



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
CAMPUS URUGUAIANA**

**MECANISMOS MOLECULARES DE TOXICIDADE DO DITELURETO DE
DIFENILA EM CEPAS DE *Escherichia coli* E EFEITO ANTIMICROBIANO EM
*Drosophila melanogaster***

TESE DE DOUTORADO

Franciane Cabral Pinheiro

**Uruguaiiana, RS, BRASIL
2022**

FRANCIANE CABRAL PINHEIRO

MECANISMOS MOLECULARES DE TOXICIDADE DO DITELURETO DE DIFENILA EM CEPAS DE *Escherichia coli* E EFEITO ANTIMICROBIANO EM *Drosophila melanogaster*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Dr^a. Marina Prigol

Co-orientador: Dr. Arnaldo Zaha

**Uruguaiana, RS, BRASIL
2022**

FRANCIANE CABRAL PINHEIRO

MECANISMOS MOLECULARES DE TOXICIDADE DO DITELURETO DE DIFENILA EM CEPAS DE *Escherichia coli* E EFEITO ANTIMICROBIANO EM *Drosophila melanogaster*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Bioquímica.

Dissertação defendida e aprovada em: 27 de janeiro de 2023.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Marina Prigol
Orientadora
UNIPAMPA

Prof. Dr. César Augusto Bruning
UFPeI

Profa. Dra. Ana Paula Pesarico
UNIPAMPA

Profa. Dra. Daiana Silva de Ávila
UNIPAMPA

Profa. Dra. Silvana Peterini Boeira



Assinado eletronicamente por **MARINA PRIGOL, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/01/2023, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **César Augusto Brüning, Usuário Externo**, em 31/01/2023, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **DAIANA SILVA DE AVILA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/01/2023, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **ANA PAULA PESARICO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/01/2023, às 10:41, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **SILVANA PETERINI BOEIRA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/01/2023, às 11:20, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1042899** e o código CRC **E9120BC0**.

AGRADECIMENTOS

Neste documento se encerra mais uma ciclo da minha vida, a vida acadêmica é repleta de ciclos e cada ciclo deixa pessoas que nos marcam. Escrever este agradecimento não é algo fácil, porque fica sempre a sensação de esquecer alguém que fez parte desta jornada, então, agradeço aqui a todos que fizeram parte da construção do meu eu científico.

Primeiramente tenho que agradecer aos meus professores lá da UNICRUZ, que despertaram em mim, a curiosidade e de certa forma, a necessidade do saber, em especial a Professora Rita Leal minha primeira orientadora, e grande exemplo a ser seguido. Ao Décio e ao Vitor que me apresentaram o mundo da microbiologia, minha grande paixão, e me ensinaram a como conduzir um laboratório. E por fim nesta etapa de graduação gostaria de agradecer a Professora Maria Ester Pereira, que me possibilitou a seu modo é claro, a experiência de estar em laboratório de pós – graduação, e definir minha direção para a Bioquímica.

Aqui vai meu agradecimento aos grandes mestres deste programa de pós-graduação em Bioquímica, que lapidaram meus conhecimentos e me mostraram que sou capaz, em especial a Professora Daiana, que para mim é uma exemplo de cientista e professora. Não poderia faltar um agradecimento todo especial a minha orientadora, Professora Marina Prigol, que está comigo nesta jornada, em cada passo deste caminho me mostrou que é possível e se não achamos é porque não procuramos direito, muito obrigada Marina por tudo que me ensinastes, o que me permitiu evoluir com cientista e pesquisadora. Por fim agradeço ao Professor Arnaldo Zaha, pela grande oportunidade de trabalhar em seu laboratório e me proporcionar um período de grande evolução e aprendizado.

Como seria triste está jornada sem minhas queridas colegas e amigas, que fizeram cada viagem e cada dia de laboratório ser mais leve e divertido, o que seria destes dias sem nossas risadas e conversar “científicas”, um grande abraço Stifí, Deza, Cris, e ao menino Mustafa. E um grande abraço a todos os integrantes do LAFTAMBIO. E meu agradecimento as minhas colegas de trabalho Giovana, Fabiani e

Franciele, que sempre me apoiaram e seguraram as pontas quando precisei, a ajuda de vocês foi fundamental.

Minha jornada só foi possível, por um motivo minha família, sei que existem muitas famílias por ai, mas a minha é melhor, agradeço aos meus pais por todo o esforço que fizeram e todo o tempo que dedicaram a esta caminhada, sempre me mostrando o caminho a seguir, amo vocês, agradeço as minhas irmãs por sempre aplaudirem minhas conquistas e ficarem felizes por elas. Muitas vezes durante esta jornada, me diziam “para você deve ser mais difícil, pois tem filho e marido”, e queria aqui dizer, que sempre foi por eles e para eles, a existência deles fizeram desta caminhada um passeio, com as dificuldades e com as limitações, sempre tive ao meu lado apoio e compreensão, muito OBRIGADA Paulo, Heitor e Alice, por me permitirem estar nesta jornada, AMO vocês!!!

