and discarded from the bottle with trypsin solution.

**Primary Culture of Human Glioblastoma Cells.** GBM cell line sample was obtained through surgical resection performed in a patient at the Celso Ramos hospital, in Florianópolis, Santa Catarina. The sample collected by surgeons was placed in 15 ml conical tubes containing DMEM-F12 and 10% FBS and transported to the Federal University of Santa Catarina (UFSC) for further processing. Once in laminar flow, the tumor fragment was dissected with removal of the cerebral meninges and blood vessels. The tissue was mechanically dissociated with trypsin and aided by a Pasteur pipette. Then the cells were washed with PBS and plated in 25 cm<sup>2</sup> culture bottles containing DMEM-F12 plus glucose (0.6%), glutamine (2 mM), sodium bicarbonate (0.06 %) and penicillin / streptomycin (1 U / 1 µg) and supplemented with 10% FBS. Cells were kept in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 ° C. All procedures and authorization forms for obtaining the samples were approved by the human research ethics committee of UFSC (CEPSH - 108,286).

**Determination of cell viability:** Cell viability was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. It is based on the conversion of MTT to formazan crystals by mitochondrial dehydrogenases as described by Mosmann (1983), with minor modifications, in order to verify the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of the cells in response to treatment with their respective chemotherapeutic. Briefly, 5 × 10<sup>3</sup> GBM cells and 6 × 10<sup>3</sup> M059J cells per millilitre were seeded with culture medium supplemented in the 96-well plate. Afterwards, the cells were treated with different concentrations of the chemotherapeutic TMZ and DPDT, as previously explained. For all the treatments, after 24 h and 120 h, a solution of MTT (1 mg/ml in serum-free medium) was incubated for 2 h. The formed formazan crystals were dissolved with DMSO for 30 min and the absorbance was measured using a microplate reader (Spectra Max 190, Molecular Devices) at 570 nm. All readings were compared to the control absorbance. Percent growth inhibition was calculated as cell viability (%) = (experimental absorbance / control absorbance) x 100, generating ratio of IC<sub>50</sub>. Each experiment was performed in triplicate.

**Cell survival measurement through percentage population:** CPD (Cumulative Population Doubling) was performed with little modifications as previously described by Silva *et al.*, (2016). Briefly, human M059J and GBM cells were plated at a density of 1.5

$\times 10^4$  cells per well in a 12-well plate and 1 mL of DMEM, producing a density of 40 cells/mm<sup>2</sup> (~ 4% confluence), and treated for 120 h with 25, 50 and 100  $\mu$ M of TMZ. After this, the cells were washed, reseeded in a 12-well plate with culture medium supplemented and analyzed for 28 days (on days 6, 9, 12, 15, 20, 23, 30, 36) after drug withdrawal. Cells were counted and analyzed using a GUAVA flow cytometer and GUAVA Cytosoft software. The handling of cells was always performed between 20% and 80% confluence. The re-seeding of cells was performed using an amount of cells needed to reach at least 4% confluence.

**Autophagy evaluation:** Acridine orange (AO) is a marker of acidic vesicular organelles (AVOs) that fluoresces green in the whole cell except in acidic compartments (mainly late autophagosomes), where it fluoresces red. Cells were processed as previously described for CPD experiment. 1  $\mu$ g/ml of the AO solution was added in the dark and, after gentle homogenization, the plate was wrapped in foil for 15 min prior to reading on the cytometer, described previously by Jiang *et al*, (2009), with little modifications, using a GUAVA flow cytometer and GUAVA Cytosoft software.

**Statistical analysis.** The data were obtained from at least three independent experiments, except for the CPD test, and the results are expressed as mean  $\pm$  SD. Mean values of isolated treatments and combined treatment were analyzed by GraphPad Prism 7, using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by test of Dunnet with  $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$  or Tukey with  $p < 0.0001$  considered as statistically significant.

## Results

### Cell Viability after TMZ exposure

Human glioma tumor M059J and TMZ resistant GBM cell lines were exposed to TMZ (25, 50, 100, 250  $\mu$ M) for 120 h and analyzed by MTT assay. As observed in Figure 1, TMZ was able to induce a decrease in cell viability in dose-response manner ( $p < 0.0001$ ) in both cell lines. In addition, GBM cell line was more resistant to TMZ exposure when compared to M059J cell line. Concentrations of 50 and 100  $\mu$ M were estimated as IC<sub>50</sub> values for M059J and GBM cells, respectively.

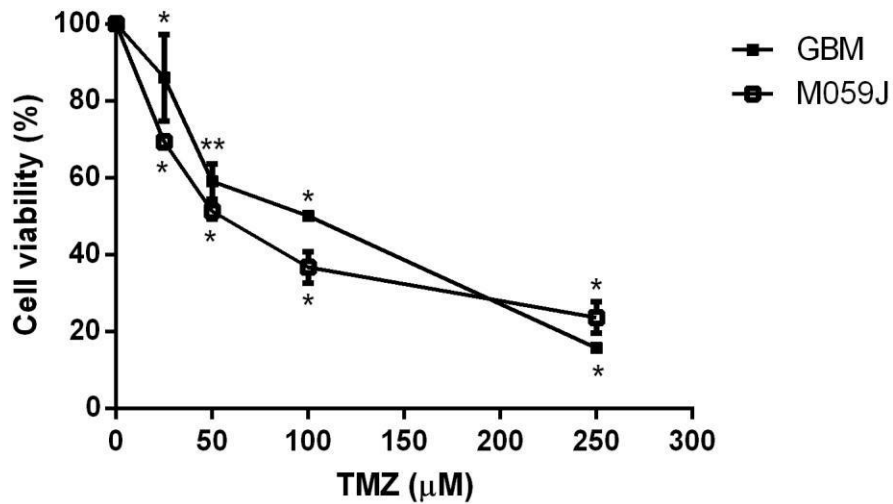


Figure 1. Cell viability of M059J and GBM cell lines after TMZ exposure for 120 h. Data were analyzed by One Way ANOVA Dunnet: \*  $p < 0.0001$ ; \*\*  $p < 0.05$ . Results are expressed by the mean  $\pm$  standard deviation. Each analysis was performed in triplicate.

Cumulative population doublings (CPDs) showed a significant decrease in the cell number for M059J and GBM cells treated with 25, 50 and 100  $\mu\text{M}$  TMZ, during the 120 h of drug exposition. GBM cells were less sensible to TMZ exposure than M059J cells (Fig. 2). After drug withdrawal, the tendency would be the number of cells to be much close to the control values. However, these cells still decreased their number indicating a long-term effect of TMZ (Fig. 2).

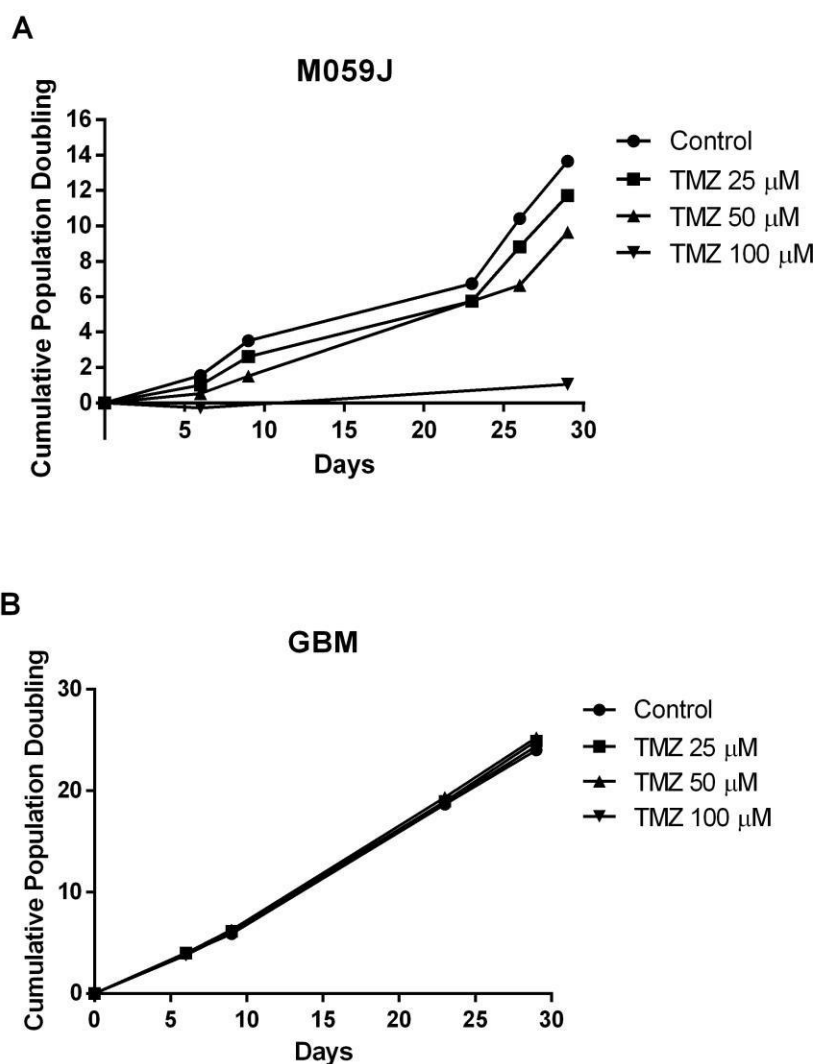


Figure 2. Cumulative Population Doubling. The M059J (A) and GBM (B) cells were treated with 25, 50, 100  $\mu$ M TMZ for 120 h, followed by growth in the drug-free medium (DFM) for the indicated time.