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa

Campus Uruguaiana, RS, Brasil

Mecanismos moleculares de toxicidade do ditelureto de difenila em cepas de *Escherichia coli* e efeito antimicrobiano em *Drosophila melanogaster*

Autora: Franciane Cabral Pinheiro

Orientadora: Dra . Marina Prigol

Coorientador: Dr. Arnaldo Zaha

Local e data da defesa: Itaqui, 27 de janeiro de 2023.

O ditelureto de difenila (PhTe)₂ é um composto orgânico de telúrio, com propriedades anti e pro-oxidantes, as quais são dose-dependente. Estudos em diferentes modelos demonstraram seu potencial citotóxico, mutagênico, genotóxico, neurotóxico e teratogênico, tendo o mecanismo de ação toxicológica associado à capacidade de reagir com grupos tiol de moléculas biologicamente relevantes. Compostos de telúrio são nocivos a microrganismos, isso em decorrência da geração de espécies reativas de oxigênio, que levam ao estresse oxidativo. Em microrganismo como a *Escherichia coli* o aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) desencadeia uma resposta ao estresse oxidativo que ativa os sistemas de defesas antioxidantes regulado pelos agentes transcrpcionais OxyR, que regula a expressão de genes induzíveis por peróxido de hidrogênio H₂O₂ e SoxS que regula o sistema de transcrição que responde às espécies geradoras de superóxido. O objetivo central deste estudo foi avaliar os mecanismos moleculares de toxicidade do (PhTe)₂, em células de *Escherichia coli* (DE3)RIL, e investigar o efeito antimicrobiano do (PhTe)₂, através de modelo alternativo de infecção bacteriana por *Escherichia coli* em *Drosophila melanogaster*. No artigo 1, demonstramos que a exposição de cepas *Escherichia coli* ao (PhTe)₂ causou efeitos toxicológicos, aumentando os níveis de espécies reativas, da peroxidação lipídica e carbonilação de proteína e a redução dos níveis de tiois não proteicos, nas concentrações de 6, 12 e 24µg/ml. A atividade de enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), foram aumentadas nas concentrações de 12 e 24µg/ml, já na concentração de 6µg/ml, apenas a enzima SOD, teve alteração de sua atividade. A análise da expressão gênica, demonstrou a ativação positiva dos reguladores de resposta ao estresse oxidativo *soxS* e *oxyR* e os genes de resposta antioxidante *gnd*, *katG*, *sodA* e *sodB*, ocorreu na concentração mais alta (24µg/ml), já nas concentrações de 6 e 12µg/ml a expressão foi suprimida ou permaneceu na linha de base. Associamos seu potencial toxicológico, ou parte deste, à oxidação de grupos tiol e à formação de espécies reativas, demonstrando por meio da modulação dos reguladores *soxS* e *oxyR* e dos genes de resposta antioxidante *gnd*, *katG*, *sodA* e *sodB*, a resposta ao estresse

causado por sua exposição. Tendo em vista o potencial toxicológico do (PhTe)₂ em cepas de *Escherichia coli*, no manuscrito 1, buscamos avaliar o efeito antimicrobiano do composto (PhTe)₂, através do uso de modelo de infecção por de *Escherichia coli* em *Drosophila melanogaster*. Os achados deste estudo demonstram que o (PhTe)₂ é seguro para o uso em modelo de infecção, foi determinada a segurança do composto através da concentração letal LC₅₀= 44,12µM para o tempo máximo de exposição de 48 horas, avaliou-se se o composto alterava o comportamento das moscas através dos testes de geotaxia negativa e campos aberto, como resultado observou-se que o (PhTe)₂ não alterou o comportamento das moscas. Após avaliar a segurança do composto no modelo, determinou-se a concentração de 10 µM, como a concentração a ser utilizada na avaliação microbiológica, e a exposição máxima de 48 horas. Para determinar o potencial antimicrobiano do composto em modelo de infecção bacteriana, utilizou-se o modelo de infecção oral, onde moscas axênicas foram criadas em ambiente asséptico, e expostas por um período de 18- 24 horas. A exposição à bactéria se deu por via oral, onde as moscas após um período de fome, obtiveram como fonte de alimento apenas solução bacteriana pelo tempo de 24 horas, após este período os grupos de tratamento foram expostos ao (PhTe)₂ na concentração de 10 µM. Os resultados da avaliação microbiológica, foram obtidos após os tempos de 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas, estes resultados demonstraram que o composto é capaz de reduzir significativamente as taxas de contaminação bacteriana, quando comparamos com as moscas que apenas foram expostas a infecção oral. Este estudo elucidou o mecanismo toxicológico do (PhTe)₂ em cepas de *Escherichia coli*, e demonstrou seu potencial antimicrobiano do composto frente a um modelo alternativo de infecção oral de *Drosophila melanogaster* por *Escherichia coli*.