Autophagy has been increasingly implicated in both as cell death and cell chemotherapeutic resistance process, depending on the environmental conditions and cellular status (Toton *et al.*, 2018). According to the results presented in Fig. 3, TMZ increased the percent of AVO-positive cells in the population, being evident from 120 h treatment across the cell lines. Moreover, a TMZ-long-term effect was observed after almost 1 month for all cell lines.

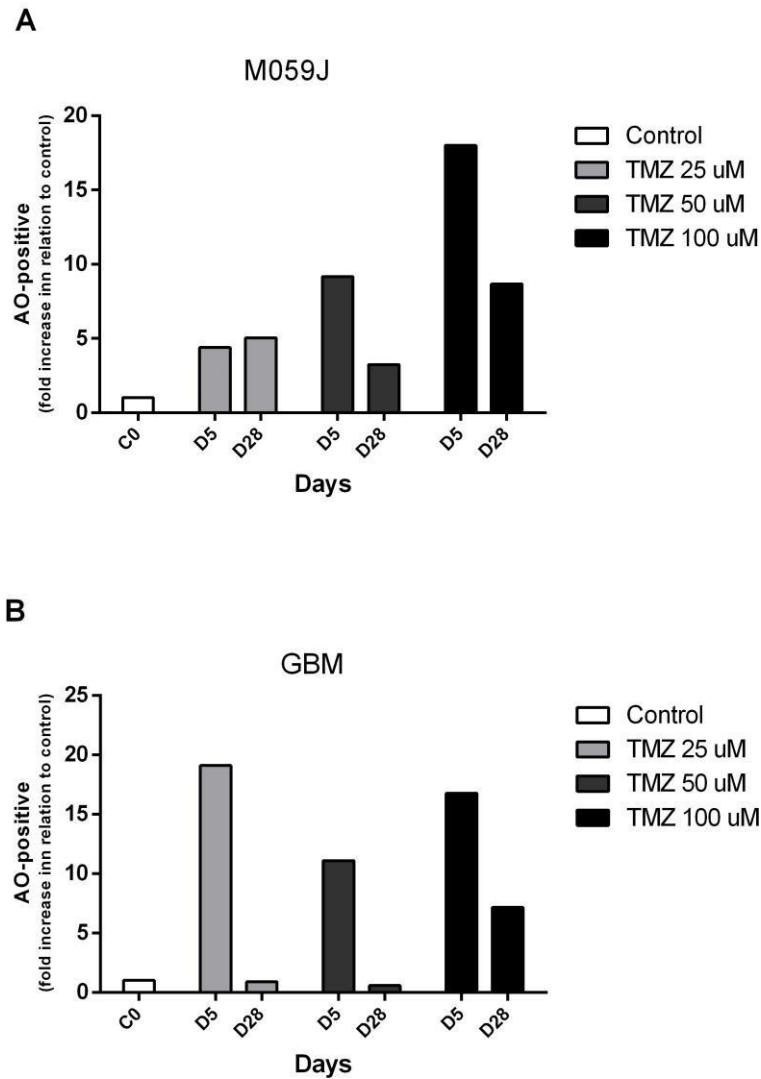


Figure 3. Flow cytometry analysis of acridine orange staining in (A) M059J cells treated with 120 h of TMZ; (B) GBM cells treated with 120 h of TMZ.

### Cell Viability after DPDT exposure

After exposure, DPDT was able to induce a decrease in cell viability in dose-response manner in human glioma tumor M059J and TMZ resistant cell line (Fig. 4). Results shows a slightly difference in sensitivity to DPDT exposure to 24 h and 120 h, with  $IC_{50}$  values of 2.5  $\mu$ M for M059J and 2.3  $\mu$ M for GBM, in 24 h, and 2.5 and 2.0 nM, respectively, in 120 h (Table 1).

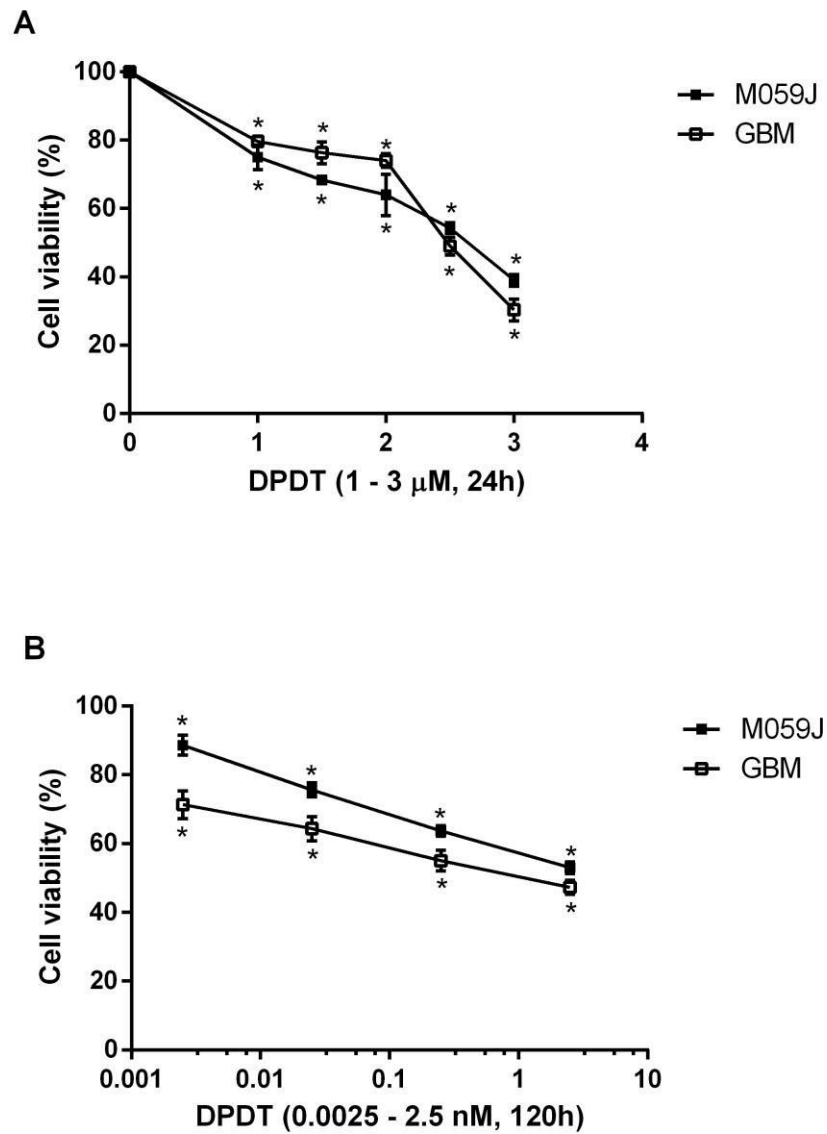


Figure 4. (A) Viability of M059J and GBM cell lines after 24 h of DPDT exposure. Bars indicate standard deviation. (B) Viability of M059J and GBM cell lines after 120 h of DPDT exposure. Data were analyzed by One Way ANOVA Dunnet: \*  $p < 0.001$ . Results are expressed in by the mean  $\pm$  standard deviation.

Table 1 - Values for 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide Assay – Temozolomide and Ddiphenyl Ditelluride exposure

Cell Line	IC <sub>50</sub> values for MTT assay		
	TMZ	DPDT	
	120 h *	24 h	120 h
M059J	50 μM	2.5 μM	2.5 nM
GBM	100 μM	2.3 μM	2.0 nM

\*Time of exposure



## Cell viability after association treatment of TMZ and DPDT

To investigate a synergistic activity potential in TMZ and DPDT association, we used the  $IC_{50}$  values obtained in the previous assays to verify their combined activity. M059J and GBM cells were exposed to 50  $\mu$ M and 100  $\mu$ M of TMZ, respectively; DPDT, 2.5 nM and 2.0 nM, respectively; and 50  $\mu$ M of TMZ + 2.5 nM of DPTD for M059J; and 100  $\mu$ M of TMZ + 2.0 nM of DPDT for GBM, after 120h of exposure. As demonstrated in Fig. 5, the combined treatment was significantly more cytotoxic in both cell lines when compared with each isolated treatment after 120 h of cell exposure.

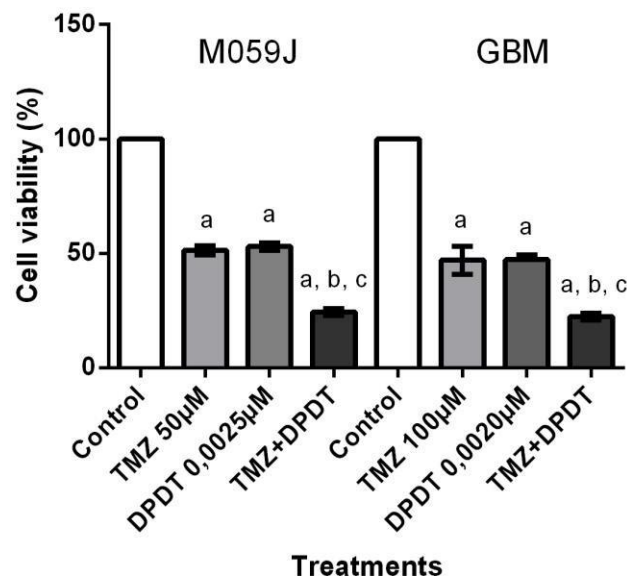


Figure 5. Comparative graph of cell viability using  $IC_{50}$  of isolated TMZ and DPDT and on a co-exposure (TMZ  $IC_{50}$  +DPDT  $IC_{50}$ ). Each bar represents the mean survival percentage  $\pm$  SD relative to the control, which was normalized to 100% and correspond to the statistical difference using one way ANOVA Tukey's multiple comparison test: <sup>a</sup> in relation to negative control, <sup>b</sup> in relation to TMZ and <sup>c</sup> in relation to DPDT (<sup>a, b, c</sup>  $p < 0.0001$ ).