Palavras – chaves: telúrio, (PhTe)₂, microrganismos, antimicrobiano, *Drosophila melanogaster*, *oxyR*, *soxS*

ABSTRACT

Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

Molecular mechanisms of diphenyl ditelluride (PhTe)₂ toxicity in *Escherichia coli* strains and antimicrobial potential in a model of infection in *Drosophila melanogaster*

Author: Franciane Cabral Pinheiro

Advisor: Dr^a. Marina Prigol

Co-supervisor: Dr. Arnaldo Zaha

Site and Date of Defence: Itaqui, september 16th, 2020.

Diphenyl ditelluride (PhTe)₂ is a dose-dependent organic tellurium compound with anti- and pro-oxidant properties. Studies have demonstrated its cytotoxic, mutagenic, genotoxic, neurotoxic and teratogenic potential, in different models, with the toxicological mechanism of action associated with the ability to react with thiol groups of biologically relevant molecules. Tellurium compounds are harmful to microorganisms, due to the generation of reactive oxygen species, which lead to oxidative stress. In microorganisms such as *Escherichia coli*, the increase in reactive oxygen species (ROS) trigger responses to oxidative stress that activate antioxidant defense systems regulated by transcriptional agents OxyR, which regulates the expression of genes inducible by hydrogen peroxide H₂O₂ and SoxS which regulates the transcriptional system that responds to superoxide-generating species. The aim of this study was to evaluate the molecular mechanisms of (PhTe)₂ toxicity in *Escherichia coli* (DE3)RIL cells, and to investigate the antimicrobial effect of (PhTe)₂ through an alternative model of bacterial infection by *Escherichia coli* in *Drosophila melanogaster*. In article 1, we demonstrated that the exposure of *Escherichia coli* strains to (PhTe)₂ caused toxicological effects, increasing the levels of reactive species, lipid peroxidation and protein carbonylation and the reduction of non-protein thiols levels, in concentrations of 6, 12 and 24µg/ml. The activity of antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were increased at concentrations of 12 and 24µg/ml, while at a concentration of 6µg/ml, only the SOD enzyme had an alteration in its activity. Gene expression analysis demonstrated positive activation of the oxidative stress response regulators *soxS* and *oxyR* and the antioxidant response genes *gnd*, *katG*, *sodA* and *sodB*, occurring at the highest concentration (24µg/ml), already at concentrations of 6 and 12µg/ml expression was suppressed or remained at baseline. We associate its toxicological potential, or part of it, to the oxidation of thiol groups and the formation of reactive species, demonstrating through the modulation of the *soxS* and *oxyR* regulators and the antioxidant response genes *gnd*, *katG*, *sodA* and *sodB*, the response to the stress caused for its exposure. In view of the toxicological potential of

(PhTe)₂ in *Escherichia coli* strains, in manuscript 1, we sought to evaluate the antimicrobial effect of the compound (PhTe)₂, using a model of oral infection by *Escherichia coli* in *Drosophila melanogaster*. Our findings demonstrated that (PhTe)₂ is safe for use in an infection model. Of the flies through the negative geotaxis test and open fields, as a result we observed that (PhTe)₂ did not change the behavior of the flies. After evaluating the safety of the compound in the model, we determined the concentration of 10 μM, as the concentration to be used in the microbiological evaluation, and the maximum exposure of 48 hours. To determine the antimicrobial potential of the compound in a bacterial infection model, we used the oral infection model, where axenic flies were reared in an aseptic environment, and exposed for a period of 18-24 hours. Exposure to the bacteria was given orally, after a starvation period, the flies were offered only a bacterial solution as a food source for 24 hours, after which the treatment groups were exposed to the compound. The results of the microbiological evaluation were obtained after the times of 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours, these results demonstrated that the compound is able to significantly reduce the rates of bacterial contamination, when compared with the flies that were only exposed to oral infection. This study elucidated the toxicological mechanism of (PhTe)₂ in *Escherichia coli* strains, and demonstrated its antimicrobial potential of the compound against an alternative model of oral infection of *Drosophila melanogaster* by *Escherichia coli*.