## Discussion

Besides being the most common primary form in adults (Zhang, Stevens & Bradshaw, 2012; Ensign *et al.*, 2016), glioblastoma multiforme is the most malignant grade IV astrocytoma (macroglia tumors) according to the classification of the World Healthy Organization (Louis *et al.*, 2007). This degree is due to special features, like malignant cytology, mitotically active, prone to necrosis typically associated with extensive infiltration into the surrounding tissue, capable of microvascular proliferation, having rapid pre and post-surgical evolution, and fatal outcome (Louis *et al.*, 2007, Chen, 2015, Wang *et al.*, 2015).

TMZ has been widely used in patients with malignant gliomas, such as glioblastoma multiforme newly diagnosed concomitantly with radiotherapy (concomitant phase of treatment) and in posterior adjuvant (monotherapy treatment phase) and anaplastic astrocytomas, progressive or relapsing after the standard therapy (Friedman, Kerby & Calvert, 2000; Johnson & O'Neill, 2012). Although acting as a standard therapeutic agent, TMZ has not altered the prognosis for GBM in recent years (Zhang, Stevens & Bradshaw, 2012, Chen *et al.*, 2015, Annovazzi *et al.*, 2015). It is mainly due to the increase in the gene expression of O<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase (MGMT) (Zhang, Stevens & Bradshaw, 2012). MGMT is an enzyme, which reduces the cytotoxicity of O<sup>6</sup>-alkylating agents, such as TMZ, by catalyzing the transfer of methyl groups from the O<sup>6</sup> position of guanine to the cysteine residue via the active site of MGMT enzyme. The transfer of alkyl groups to MGMT leads to its inactivation, and activating a proteosomal degradation, known as "suicide enzyme". Unfortunately, many GBMs exhibit increased expression of MGMT, which reduces the effectiveness of alkylating agents such as TMZ, for example, a reduction in their expression in tumors is clinically relevant and an important cellular phenotype to be considered during treatment (Zhang, Stevens & Bradshaw, 2012, Chen *et al.*, 2015, Annovazzi *et al.*, 2015), since CPD experiment showed a significant decrease in the cell number for M059J and GBM treated with 25, 50 and 100  $\mu$ M TMZ, during the 5 d of drug exposition (Fig. 2). After drug withdrawal, these cells still decreased their number indicating a long-term effect of TMZ. Furthermore, these results confirmed the resistance of GBM cell line, since the high IC<sub>50</sub> value found in MTT assay (Fig. 1, Table 1). In addition, in CPD test, the duplication rate of this line was always high, even at the highest dosage, of 100  $\mu$ M TMZ (Fig. 2), compared to M059J cell line.

The regulation of protein degradation and organelle turnover by autophagy involves the participation of lysosomes, which are cellular organelles rich in acid hydrolase, an enzyme that is responsible for cellular and molecular degradation (Knizhnik *et al.*, 2013). Therefore, autophagy plays an important role in maintaining intracellular homeostasis. In this role, autophagy removes damaged or dysfunctional organelles and promotes cell survival under conditions of nutrient deprivation by degrading disposable intracellular content, thereby generating energy and the building blocks for protein synthesis (Pallauf & Rimbach, 2013). This pathway is characterized by the formation and promotion of AVOs (Palumbo *et al.*, 2012). Autophagy has already been shown to contribute to the resistance of tumor cells (Filippi-Chiela *et al.*, 2015), as part of the toxicity of TMZ in U373 cells (Kanzawa *et al.*, 2004), or as cytoprotective in

U251 cells (Zamin *et al.*, 2009), the cell lines of this study were tested for the presence of autophagy. In an attempt to sensitize these cells to TMZ, it was decided to use chloroquine, an autophagy inhibitor. However, no sensitization has been observed with the dose used (data not shown), so probably autophagy may contribute somewhat to resistance, but it is not the main mechanism. Flow cytometry with OA staining revealed that TMZ induced autophagy in M059J and GBM cells, suggesting autophagy as an underlying mechanism of action of TMZ (Fig. 3). These present findings were consistent with previous reports that autophagy was induced in malignant glioma cells following treatment by TMZ (Kanzawa *et al.*, 2004; Filippi-Chiela *et al.*, 2015).

In this study, it was possible to determine that the DPDT showed a dose-dependent cytotoxic effect. In the classical cell viability test for both cell lines, the IC<sub>50</sub> values were found in low doses (2.5  $\mu$ M for M059J and 2.3  $\mu$ M for GBM cells, after 24 h of treatment) (Fig 4, Table 1). After 120 h of treatment, cells were sensitive in lower concentrations such as 2.5 nM and 2.0 nM for each line, respectively (Fig.4). The decrease in the viability of these cells in similar doses, either in the 24 h or in the 120 h period, suggests that the effects of DPDT are independent of the resistance profile to TMZ (Fig. 5). Therefore, observing the effects of DTDF on M059J and GBM cells, there was a potentiation of the effects of TMZ, with a decline in cell viability to around 20% survival in comparison to the 50% of isolated treatments (Fig. 5).

Degrandi *et al.*, (2010) demonstrated that the treatment with cytotoxic doses of DPDT increased thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels and decreased GSH/GSSH ratio in yeast and V79 cells. When yeasts and cells were pre- incubated with N-acetylcysteine, which restored normal GSH content, DPDT reduced oxidative, genotoxic and mutagenic effects (Degrandi *et al.*, 2010). Moreover, it has been suggested that drug resistance in cancer cells can be related to redox status (Kuo, 2009, Simons *et al.* 2009, Maiti, 2012). One hypothesis is that the results presented in this experiments are due to the fact that glutathione (GSH) and GSH- related enzymes are part of an antioxidant system that mediates resistance to drugs in glioblastoma by the regulation of redox homeostasis (Traverso *et al.*, 2013) and that DPDT would be acting in this system and generating cell death. It is known that GSH is one of the most important systems of cell protection against free radicals and contributes for drug resistance, preventing damage to proteins or DNA or by participating in DNA repair process (Traverso *et al.*, 2013). Recently, a study demonstrated that TMZ-resistant glioma cells showed lower levels of endogenous reactive oxygen species (ROS) and higher levels of total antioxidant capacity and GSH than sensitive cells, with higher

expression of glutathione reductase (GSR) in TMZ-resistant cells than in sensitive cells (Zhu *et al.*, 2018). Other studies have reported that intracellular GSH levels are highly correlated with drug resistance in human ovarian cancer cell versus platinum (Belotte *et al.*, 2013) and human multiple myeloma cells against arsenic trioxide (Srivastava *et al.*, 2013). In addition, when silenced in glioma drug-resistant cells, GSR improved the sensitivity of cells to TMZ or cisplatin, however its overexpression in sensitive cells resulted in chemoresistance. GSH and GSH-related enzymes would be involved in mediating drug resistance and could be a potential target for improving GBM treatment (Backos *et al.*, 2014).

To summarize, we propose that DPDT in association with TMZ, sensitizes cells to TMZ effects, considerably reducing cell viability of resistant and non-resistant glioma cells. This mechanism would be due to its high GSH content compared to non-TMZ resistant cells, thus demonstrating the relationship between TMZ-DPDT and that the GSH-system to redox homeostasis, regulating drug responsiveness. The combination of DPDT and TMZ would be beneficial to patients because it would increase the sensitization of cells and reduce the toxic effects of TMZ. It is important to emphasize that for such application in the clinic, it is necessary to analyze the ranges of efficacy and safety of such association, through toxicological pharmacology pre-clinical tests. Thus, research that seeks to understand the molecular mechanisms present in the antitumor activity of DPDT, as well tests in non- tumor cell lines, are necessary to promote its development as a therapeutic agent against cancer.