Keywords: tellurium, (PhTe)₂, microorganisms, antimicrobial, *Drosophila melanogaster oxyR*, *soxS*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Elemento Telúrio.....	17
Figura 2. Esquema de aplicações do telúrio	18
Figura 3. Estrutura molecular do (PhTe) ₂	22
Figura 4. Esquema potenciais farmacológicos e toxicológicos do (PhTe) ₂	22
Figura 5. Esquema do mecanismo toxicológico e farmacológico do composto (PhTe) ₂ , adaptado de Trindade et al., 2019	233
Figura 6. Gráfico de mortes em decorrência da resistência a antibióticos, no ano de 2019.....	28
Figura 7. Visão geral esquemática dos papéis do metabolismo bacteriano na ação de drogas antimicrobianas e mecanismos de resistência, adaptado de Kok et al., (2022) ..	26
Figura 8. Esquema de oxidação/ redução dos principais reguladores do estresse oxidativo de <i>Escherichia coli</i> , OxyR e SoxR	28
Figura 9. Modelo mostrando dano induzido por telurito a <i>Escherichia coli</i> , com ênfase na regulação positiva dos reguladores OxyR e SoxRS.....	29
Figura 10. Demonstração do equilíbrio redox na célula.	30
Figura 11. Números de publicações com modelos animais alternativos, adaptado de (Göethel et al., 2022).	32
Figura 12. Via tradicional e alternativa para estudo de nossos fármacos antimicrobianos. Adaptado de Chamilos et al., (2011).	355
Figura 13. Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	366
Figura 14. Anatomia da <i>Drosophila melanogaster</i> . Adaptado de Staats et al., (2018)..	37
Figura 15. Esquema resumo do estudo de mecanismos moleculares de toxicidade do ditelureto de difenila (phte) ₂ em cepas de <i>Escherichia coli</i> e potencial antimicrobiano em modelo um infecção em <i>Drosophila melanogaster</i>	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos de efeitos toxicológicos e farmacológicos de compostos organotelúricos	20
Tabela 2. Vantagens, limitações e principais testes de cada modelo alternativo in vivo, adaptado de Göethel et al., (2022).....	35

LISTA DE ABREVIACÕES

- LD₅₀ – Dose letal mediana
(PhTe)₂ – Ditelureto de difenila
GPx – Glutathione peroxidase
ERO – Espécies reativas de oxigênio
OMS – Organização Mundial da Saúde
Te – Telúrio
O – Oxigênio
S – enxofre
Se – Selênio
Po – Polônio
TeO₃²⁻ - Telurato
AIDS – Síndrome de imunodeficiência adquirida
O₂^{·-} - Radical superóxido
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
OH – Hidroxila
SOD – Superóxido dismutase
CAT – Catalase
GSH – Glutathione reductase
RAM – Resistência antimicrobiana

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Ditelureto de difenila: histórico e aplicações.....	17
2.2 Estudo de novos fármacos antimicrobianos.....	24
2.3 Resposta bacteriana ao estresse oxidativo	27
2.4 Estresse Oxidativo, dano oxidativo e defesas antioxidantes.....	30
2.5 <i>Escherichia coli</i>	33
2.6 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudo antimicrobiano	32
3. JUSTIFICATIVA.....	38
4. OBJETIVOS.....	39
4.1 Objetivo geral	39
4.2 Objetivos específicos	39
5. RESULTADOS	40
6. ARTIGO 1	41
7. MANUSCRITO 1:.....	49
8. DISCUSSÃO	69
9. CONCLUSÃO.....	73
10. PERSPECTIVAS	74
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	75

APRESENTAÇÃO

Este documento é requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, e segue as recomendações do Manual de Dissertações e Teses (MDT), da Universidade Federal do Pampa (UNIPAPA), do ano de 2022. O presente estudo busca avaliar os mecanismos moleculares de toxicidade do $(\text{PhTe})_2$, em células de *Escherichia coli* (*DE3*)*RIL*, e investigar o efeito antimicrobiano do $(\text{PhTe})_2$, através de modelo alternativo de infecção bacteriana por *Escherichia coli* em *Drosophila melanogaster*. Este estudo é conduzido baseado em observações coletadas na literatura científica e ensaios prévios do grupo de pesquisa situado no Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas, prédio dos laboratórios, sala 504, da UNIPAMPA/Campus Itaqui, local onde a investigação foi desenvolvida e a maioria dos ensaios realizados. O trabalho aqui apresentado encontra-se dividido em dois tópicos, onde o primeiro elucidou os mecanismos moleculares envolvidos na resposta de cepas de *Escherichia coli* ao estresse oxidativo decorrente da exposição ao $(\text{PhTe})_2$, avaliando seu efeito toxicológicos sobre microrganismos. Esses dados estão disponíveis na forma de artigo científico na revista **Toxicology in vitro** (Elsevier), com fator de impacto 3.685 e classificação B1 (área Ciências Biológicas II) da plataforma Qualis Capes (avaliação 2013-2016). A segunda parte deste estudo encontra-se na forma de manuscrito científico estando a ser submetido a revista **Applied and Environmental Microbiology**. Na segunda fase do estudo, objetivou-se avaliar o potencial efeito antimicrobiano do $(\text{PhTe})_2$, em um modelo alternativo de infecção oral por *Escherichia coli* em *Drosophila melanogaster*, esta segunda fase demonstrou que o composto alvo deste estudo tem efeito antimicrobiano, sem causar danos ao modelo de estudo. Desta forma ao final deste estudo podemos caracterizar o mecanismo de ação do $(\text{PhTe})_2$ em cepas de *Escherichia coli* e sua aplicabilidade como potencial agente antimicrobiano.

1. INTRODUÇÃO

O ditelureto de difenila (PhTe)₂ é um composto sólido, não volátil, hidrofóbico, simples e estável, usado como um intermediário importante e versátil na síntese orgânica (Jorge et al, 2014). Ao considerar a exposição humana e ambiental, a LD₅₀ é baixa em comparação com outros contaminantes ecológicos (Pinton et al., 2011). Estudos de toxicologia com diferentes modelos, entre eles, células humanas, como eritrócitos e leucócitos (Caeran Bueno et al., 2013; Schiar et al., 2009), células V79, cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e cepas de *Salmonella typhimurium* (Degrandi et al., 2010; Jorge et al., 2015) e modelo mais complexos com camundongos e ratos (Heimfarth et al., 2017, 2012; Meinerz et al., 2014; Nogueira et al., 2001; Puntel et al., 2013; Roman et al., 2007), o (PhTe)₂ demonstrou potencial citotóxico, mutagênico, genotoxicidade, neurotoxicidade e teratogênico. A toxicidade desse composto está associada à capacidade de reagir com grupos tiol de moléculas biologicamente relevantes, como proteínas e enzimas (Meinerz et al., 2014; Puntel et al., 2013).

Em contraste com esses efeitos tóxicos, estudos têm mostrado que (PhTe)₂ em baixas concentrações é capaz de prevenir o estresse oxidativo induzido por diversos agentes oxidantes (Hassan et al, 2008). É notável que (PhTe)₂ tem uma ampla utilidade devido ao seu potencial antioxidante, que está associado a capacidade de mimetizar a atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx) (Bortoli et al., 2019).

Em estudos pós-exposição à oxidação de telúrio e outras formas de telúrio em bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* e *Rhodobacter capsulatus* (Tantalea'n et al., 2003; Tremaroli et al., 2007, 2009; Borsetti et al., 2005, Pinheiro et al, 2018), estas formas de telúrio levam a um estado de estresse oxidativo, elevando os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), como resultado desta elevação os radicais de oxigênio afetam macromoléculas e vias metabólicas (Arenas et al., 2014). Os efeitos adversos de ERO em cepas *Escherichia coli* incluem o aumento da peroxidação lipídica que resulta na geração de aldeídos de cadeia curta tóxicos altamente reativos, além disto, o aumento das espécies reativas de oxigênio pode causar estresse oxidativo e levar à oxidação do tiol, esta ação tem múltiplos efeitos danosos nas macromoléculas celulares. As respostas ao estresse oxidativo coordenadas por

reguladores específicos garantem a sobrevivência bacteriana durante a exposição a ERO (Chiang e Schellhorn, 2012).

Microrganismos como a *Escherichia coli* possuem mecanismos capazes de protegê-los do estresse ambiental. Esses sistemas de defesa antioxidante são bem caracterizados, o regulador transcricional *OxyR* regula a expressão de genes indutíveis para H_2O_2 que codificam enzimas conhecidas por participarem da resposta bacteriana ao estresse oxidativo, como *katG* (peroxidase 1 de hidrogênio), *gorA* (glutaciona redutase) e outras (Zheng et al., 2001; Zheng e Storz, 1998). Já o regulador transcricional o *SoxS*, por outro lado, regula o sistema de transcrição que responde às espécies geradoras de superóxido (Storz e Imlay, 1999).

A indústria farmacêutica e médica desde 2015 enfrentam um dos maiores problemas de saúde mundiais, ano que a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o aumento da resistência antimicrobiana por bactérias patogênicas, tornando estudos nesta linha uma prioridades (González, A-S et al., 2021). A cada ano os estudos vêm buscando o desenvolvimento de novos fármacos antibióticos, porém, este processo sofreu uma desaceleração associado a um retorno muito baixo sobre os altos investimentos, por exemplo, a desistência da transição *in vitro* para *in vivo* em fases pré-clínicas (Bram Van den Bergh, 2022). A busca por medicamentos antimicrobianos tem se concentrado na compreensão das interações hospedeiro-patógeno na célula e os mecanismos a nível molecular para identificar vias importantes para a infecção e progressão da doença, e o uso de modelos alternativos com a *Drosophila melanogaster* tem crescido, por ser mais rápido e de baixo custo, e efetivo para a avaliação da interação fármaco-hospedeiro (Chamilos, Samonis e Kontoyiannis, 2011).

Com base em outros estudos de exposição de microrganismos ao telúrio e outras formas de telúrio, que apontam os efeitos toxicológicos deste tipo de composto, sobre bactérias, este trabalho busca avaliar se estes efeitos são observados na exposição de cepas de *Escherichia coli* ao $(PhTe)_2$, elucidando o mecanismo de ação, através da modulação da expressão gênica, de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo.