### **Conflict of Interest Disclosure**

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Abondanza T.S. *et al.* (2008). Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium(IV) compound RT-04. ***Food Chem Toxicol*** 46: 2540-2545.
- Amaravadi R.K. *et al.* (2007). Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. ***J. Clin. Invest.*** 117, 326–336. PMID: 17235397.
- Annovazzi L. *et al.* (2015). The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment. ***Int J Oncol.*** 46(6):2299-308. doi: 10.3892/ijo.2015.2963.
- Atif F. *et al.* (2015). The Synergistic Effect of Combination Progesterone and Temozolomide on Human Glioblastoma Cells. ***PLoS One.*** 10(6):e0131441. doi: 10.1371/journal.pone.0131441.
- Backos D.S. *et al.* (2014). The Role of Glutathione and the Glutathione-Linked Enzyme Systems in Brain Tumor Drug Resistance. In: ***Tumors of the Central Nervous System***, Volume 12, pp. 277-290. Springer.
- Belotte, J. *et al.* (2013). The role of oxidative stress in the development of cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer. ***Reprod Sci.*** 1933719113503403.
- Carrillo J.A.; Munoz C.A (2012). Alternative chemotherapeutic agents: nitrosoureas, cisplatin, irinotecan. ***Neurosurg Clin N Am.*** 23(2):297-306, ix. doi: 10.1016/j.nec.2012.01.005.
- Chasteen T.G. *et al.* (2009). Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance, pp. 820-832 in ***FEMS Microbiol Rev.***
- Chen C.C. (2015). Advances in ***DNA repair***. InTech, under CC BY 3.0 license. doi: 10.5772/58716.
- Chesler D.A.; Berger M.S.; Quinones-Hinojosa A. (2012). The potential origin of glioblastoma initiating cells. ***Front Biosci (Schol Ed)***. 1;4:190-205. PMID: 22202053.
- Cunha R.L.; Gouvea I.E.; Juliano L. (2009). A glimpse on biological activities of tellurium compounds. ***Acad Bras Cienc.***, 81:393–407. PMID: 19722011.
- Cunha R.L.O.R. *et al.* (2005) Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium(IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*** 15: 755-760.
- Degrandi T.H. *et al.* (2010). Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. ***Mutagenesis.*** 25:257–269. doi: 10.1093/mutage/geq002.
- deSouza R.M. *et al.* (2016). Has the survival of patients with glioblastoma changed over the years? ***Br J Cancer.*** 19;114(2):146-50. doi: 10.1038/bjc.2015.421.
- Engman L. *et al.* (2003). Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells. ***Bioorg Med Chem.*** 11(23):5091-100. PMID: 14604673.
- Engman L. *et al.* (1995). Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. ***Free Radical Biology and Medicine.*** 9:441–452. doi: 10.1016/0891-5849(95)00035-V.

- Filippi-Chiela E.C. et al. (2015). Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy*. (7):1099-113. doi: 10.1080/15548627.2015.1009795.
- Friedman H.S.; Kerby T.; Calvert H. (2000). Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 6(7):2585-97. PMID: 10914698.
- Ghotme K.A. et al. (2017). Gliomas: New Perspectives in Diagnosis, Treatment and Prognosis. *Curr Top Med Chem*. PMID: 28049399.
- Hiddingh L. et al. (2014). Identification of temozolomide resistance factors in glioblastoma via integrative miRNA/mRNA regulatory network analysis. *Sci Rep*. 11;4:5260. doi: 10.1038/srep05260.
- Huang B. et al. (2017). Advances in Immunotherapy for Glioblastoma Multiforme. *J Immunol Res*. 2017:3597613. doi: 10.1155/2017/3597613.
- Jiang H. et al. (2005). Resveratrol- induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol Cancer Ther*. 2005;4:554- 61.
- Johnson D.R.; O'Neill B.P. (2012). Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol*. 107(2):359-64. doi: 10.1007/s11060- 011-0749-4.
- Jorge P.M. et al. (2015). Diphenyl ditelluride-induced cell cycle arrest and apoptosis: a relation with topoisomerase I inhibition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*., 116(3):273-80. doi: 10.1111/bcpt.12315.
- Kanzawa T. et al. (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ*. 11:448-57. PMID: 14713959.
- Knizhnik A.V. et al. (2013). Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS One*. 8(1):e55665. doi: 10.1371/journal.pone.0055665.
- Kuo M.T. (2009). Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. (1):99-133. doi: 10.1089/ars.2008.2095.
- Lee S. Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme, *Genes Dis*. 3. 198e210. doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.055.
- Lenting K. et al. (2017). Glioma: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 133(2):263-282. doi: 10.1007/s00401-017-1671-4.
- Lewis K. M.; Petritsch, C. (2013). Asymmetric cell division: implications for glioma development and treatment. *Translational Neuroscience*, 4(4), 484–503. <http://doi.org/10.2478/s13380-013-0148-8>.
- Louis D.N., et al. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 114(2): p. 97-109.
- Maiti A. K. (2012) Genetic determinants of oxidative stress mediated sensitization of drug resistant cancer cells. *Inter Jour of Can*. 130, 1-9.
- Meinerz D.F. et al. (2014). Differential genotoxicity of diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> and diphenyl ditelluride (PhTe)<sub>2</sub>. *PeerJ*. 18;2:e290. doi: 10.7717/peerj.290.

- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65(1-2):55-63. PMID: 6606682.
- Nogueira C.W.; Zeni G.; Rocha J.B. (2004). Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev*, 104(12): p. 6255-85. Doi.: 10.1021/cr0406559 C.
- Ogra Y. (2017). Biology and toxicology of tellurium explored by speciation analysis. *Metallomics*. 24;9(5):435-441. doi: 10.1039/c7mt00022g.
- Padma V.V. (2015). An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine*, 5(4), 19. doi: 10.7603/s40681-015-0019-4.
- Pallauf K.; Rimbach G. (2013). Autophagy, polyphenols and healthy ageing. *Ageing Res Rev*. 12(1):237-52. doi: 10.1016/j.arr.2012.03.008
- Palumbo S. et al. (2012). Different involvement of autophagy in human malignant glioma cell lines undergoing irradiation and temozolomide combined treatments. *J Cell Biochem*. 113:2308–2318. PMID: 22345070.
- Rooseboom M. et al. (2002). Tissue distribution of cytosolic beta-elimination reactions of selenocysteine Se-conjugates in rat and human. *Chem Biol Interact*. 15;140(3):243-64. PMID: 12204580.
- Sailer, B. L. et al. (2003). Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. *Arch Toxicol* 77: 30-36.
- Sailer B. L. et al. (2004). Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicol In Vitro* 18: 475-482.
- Sasaki K. et al. (2010). Chloroquine potentiates the anticancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer* 10, 370. doi: 10.1186/1471-2407-10-370.
- Silva A.O. et al. (2016). The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res*. ;348(2):177-183. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.09.014.
- Simons A. L. et al. (2009). Inhibition of glutathione and thioredoxin metabolism enhances sensitivity to perifosine in head and neck cancer cells. *Journal of oncology*. 2009.
- Souza A.C. et al. (2010). Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride: neurotoxic effect in brain of young rats, in vitro. *Mol Cell Biochem.*, 340: 179-185. doi: 10.1007/s11010-010-0416-7.
- Sredni, B. (2012). Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. *Semin Cancer Biol*. 22(1):60-9. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.12.003.
- Taylor A. (1996). Biochemistry of tellurium. *Biol Trace Elem Res.*, 55: 231-239. PMID: 9096851.
- Traverso N. et al. (2013). Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*. 2013, 972913.
- Trindade C. et al. Antigenotoxic and antimutagenic effects of diphenyl ditelluride against several known mutagens in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutagenesis*. 30(6):799-809. doi: 10.1093/mutagene/gev037.

- Vij P.; eD. Hardej, (2012). Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non- transformed human colon cells. **Environ Toxicol Pharmacol** 34: 768-782.
- von Neubeck C. et al. (2015). Glioblastoma multiforme: emerging treatments and stratification markers beyond new drugs. **Br J Radiol.** 88(1053):20150354. doi: 10.1259/bjr.20150354.
- Wang J.; et al. (2015). Progress in the application of molecular biomarkers in gliomas. **Biochem Biophys Res Commun.** 11;465(1):1-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.148.
- White E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. **Nature Rev. Cancer** 26;12(6):401-10. doi: 10.1038/nrc3262.
- Wong E.T. et al. (2011). Bevacizumab for recurrent glioblastoma multiforme: a meta-analysis. **J Natl Compr Canc Netw.** 9: 403–407. PMID: 21464145.
- World Health Organization (WHO) (2017). Early cancer diagnosis saves lives, cuts treatment costs. **Geneva:WHO.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/early-cancer-costs/en/>>. Acesso em: 09.02.18.
- Zhang J.; Stevens M.F.; Bradshaw T.D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. **Curr Mol Pharmacol.** 5(1):102-14. PMID: 22122467.
- Zhu Z. et al. (2018). Glutathione reductase mediates drug resistance in glioblastoma cells by regulating redox homeostasis. **J Neurochem.** (1):93-104. doi: 10.1111/jnc.14250.



## 5. DISCUSSÃO GERAL

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais comum de tumor cerebral maligno, sendo altamente agressivo, proliferativo e invasivo (Furnari *et al.*, 2007; Louis *et al.*, 2016). Raramente é passível de ressecção cirúrgica e possui prognóstico desfavorável aos pacientes, apresentando alta taxa de recorrência (Furnari *et al.*, 2007; Louis *et al.*, 2016). Nos últimos 10 anos não foi observado melhora significativa no prognóstico de pacientes com GBM (von Neubeck *et al.*, 2015; de Souza *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017), e esforços têm-se voltado para o desenho racional de novos agentes antitumorais e/ou a combinação de fármacos já amplamente utilizados na clínica. Como exemplos, cita-se o uso isolado da temozolomida (TMZ) (Zhang, Stevens & Bradshaw, 2012; von Neubeck *et al.*, 2015; Ensign *et al.*, 2016) e a associação desta com tratamentos utilizando o bevacizumab (Wong *et al.*, 2011; Nanegrungsunk *et al.*, 2015), as nitrosoureas (Westphal *et al.*, 2006; Gutenberg *et al.*, 2013) e a cisplatina (Carrilho & Munoz, 2012; Weller *et al.*, 2013; Glaser *et al.*, 2017). No entanto, os resultados para os pacientes ainda têm se mostrado insatisfatórios, com tempo médio de sobrevida de 14,6 meses e taxa de sobrevida média de 5 anos menor de 5% (Huang *et al.*, 2017). Portanto, busca-se o desenvolvimento de novas estratégias para reverter tal quadro e melhorar a eficácia e o prognóstico do GBM (Kuczynski *et al.*, 2013).