O $(PhTe)_2$ é conhecido por ser dose dependente, e em uma segunda fase deste estudo buscou-se demonstrar sua dualidade, ou seja, que em concentrações seguras pode ter potencial antimicrobiano sem causar danos ao indivíduo infectado, através de modelo alternativo de infecção bacteriana em *Drosophila melanogaster*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ditelureto de difenila: histórico e aplicações

No ano de 1782, Franz-Joseph Mueller Von Reichenstein, durante estudos com minérios contendo ouro nas minas húngaras, descobriu um novo elemento, chamando então de Telúrio, que deriva da palavra latina *tellus*, que significa "Terra" (BA et al., 2010). A descoberta inicial não foi tanto a determinação de um novo elemento, mas a exclusão de alternativas já existentes (Chasteen et al., 2009)

Figura 1 - Elemento Telúrio



Fonte: Arquivo próprio

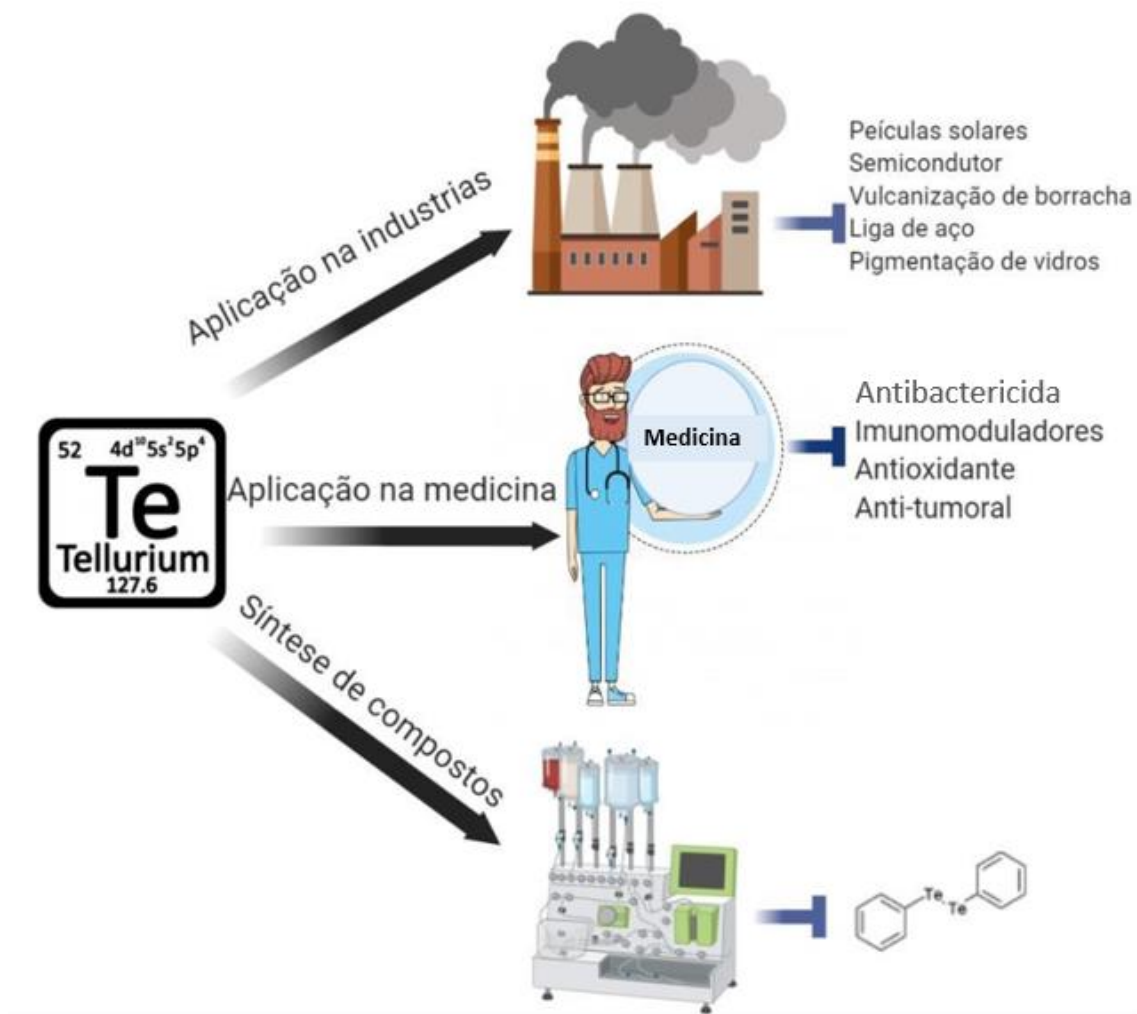
O telúrio (Te) (Fig.1) pertencente ao mesmo grupo na tabela periódica que o oxigênio (O), enxofre (S), selênio (Se) e polônio (Po), ou seja, grupo 16 ou família dos calcogênios, possui propriedades químicas e físicas características deste grupo. Embora esse grupo inclua elementos bioquímicos essenciais, como o Se, O e S, o Te propriamente dito não apresenta papel biológico até o presente momento (Arenas et al., 2014; Díaz-Vásquez et al., 2014).

Como são característicos da maioria dos metaloides, os oxianions telúrio são relativamente estáveis no ambiente, o Te existe em forma elementar e em formas oxidadas, sendo o telurito a mais abundante, já o telureto com sua baixa solubilidade é limitando a uma concentração em águas biosféricas (Elías et al., 2015; Matharu et al., 2018).