Diversos mecanismos celulares de resistência aos quimioterápicos têm sido descritos em gliomas (Hombach-Klonisch *et al.*, 2018). É conhecido que a atuação da enzima O6-metilguanina DNA metiltransferase (MGMT) configura-se como um dos principais mecanismos devido ao fato de reparar danos ao DNA causados por agentes alquilantes, como a TMZ, a carmustina (BCNU) e a nimustina (ACNU), (Beier *et al.*, 2011; Johannessen & Bjerkvig, 2012; Hombach-Klonisch *et al.*, 2018). Esta “enzima suicida” catalisa a transferência de grupos metil da posição O6 da guanina para o resíduo de cisteína por meio do sítio ativo da MGMT, levando a inativação desta e sua degradação via proteossomal. Entretanto, a quimiorresistência em gliomas está longe de se resumir a presença ou não de MGMT e outros fatores como status de p53, expressão de enzimas de reparo, processos de ativação e detoxificação têm também papel central na resistência a drogas antitumorais em gliomas (Hombach-Klonisch *et al.*, 2018). Nesse contexto, uma terapia do câncer bem-sucedida deve garantir a erradicação de todas as células tumorais clonogênicas do organismo, pois as células cancerosas sofrem divisão ilimitada e mesmo uma única célula pode vir a ser fonte de um clone que originará um tumor recorrente (Auffinger *et al.*, 2015). Além do mais, o

bloqueio de apenas uma via metabólica celular possui um efeito reduzido e a combinação de várias terapias específicas pode ser um importante aspecto a ser considerado futuramente (Merrell, Quant & Wen, 2010; Narayanan & Price, 2012).

Nos anos 80, a descoberta de interessantes propriedades farmacológicas do selênio (Kim *et al.*, 2014) inspiraram o estudo de outro elemento da mesma família dos calcogênios, o telúrio (Te) (Comasseto *et al.*, 1997; Comasseto, 2010). Este metaloide é amplamente explorado na área industrial (Taylor, 1996; Ogra, 2017) e possui compostos derivados reconhecidamente tóxicos, dependendo das suas vias de exposição, dose aplicada e estado de oxidação (Nogueira, Zeni & Rocha, 2004). Compostos organotelurados (OT) ainda não são amplamente estudados quanto às suas propriedades biológicas e antitumorais *in vivo*, embora haja vários estudos relatando suas propriedades antioxidante, quimioprotetiva, imunomoduladora, citotóxica e antitumoral *in vitro* (Degrandi *et al.*, 2010; Halpert & Sredni, 2014; Jorge *et al.*, 2015; Trindade *et al.*, 2015; Vij & Hardej, 2016; Juchem, 2016).

As propriedades físico-químicas dos compostos OT permitem que estas substâncias tenham importantes aplicações farmacológicas (Nogueira *et al.*, 2004; Degrandi *et al.*, 2010; Trindade *et al.*, 2015). Os teluretos de diarila provavelmente possuem atividade mimética da enzima glutathiona peroxidase e, por isso, são investigados como agentes quimiopreventivos (para revisão ver: Nogueira *et al.*, 2004). O aminoácido modificado Te-fenil-L-telurocisteína é capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio e algumas isoenzimas do sistema citocromo P-450, as quais são responsáveis pela ativação de pró-carcinógenos (Roosebom *et al.*, 2002). O telurato de tricloro amônio dioxoetileno-O,O' (AS-101) é potencial imunomodulador em pacientes com doenças auto-imunes (Halpert & Sredni, 2014). Além disso, em roedores, inativou proteases de cisteína, como a catepsina B, a inibição de proteínas de sobrevivência do tumor, como a survivina ou a obstrução da produção de interleucina 10 (IL-10) tumoral (Sredni, 2012).

No capítulo I foi demonstrado que a TMZ é citotóxica para ambas as linhagens testadas, apresentando valor de IC<sub>50</sub> maior na linhagem resistente, GBM (100 µM), quando comparado à linhagem M059J (50 µM) (Fig. 1, Tabela 1). A resistência à TMZ da linhagem GBM foi confirmada pelo teste CPD (Capítulo I, Fig. 2) e tais dados corroboram com outros resultados descritos na literatura (Atif *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016). Considerando a autofagia como mecanismo de resistência, tentou-se sensibilizar as células com cloroquina (dados não mostrados). Como não houve essa sensibilização, mostra-se que a autofagia pode favorecer a resistência, mas não é o

mecanismo principal nessas linhagens. Assim sendo, os nossos resultados são consistentes com os relatos prévios de que a autofagia, e não apenas a apoptose, foi induzida em células de glioma maligno após tratamento por TMZ (Kanzawa *et al.*, 2004; Filippi-Chiela *et al.*, 2015).

Ainda no capítulo I, foi demonstrado que o DTDF possui um efeito citotóxico dose-dependente nas linhagens M059J e GBM, em uma faixa de concentração aproximada e menor do que a utilizada com TMZ, após 24 h de tratamento e, também, após 120 h de tratamento (Fig. 4, Tabela 1). Ainda, foi observado que o DTDF sensibilizou as células ao tratamento com TMZ. É importante salientar que essa sensibilização ocorreu em níveis similares em ambos, 24 h e 120 h de tratamento (Fig. 5), evidenciando que os efeitos do DTDF são independentes do perfil de resistência à TMZ. Portanto, o DTDF em células M059J e GBM, potencializou os efeitos da TMZ, com um declínio da viabilidade celular para apenas 20% de sobrevivência (Fig. 5).

A toxicidade do DTDF, e possivelmente suas ações antiproliferativa, genotóxica e mutagênica, são devidas em parte pela sua capacidade de induzir estresse oxidativo, ao que se deve à alteração da expressão de genes e proteínas antioxidantes (Degrandi *et al.*, 2010; Trindade *et al.*, 2015; Juchem, 2016). Neste sentido, o DTDF mostrou-se capaz de oxidar grupamentos tiólicos em proteínas, afetando uma série de enzimas importantes, como a  $\delta$ -ALA-D, a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  e a tiorredoxina redutase (TrxR). Entre essas proteínas, a TrxR é atuante na resposta a estresse, reparo de proteínas e proteção contra o dano oxidativo (Arner & Holmgren, 2000; Lillig & Holmgren, 2007; Comparsi *et al.*, 2012). Esta enzima é superexpressa em diversos tumores primários, como pulmão, cólon, cervical, fígado, pâncreas, colorretal e de células escamosas (Engman *et al.*, 2003; Cunha, Rocha & Nogueira, 2005; Gouvea & Juliano, 2009; Borges, Souza *et al.*, 2010). Além disso, efeitos sobre a atividade da TrxR podem gerar efeitos deletérios nas células, levando à citotoxicidade e morte celular (Carvalho *et al.*, 2008). TrxR é um promissor alvo redox para a futuros testes envolvendo terapia anticâncer (Zhang *et al.*, 2017) e o DTDF.

Como descrito por Degrandi e colaboradores (2010), essa molécula aumentou os níveis de peroxidação lipídica e redução na relação GSH/GSSH, em doses acima de 50  $\mu\text{M}$  em leveduras e em doses superiores a 0,5  $\mu\text{M}$  em células de fibroblasto de hamster chinês (V79) (Degrandi *et al.*, 2010). A glutatona (GSH) faz parte de um dos sistemas antioxidantes mais importantes de proteção celular contra radicais livres e contribui para a resistência quimioterápica ao prevenir danos contra o DNA (Traverso *et al.*, 2013). A GSH é capaz de inibir o possível efeito deletério que espécies reativas de oxigênio

(ERO) possam exercer em moléculas biológicas. Além do efeito antioxidante, GSH tem papel fundamental na destoxificação de agentes xenobióticos (Traverso *et al.*, 2013).

Dessa forma, vários trabalhos demonstram a correlação entre altos níveis intracelulares de GSH e resistência aos danos causados por diversos quimioterápicos, como a cisplatina (Chen & Kuo, 2010; Meijer *et al.*, 1992), antraciclinas, como a doxorubicina (Zaman *et al.*, 1995) e agentes alquilantes, como o melfalan e a TMZ (Mulcahy *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2018). Nesta direção, tem sido demonstrado que células de glioma resistentes à TMZ apresentam menores níveis de ERO endógenas e maiores níveis de capacidade antioxidante total e de GSH do que células sensíveis (Zhu *et al.*, 2018). Sendo assim, a capacidade do DTDF oxidar a GSH, a qual já foi descrita como superexpressa em linhagens de glioma (Zhu *et al.*, 2018), é umas das possíveis vias de sensibilização das células aos efeitos da TMZ. Entretanto, testes adicionais são necessários para melhor elucidar esta hipótese.