O telúrio com suas propriedades únicas de metaloide possui diversas utilidades na indústria (Ogra, 2017; Turner et al., 1999), particularmente não é tóxico e radioativo, ao contrário desta afirmativa, a química do telúrio é rica em substâncias inorgânicas e orgânicas, o que possibilita uma ampla variedade de compostos organotelúricos, com as mais diversas perspectivas farmacológicas e toxicológicas (Ba et al., 2010; Pessoa-

Pureur et al., 2014). Os usos do telúrio e seus derivados são amplos e contemplam as mais variadas áreas, na medicina e síntese orgânica de novos compostos (Figura 2).

Figura 2 - Esquema de aplicações do telúrio



Fonte: Arquivo próprio

O uso do telúrio no tratamento de infecções microbianas é datada desde 1926 anterior a descoberta de fármacos com propriedades antibióticas, Alexandre Fleming relatou as propriedades antibacterianas do TeO_3^{2-} e no ano de 1984 surgiu como potencial agente antisséptico de glóbulos vermelhos no tratamento de anemia falciforme (Díaz-Vásquez et al., 2015). No ano de 1988 fármacos contendo telúrio foram apresentados como imunomoduladores, sendo propostos como agentes de tratamento para Síndrome de Imunodeficiente Adquirida - AIDS (Cunha et al., 2009).

De uma perspectiva farmacológica, o telúrio e seus compostos possuem uma gama de propriedades únicas que embora pouco exploradas podem fornecer inovação e desenvolvimento de medicamentos no futuro, uma vez que muitos estudos com compostos orgânicos de telúrio demonstram claramente que estes, são agentes potencialmente farmacológicos (Ba et al., 2010).

Os compostos orgânicos de telúrio são sintetizados desde 1840, seu uso no passado era limitado porém tornaram-se promissores para inúmeras aplicações nas últimas décadas, as evidências têm sido acumuladas com avaliações farmacológicas promissoras destes agentes lhes conferem as seguintes propriedades: imunomoduladores, antioxidante, anticâncer e anti-inflamatório (Degrandi et al., 2010). Apesar do uso crescente desta classe de compostos na química e campos bioquímicos, tem havido pouca preocupação com sua toxicidade uma vez que estes compostos podem ser tóxicos para alguns organismos dependendo da dose de concentração aplicada, conseqüentemente é importante melhorar nosso entendimento sobre as propriedades toxicológicas destes compostos (Jorge et al., 2015).

Compostos orgânicos de telúrio possuem estruturas que facilmente introduzem uma vasta variedade de substratos orgânicos esta propriedade confere a aplicação destes em inúmeras sínteses orgânicas tornando-os atrativos devido às reações serem químio-eletro seletivas (Nogueira et al., 2004; Zeni et al., 2000). Estudos têm demonstrado tanto os efeitos benéficos desta classe de compostos, como seus efeitos potencialmente tóxicos, como demonstrado na tabela 1.

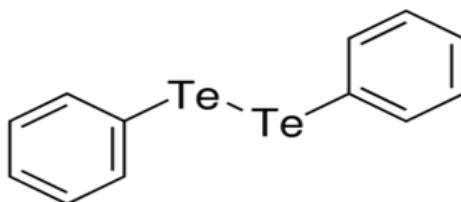
Tabela 1. Estudos de efeitos toxicológicos e farmacológicos de compostos orgânicos de telúrio

Estudo	Autores	Principal resultado	Ano
Diaril teluretos como inibidores da peroxidação lipídica em sistemas biológicos e químicos	Andersson et al.	Antioxidante	1994
Compostos organotelúricos como retardadores eficientes da peroxidação lipídica em metanol	Engman et al.	Antioxiante	1995
Compostos organotelúricos solúveis em água inibem a tiorredoxina redutase e o crescimento de células cancerosas humanas	Engman et al.	Anticâncer	2000
Compostos organotelúricos solúveis em água: proteção catalítica contra peroxinitrito e liberação de zinco da metalotioneína	Jacob et al.	Antioxidante	2000
Disseleneto de difenila e (PhTe) ₂ afetam o sistema glutamatérgico de ratos in vitro e in vivo	Nogueiraa et al.	Toxicidade	2001
Tiorredoxina redutase e inibição do crescimento de células cancerosas por antioxidantes organotelúricos	Engman et al	Antioxidante e Anticâncer	2003
Dietil 2-fenil-2 telurofenil vinilfosfonato: Um composto organotelúrico com baixa toxicidade	Ávila et al.	Toxicidade	2006
Efeito do (PhTe) ₂ no desenvolvimento embrionário / fetal em camundongos: diferenças entre espécies	Roman et al.	Toxicidade	2006
Efeitos do tratamento in vivo com (PhTe) ₂ na fosforilação de proteínas do citoesqueleto no córtex cerebral e hipocampo de ratos	Heimfartha et al.	Neurotoxicidade	2007
O (PhTe) ₂ prejudica a memória de curto prazo e altera os parâmetros neuroquímicos em ratos jovens	Eluza Curte Stangherlin, João Batista Teixeira Rocha e Cristina Wayne Nogueira	Toxicidade	2009
Hemólise de eritrócitos humanos induzida por compostos de selênio e telúrio aumentada por GSH ou glicose: Um possível envolvimento de espécies reativas de oxigênio	Schiar et al.	Toxicidade	2009
Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do (PhTe) ₂ em diversos modelos biológicos	Degrandi et al.	Citotoxicidade	2010
Comparação das propriedades antioxidantes e da toxicidade de p, p'-	Simone Pinton, Cristiane Luchese e	Toxicidade	2010