Outra hipótese sugerida para o mecanismo de ação do DTDF seria que, além da possível capacidade do DTDF induzir um estado de estresse oxidativo na célula, ele inibe a enzima topoisomerase I (topoI) em DNA plasmidial e que linhagens de leveduras deficientes em topoI mostraram-se resistentes aos tratamentos com DTDF quando comparadas às linhagens selvagens (Jorge *et al.*, 2015). Em células V79, o DTDF causa lesões no DNA, como danos oxidativos e quebras de fitas simples e duplas, aumentando a proporção de células na fase S (Degrandi *et al.*, 2010; Jorge *et al.*, 2015). Em outro estudo, o DPDT interferiu no processo de replicação e causou acúmulo de lesões no DNA, o que levou a parada no ciclo celular em G2/M e morte celular em linhagens celulares de fibroblasto humano (MRC5) e câncer do colorretal humano (HCT116) (Juchem, 2016). Corroborando com estes resultados, Sailer e colaboradores (2003) observaram que o DTDF induz parada ciclo celular em G2/M, em linhagem de leucemia promielocítica HL-60 (Sailer *et al.*, 2003). Outro composto organotelurado, o AS101, também causa parada no ciclo celular em G2/M e apoptose em células de mielomas múltiplos, processo no qual diversas vias moleculares podem estar envolvidas (Naor *et al.*, 2013). Em um estudo utilizando o DTDF em células HT-29, foi observado a diminuição significativa da viabilidade celular pelo ensaio de MTT (62,5 µM a 1000 µM) e a ativação de caspases 3/7 e caspase 9, confirmando a ação antiproliferativa do DTDF por apoptose. É importante notar que também foi observado um decréscimo na taxa de GSH/GSSH, o que sugere que o DTDF reage com grupos tiol, particularmente GSH (Vij & Hardej, 2016). Nesse contexto, resultados similares foram demonstrados em células V79 (1 µM – 10 µM) e *Saccharomyces cerevisiae*

(concentrações a partir de 100  $\mu$ M) (Degrandi *et al.*, 2010; Jorge *et al.*, 2015). Também em células HT-29, foi verificada alterações na expressão de genes e proteínas antioxidantes (glutathione peroxidase, glutathione reductase, entre outras), além de um aumento significativo de heme-oxidase (OH-1) nas células, em concentrações de 500 a 1000  $\mu$ M de DTDF (Vij & Hardej, 2016). Isso fortaleceu a hipótese de que a ação antiproliferativa e genotóxica seja consequência do estresse oxidativo gerado pelo DTDF (Degrandi *et al.*, 2010; Trindade *et al.*, 2015; Vij & Hardej, 2016; Juchem, 2016).

Por fim, sabe-se que o tratamento com TMZ causa profunda linfopenia, mielosupressão e vários outros efeitos colaterais aos pacientes (Stepanovic & Nikitovic, 2018). Somado a isso, mesmo que sejam inicialmente responsivos, os gliomas tendem a rescindir (Jhanwar-Uniyal *et al.*, 2015). Esses dados em conjunto sugerem então a importância de se ampliar o conhecimento de como a TMZ induz morte celular e quais as vias de resistência relacionadas. Considerando que o DTDF sensibiliza células resistentes e não-resistentes ao tratamento com TMZ, seria uma estratégia interessante utilizar o DTDF e a associação deste no tratamento de gliomas, visando reduzir as doses de TMZ empregadas na clínica e possibilitar uma real diminuição dos efeitos colaterais aos pacientes. Entretanto, faz-se necessário realizar estudos farmacológicos pré-clínicos para estabelecer as faixas de dose seguras e eficazes para a utilização do DPDT e em associação com a TMZ.

## 6. CONCLUSÃO GERAL

O conjunto dos resultados desse trabalho mostrou que o DTDF sensibiliza células de glioma resistentes (GBM) e não resistente (M059J) à TMZ, reduzindo consideravelmente a viabilidade dessas células. Essas observações nos levam a concluir que o DTDF em associação à TMZ seria uma estratégia para reduzir as doses de TMZ empregadas no tratamento de gliomas na clínica.

### 6.1. Conclusões Específicas

1. Em doses que representam 50 % de viabilidade celular, a linhagem GBM mostrou-se mais resistente às doses de TMZ utilizadas, quando comparada à linhagem M059J, após exposição crônica (120 h).
2. A resistência à TMZ da linhagem GBM também foi evidenciada no teste de duplicação cumulativa de população.
3. Utilizando a coloração de laranja de acridina, demonstrou-se que autofagia favorece a resistência à TMZ em ambas linhagens GBM e M059J.
4. O DTDF sensibilizou as células resistentes e não-resistentes ao tratamento com TMZ, diminuindo consideravelmente a viabilidade celular dessas linhagens, o que sugere que seu efeito é independente do perfil de resistência à TMZ.

## 7. PERSPECTIVAS

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

1. Avaliar a resposta celular de outras linhagens de glioma ao tratamento combinado com DTDF e TMZ;
2. Investigar o perfil redox de linhagens de glioma, antes e após a exposição ao DTDF e deste em associação à TMZ;
3. Verificar o potencial antitumoral do DTDF em terapia combinada com outros quimioterápicos em linhagens de glioma, como bevacizumab, nitrosureias, cisplatina, doxorubicina e 5-fluouracil;
4. Analisar o potencial antitumoral do DTDF *in vivo* em tumores xenográficos de glioblastoma multiforme;
5. Estabelecer o mecanismo de sinergia entre temozolomida e ditelureto de difenila.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Cancer Society (ACS) (2015). Cancer Facts & Figures 2015. **Atlanta: ACS.**
- Andrén-Sandberg Å. (2011). Pancreatic cancer: chemotherapy and radiotherapy. **N. Am. J. Med. Sci.**, 3(1), 1–12. doi: 10.4297/najms.2011.31.
- Annovazzi L. et al. (2015). The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment. **Int J Oncol.** 46(6):2299-308. doi: 10.3892/ijo.2015.2963.
- Arnér E.S.; Holmgren A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Eur J Biochem.** 267(20):6102-9. PMID: 11012661.
- Atif F. et al. (2015). The Synergistic Effect of Combination Progesterone and Temozolomide on Human Glioblastoma Cells. **PLoS One.** 10(6):e0131441. doi: 10.1371/journal.pone.0131441.
- Auffinger B. et al. (2015). The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. **Expert Rev Neurother.** 15(7):741-52. doi: 10.1586/14737175.2015.
- Blakeley J. (2008). Drug delivery to brain tumors. **Curr Neurol Neurosci Rep.** 8(3):235-41. PMID: PMC3998643.
- Borges V. C.; Rocha J.B.; Nogueira C.W. (2005). Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. **Toxicology.**, 215: 191-197. Doi: 10.1016/j.tox.2005.07.002.
- Brat D.J. et al. (2007). Newly codified glial neoplasms of the 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: angiocentric glioma, pilomyxoid astrocytoma and pituicytoma. **Brain Pathol.** 17(3): p. 319-24.
- Brozmanová J. et al. (2010). Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. **Arch Toxicol.** 84(12):919-38. doi: 10.1007/s00204-010-0595-8.
- Cahill D.P. et al. (2007). Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. **Clin Cancer Res.** 13(7):2038-45. PMID: 17404084.
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature.** 455(7216):1061-8. doi: 10.1038/nature07385.
- Cancer Research UK (2014). Cancer Statistics Report: Incidence UK. **United Kingdom: Cancer Research UK.**
- Carrillo J.A; Munoz C.A. (2012). Alternative chemotherapeutic agents: nitrosoureas,



- cisplatin, irinotecan. **Neurosurg Clin N Am.** 23(2):297-306, ix. doi: 10.1016/j.nec.2012.01.005.
- Carvalho C.M. et al. (2008). Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity. **J Biol Chem.** 2;283(18):11913-23. doi: 10.1074/jbc.M710133200.
- Chasteen T.G. et al. (2009). Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance, pp. 820-832 in **FEMS Microbiol Rev.**
- Chen C.C. (2015). Advances in **DNA repair**. InTech, under CC BY 3.0 license. doi: 10.5772/58716.
- Chen H.H.; Kuo M.T. (2010). Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. **Met Based Drugs.** pii: 430939. doi: 10.1155/2010/430939.
- Chesler D.A.; Berger M.S.; Quinones-Hinojosa A. (2012). The potential origin of glioblastoma initiating cells. *Front Biosci (Schol Ed).* 1;4:190-205. PMID: 22202053.
- Comasseto J.V. (2010). Selenium and tellurium chemistry: historical background. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** 21:2027–2031. doi: 10.1590/S0103-50532010001100003.
- Comasseto J.V. et al. (1997). Vinylic selenides and tellurides/preparation, reactivity and synthetic compounds. **Synthesis.** 4:373–403. doi: 10.1055/s-1997-1210.
- Comparsi B. et al. (2012). Diphenyl ditelluride targets brain selenoproteins in vivo: inhibition of cerebral thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in mice after acute exposure. **Mol Cell Biochem.** 370(1-2):173-82. doi: 10.1007/s11010-012-1408-6.
- Cooper P. D.; Few A. V. (1952). Uptake of potassium tellurite by a sensitive strain of *Escherichia coli*, **Biochem. J.**, 51, 552–557.
- Cunha R.L.; Gouvea I.E.; Juliano L. (2009). A glimpse on biological activities of tellurium compounds. **Acad Bras Cienc.**, 81:393–407. PMID: 19722011.
- D'Atri S. et al. (1998). Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. **Mol Pharmacol.** 54(2):334-41. PMID: 9687575.
- Degrandi T.H. et al. (2010). Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. **Mutagenesis.** 25:257–269. doi: 10.1093/mutage/geq002.
- Duckett S.; Ellem K.A. (1971). Localization of tellurium in fetal tissues, particularly brain. **Exp Neurol.** 32(1):49-57. PMID: 5095609.
- Engman L. et al. (2003). Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells.

- Bioorg Med Chem.** 11(23):5091-100. PMID: 14604673.
- Engman L. et al. (1995). Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. **Free Radical Biology and Medicine.** 9:441–452. doi: 10.1016/0891-5849(95)00035-V.
- Ensign S.P. et al. (2016). SGEF Is Regulated via TWEAK/Fn14/NF-κB Signaling and Promotes Survival by Modulation of the DNA Repair Response to Temozolomide. **Mol Cancer Res.** PMID: 26764186.
- Fayyaz S. et al. (2016) Oleuropein mediated targeting of signaling network in cancer. **Curr Top Med Chem.** PMID: 26873189.
- Felsberg J. et al. (2011). Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. **Int J Cancer.** 129(3):659-70. doi: 10.1002/ijc.26083.
- Filippi-Chiela E.C. et al. (2015). Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy.** (7):1099-113. doi: 10.1080/15548627.2015.1009795.
- Friedman H.S.; Kerby T.; Calvert H. (2000). Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clin Cancer Res.** 6(7):2585-97. PMID: 10914698.
- Fuller G.N.; Scheithauer, B.W. (2007). The 2007 Revised World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System: newly codified entities. **Brain Pathol.** 17(3): p. 304-7.
- Gatti L.; Zunino F. (2005). Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. **Methods Mol Med.** 111:127-48. PMID: 15911977.
- GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet.** 388(10053):1459-1544. doi:10.1016/S0140-6736(16)31012-1.
- Gerhardsson L. (2015). Chapter 54 - Tellurium, In **Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition)**, edited by Gunnar F. Nordberg, Bruce A. Fowler and Monica Nordberg, Academic Press, San Diego, Pages 1217-1228, ISBN 9780444594532.
- Ghotme K.A. et al. (2017). Gliomas: New Perspectives in Diagnosis, Treatment and Prognosis. **Curr Top Med Chem.** PMID: 28049399.
- Glaser T. et al. (2017). Targeted Nanotechnology in Glioblastoma Multiforme. **Front in Pharmacol,** 8, 166. doi.:10.3389/fphar.2017.00166.
- Goodrum J.F. (1998). Role of organotellurium species in tellurium neuropathy. **Neurochem Res.** 23(10):1313-9. PMID: 9804288.

- Gore L; DeGregori J.; Porter C.C. (2013). Targeting developmental pathways in children with cancer: what price success? **Lancet Oncology** 4(2):e70-78. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70530-2.
- Guillamet E. et al. (2008). DNA-damage induction by eight metal compounds in TK6 human lymphoblastoid cells: results obtained with the alkaline **Comet assay**. **Mutat Res.** 654(1):22-8. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.04.005.
- Gupta N.; Porter T.D. (2002). Inhibition of human squalene monooxygenase by selenium compounds. **J Biochem Mol Toxicol.** 16(1):18-23. PMID: 11857773.
- Gutenberg A. et al. (2013). MGMT promoter methylation status and prognosis of patients with primary or recurrent glioblastoma treated with carmustine wafers. **Br J Neurosurg.** 27(6):772-8. doi: 10.3109/02688697.2013.791664.
- Halpert G.; Sredni B. (2014). The effect of the novel tellurium compound AS101 on autoimmune diseases. **Autoimmun Rev.** 13(12):1230-5. doi: 10.1016/j.autrev.2014.08.003.
- Hanahan D.; Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.** 144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Heimfarth L. et al. (2016). Calcium signaling mechanisms disrupt the cytoskeleton of primary astrocytes and neurons exposed to diphenylditelluride. **Biochim Biophys Acta.** 1860(11 Pt A):2510- 2520. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.07.023.
- Heimfarth L. et al. (2017). Astrocyte-neuron interaction in diphenyl ditelluride toxicity directed to the cytoskeleton. **Toxicology.** 15;379:1-11. doi: 10.1016/j.tox.2017.01.015.
- Holohan C. et al. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat Rev Cancer.** 13(10):714-26. doi: 10.1038/nrc3599.
- Hombach-Klonisch S. et al. (2018). Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. **Pharmacol Ther.** pii:S0163-7258(17)30267-X. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.10.017.
- Hu J., Kesari S. (2018). Search for More Effective Chemotherapeutic Regimens for Gliomas: Challenges and Hopes. **Prog Neurol Surg.** 31:200-209. doi: 10.1159/000467380.
- Huang B. et al. (2017). Advances in Immunotherapy for Glioblastoma Multiforme. **J Immunol Res.** 2017:3597613. doi: 10.1155/2017/3597613.
- INCA. Estimativa INCA 2018.
- Jhanwar-Uniyal M. et al. (2015). Glioblastoma: molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. **Cancers (Basel).** 25;7(2):538-55. doi: 10.3390/cancers7020538.

- Jiang Y.; Uhrbom L. (2012). On the origin of glioma. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 117(2), 113–121. doi:10.3109/03009734.2012.658976.
- Johannessen T.C.; Bjerkvig R. (2012). Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Expert Rev Anticancer Ther*. 12(5):635-42. doi: 10.1586/era.12.37.
- Johnson D.R.; O'Neill B.P. (2012). Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol*. 107(2):359-64. doi: 10.1007/s11060-011-0749-4.
- Jorge P.M. et al. (2015). Diphenyl ditelluride- induced cell cycle arrest and apoptosis: a relation with topoisomerase I inhibition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 116(3):273-80. doi: 10.1111/bcpt.12315.
- Juchem A.L.M. Avaliação do Efeito Antiproliferativo do Ditelureto de Difenila em Células de Câncer Colorretal. Dissertação (Dissertação em biologia celular e molecular) – UFRGS. Porto Alegre. 2016.
- Kaelin W.G. (2005). The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nature Rev. Cancer* 5, 689-698. PMID: 16110319.
- Kanzawa T. et al. (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ*. 11:448-57. PMID: 14713959.
- Kartal-Yandim M.; Adan-Gokbulut A.; Baran Y. (2015). Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. *Crit Rev Biotechnol*. 11:1-11. PMID: 25757878.
- Kim C.; Lee J.; Park M.S. (2015). Synthesis of new diorganodiselenides from organic halides: their antiproliferative effects against human breast cancer MCF-7 cells. *Arch Pharm Res*. 38(5):659-65. doi: 10.1007/s12272-014-0407- 4.
- Koukourakis G.V. et al. (2009). Temozolomide with radiation therapy in high grade brain gliomas: pharmaceuticals considerations and efficacy; a review article. *Molecules*. 16;14(4):1561-77. doi: 10.3390/molecules14041561.
- Kuczynski E.A. et al. (2013). Drug rechallenge and treatment beyond progression-- implications for drug resistance. *Nat Rev Clin Oncol*. 10(10):571-87. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.158.
- Laden B.P.; Porter T.D. (2001). Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J Lipid Res*. 42(2):235-40. PMID: 11181753.
- Lange S.S.; Takata K.; Wood R. D. (2011). DNA polymerases and cancer. *Nature Rev. Cancer* 11:96–110. doi: 10.1038/nrc2998.
- Lenting K. et al. (2017). Glioma: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 133(2):263-282. doi: 10.1007/s00401-017-1671-4.

- Letavayová L.; Vlcková V.; Brozmanová J. (2006). Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*. 227(1-2):1-14. PMID: 16935405.
- Lillig C.H.; Holmgren A. (2007). Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 9(1):25-47. PMID: 17115886.
- Longley D.B.; Johnston P.G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 205(2):275-92. PMID: 15641020.
- Louis D.N., et al. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 114(2): p. 97-109.
- Louis D.N. et al. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 131(6):803-20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Maciel E.N. et al. (2000). Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* 14(6):310-9. PMID: 11083084.
- Marwin R. M. (1958). Use of tellurite-glycine agar in the detection and isolation of pathogenic staphylococci, *Tech. Bull. Regist. Med. Technol.*, 28, 180–182.
- Méndez-Acuña L. et al. (2010). Histone Post-Translational Modifications in DNA Damage Response. *Cytogen and Gen Res*, 128:28-36. doi: 10.1159/000296275.
- Meotti F.C. et al. (2003). Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett*. 143(1):9-16. PMID: 12697375.
- Merrell R.T.; Quant E.C.; Wen P.Y. (2010). Advances in treatment options for high-grade glioma—current status and future perspectives. *Euro. Neuro. Rev*, 5(1): p. 49-55.
- Mukaihara K.; Suehara Y. (2015). The role of therapeutic target tyrosine kinases and inhibitors and its current situation in bone and soft tissue tumor. *Gan To Kagaku Ryoho*. 42(3):296-300. PMID: 25966501.
- Nagasawa D.T. et al. (2012). Temozolomide and other potential agents for the treatment of glioblastoma multiforme. *Neurosurg Clin N Am*. 23(2):307-22, ix. doi: 10.1016/j.nec.2012.01.007.
- Nakazato Y. (2008). [The 4th Edition of WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System published in 2007]. *No Shinkei Geka*, 36(6): p. 473- 91.
- Nanegrungsunk D. et al. (2015). Current evidence of temozolomide and bevacizumab in treatment of gliomas. *Neurol Res*. 37(2):167-83. doi: 10.1179/1743132814Y.0000000423.
- Naor Y. et al. (2013). Multiple signal transduction pathways are involved in G2/M growth arrest and apoptosis induced by the immunomodulator AS101 in multiple

- myeloma. **Leuk Lymphoma**. 54(1):160- 6. doi: 10.3109/10428194.2012.704032.
- Narayanan V.P.K.; Price S. (2012). High Grade Gliomas: Pathogenesis, Management and Prognosis. **Advances in Clinical Neuroscience and Rehabilitation**, 12: p. 24-29.
- Nogueira C.W.; Zeni G.; Rocha J.B. (2004). Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem Rev**, 104(12): p. 6255-85. Doi.: 10.1021/cr0406559 C.
- Ogra Y. (2017). Biology and toxicology of tellurium explored by speciation analysis. **Metallomics**. 24;9(5):435-441. doi: 10.1039/c7mt00022g.
- Omuro A., Deangelis L.M. (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **JAMA**, 310(17):1842-50. doi: 10.1001/jama.2013.280319.
- Padma V.V. (2015). An overview of targeted cancer therapy. **BioMedicine**, 5(4), 19. doi: 10.7603/s40681-015-0019-4
- Panczyk M. (2014). Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. **World Journal of Gastroenterology: WJG**. 20(29):9775-9827. doi: 10.3748/wjg.v20.i29.9775.
- Pearl L.H. et al. (2015). Therapeutic opportunities within the DNA damage response. **Nat Rev Cancer**. 5(3):166-80. doi: 10.1038/nrc3891.
- Pessoa-Pureur R.; Heimfarth L.; Rocha J.B. (2014). Signaling mechanisms and disrupted cytoskeleton in the diphenyl ditelluride neurotoxicity. **Oxid Med Cell Longev**. 458601. doi: 10.1155/2014/458601.
- Philchenkov A. et al. (2007). Comparative analysis of apoptosis induction by selenium compounds in human lymphoblastic leukemia MT-4 cells. **Exp Oncol**. 29(4):257-61. PMID: 18199979.
- Phillips J.L.; Currow D.C. (2010). Cancer as a chronic disease. **Collegian**. 17(2):47-50. PMID: 20738055.
- Pritchard D.E et al. (2017). Strategies for integrating personalized medicine into healthcare practice. **Personal Med**. 14(2): 141–52. doi.org/10.2217/pme-2016-0064.
- Reifenberger G. et al. (2016). Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. **Nat Rev Clin Oncol**. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.204.
- Rooseboom M. et al. (2002). Comparative study on the bioactivation mechanisms and cytotoxicity of Te- phenyl-L-tellurocysteine, Se-phenyl-L-selenocysteine, and S-phenyl-L- cysteine. **Chem Res Toxicol**. 15(12):1610-8. PMID: 12482244.
- Sailer, B. L. et al. (2003); Cytometric determination of novel organotellurium compound toxicity in a promyelocytic (HL-60) cell line. **Arch Toxicol** 77: 30-36.

- Sailer, B. L. et al. (2004). Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicol In Vitro* 18: 475-482.
- Sale J. E. (2013). Translesion DNA Synthesis and Mutagenesis in Eukaryotes. *Col Sprin Har Perspec in Bio*, 5(3), a012708. doi:10.1101/cshperspect.a012708.
- Sang Y.L. (2016).Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme, In *Genes & Diseases*, Volume 3, Issue 3, 2016, Pages 198-210, ISSN 2352-3042, doi: 10.1016/j.gendis.2016.04.007.
- Schaefer M.H.; Serrano L. (2016). Cell type-specific properties and environment shape tissue specificity of cancer genes. *Sci Rep.* 6:20707. doi:10.1038/srep20707.
- Shemesh I.I. et al. (2014). AS101 prevents diabetic nephropathy progression and mesangial cell dysfunction: regulation of the AKT downstream pathway. *PLoS One.* 9(12):e114287. doi: 10.1371/journal.pone.0114287.
- Shu Y.; Liu H. (2007) Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by cholesterol derived from low density lipoprotein in a vinblastine-resistant human lymphoblastic leukemia cell line. *Biochem Cell Biol.* 85:638-646. PMID: 17901905.
- Siegel R.L.; Miller K.D.; Jemal A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 65(1):5-29. doi: 10.3322/caac.21254.
- Silva A.O. et al. (2016). The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res.* 348(2):177-183. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.09.014.
- Silva A.O. et al. (2016). A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. *Tumour Biol.* 37(10):13743- 13749. PMID: 27476170.
- Silvestri A. et al. (2013). Individualized therapy for metastatic colorectal cancer. *J Intern Med.* 274: 1-24. doi: 10.1111/joim.12070.
- Souza A.C. et al. (2010). Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride: neurotoxic effect in brain of young rats, in vitro. *Mol Cell Biochem.*, 340: 179-185. doi: 10.1007/s11010-010-0416-7.
- Sredni B. (2012). Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. *Semin Cancer Biol.* 22(1):60-9. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.12.003.
- Stangherlin E.C. et al. (2005). Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. *Toxicology* 14;207(2):231-9. PMID: 15596254.
- Stark A.M. et al. (2010). The expression of mismatch repair proteins MLH1, MSH2 and MSH6 correlates with the Ki67 proliferation index and survival in patients with recurrent glioblastoma. *Neurol Res.* 32(8):816-20. doi: 10.1179/016164110X12645013515052.

- Stepanovic A.; Nikitovic M. (2018). Severe hematologic temozolomide-related toxicity and lifethreatening infections. *J Buon*. 23(1):7-13. PMID: 29552752.
- Stevens M.F.; Gescher A.; Turnbull C.P. (1979). Antitumour activity, biomimetic oxidation and metabolism of heteroalicyclic triazenes. *Biochem Pharmacol*. 28(6):769-76. PMID: 454476.
- Stevens M.F.G. et al. (1984). Antitumor imidazotetrazines. 1. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one, a novel broad-spectrum antitumor agent. *J. Med. Chem.*, 27: 196–201.
- Taverna P. et al. (2000). Characterization of MLH1 and MSH2 DNA mismatch repair proteins in cell lines of the NCI anticancer drug screen. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v. 46, n. 6, p. 507-16, 2000. | PMID: 11138465.
- Taylor A. (1996). Biochemistry of tellurium. *Biol Trace Elem Res.*, 55: 231-239. PMID: 9096851.
- Toews A.D. et al. (1997) Tellurium causes dose-dependent coordinate down-regulation of myelin gene expression. *Brain Res Mol Brain Res*. 49(1-2):113-9. PMID: 9387870.
- Torgovnick A.; Schumacher B. (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front in Gen*, 6, 157. doi.: 10.3389/fgene.2015.00157.
- Traverso N. et al. (2013). Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*. 972913.
- Trindade C. et al. (2015). Antigenotoxic and antimutagenic effects of diphenyl ditelluride against several known mutagens in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutagenesis*. 30(6):799-809. doi: 10.1093/mutagene/gev037.
- Urig S.; Becker K. (2006). On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 16(6):452-65. PMID: 17056271.
- USGS, 2016. *Mineral Commodity Summaries*. Disponível em: <<https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/selenium/mcs-2016-tellu.pdf>>. Acesso em: 29.10.17.
- Vij P.; Hardej D. (2016). Alterations in antioxidant/oxidant gene expression and proteins following treatment of transformed and normal colon cells with tellurium compounds. *Environ Toxicol Pharmacol*. 43:216-24. doi: 10.1016/j.etap.2016.03.009.
- Vij P.; eD. Hardej (2012). Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non-transformed human colon cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 34: 768-782.
- von Neubeck C. et al. (2015). Glioblastoma multiforme: emerging treatments and stratification markers beyond new drugs. *Br J Radiol*. 88(1053):20150354. doi: 10.1259/bjr.20150354.



- Wesolowski J.R.; Rajdev P.; Mukherji S.K. (2010). Temozolomide (Temodar). **AJNR Am J Neuroradiol.** 31(8):1383-4. doi: 10.3174/ajnr.A2170.
- Westphal M. et al. (2006). Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. **Acta Neurochir (Wien)**, 148(3):269-75; discussion 275. PMID: 16482400.
- White E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. **Nature Rev. Cancer** 26;12(6):401-10. doi: 10.1038/nrc3262.
- Wong E.T. et al. (2011). Bevacizumab for recurrent glioblastoma multiforme: a meta-analysis. **J Natl Compr Canc Netw.** 9: 403–407. PMID: 21464145.
- Wong S.T.; Goodin S. (2009). Overcoming drug resistance in patients with metastatic breast cancer. **Pharmacotherapy.** 29(8):954-65. doi: 10.1592/phco.29.8.954.
- World Health Organization (WHO) (2017). Early cancer diagnosis saves lives, cuts treatment costs. **Geneva:WHO.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/early-cancer-costs/en/>>. Acesso em: 09.02.18.
- Wu, H.C., Chang, D.K.; Huang, C.T. (2006). Target therapy for cancer. **Jour of Can Mol.** 2(2): 57-66. Online ISSN 1817-4256.
- Yip S. et al. (2009). MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. **Clin Cancer Res.** 15(14):4622-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3012.
- Zaman G.J. et al. (1995). Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 92(17):7690-4. PubMed PMID: 7644478.
- Zhang J., Stevens M.F.; Bradshaw, T.D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. **Curr Mol Pharmacol.** 5(1):102-14. PMID: 22122467.
- Zhu Z. et al. (2018). Glutathione reductase mediates drug resistance in glioblastoma cells by regulating redox homeostasis. **J Neurochem.** (1):93-104. doi: 10.1111/jnc.14250.