diclorodifenil ditelureto com o composto original (PhTe) ₂	Cristina W. Nogueira		
Uma possível ação neuroprotetora de um telureto vinílico contra a neurotoxicidade induzida por Mn	Ávila et al.	Atividade neuroprotetora	2010
Compostos de organotelúrio e organosselênio atenuam a toxicidade induzida por Mn em <i>C. elegans</i> ao prevenir o estresse oxidativo	Ávila et al.	Anti-envelhecimento	2012
O tratamento in vivo com (PhTe) ₂ induz neurodegeneração no corpo estriado de ratos jovens: implicações das vias MAPK e Akt	Heimfartha et al.	Neurotoxicidade	2012
Inibição de complexos da cadeia de transferência de elétrons mitocondriais por diferentes organocalcogênicos	Puntel et al.	Toxicidade	2013
Avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade de organocalcogênicos em leucócitos humanos: um estudo comparativo entre Ebselen, difenil disseleneto e (PhTe) ₂	Bueno et al.	Genotoxicidade	2013
Mecanismos de sinalização e citoesqueleto interrompido neurotoxicidade do (PhTe) ₂ .	Regina Pessoa-Pureur, Luana Heimfarth e João B. Rocha	Neurotoxicidade.	2014
Parada e apoptose do ciclo celular induzida por ditelureto de difenila: uma relação com a inibição da topoisomerase I	Jorge et al	Citotoxicidade	2014
Genotoxicidade diferencial do disseleneto de difenila (PhSe) ₂ e do (PhTe) ₂	Meinerz et al	Genotoxicidade	2014
Interação astrócito-neurônio na toxicidade de (PhTe) ₂ direcionada ao citoesqueleto	Heimfartha et al.	Neurotoxicidade	2017
(PhTe) ₂ : propriedades moduladoras de redox e antiproliferativas	Trindade et al .	Citotóxicos	2019

O $(\text{PhTe})_2$ (Figura 3), é um exemplo de composto orgânico de telúrio, caracterizado como um composto sólido, não volátil, hidrofóbico e entre os compostos de ditelureto de diarila é o mais simples, sendo utilizado como intermediário na síntese orgânica e um potencial protótipo para o desenvolvimento de novas moléculas biologicamente ativas (Degrandi et al., 2010; Heimfarth et al., 2017).

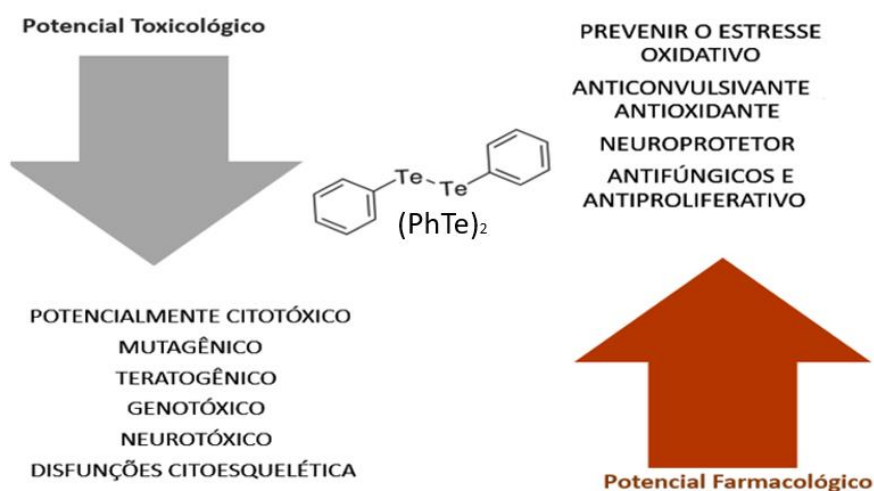
Figura 3 - Estrutura molecular do $(\text{PhTe})_2$



Fonte: Arquivo próprio

O $(\text{PhTe})_2$ tem sido objeto de vários estudos sobre seu potencial farmacológico e toxicológico como demonstrado na figura 4, em estudos farmacológicos o $(\text{PhTe})_2$ tem a capacidade de prevenir o estresse oxidativo induzido por vários agentes oxidantes (Degrandi et al., 2010b), estudos apontam que o $(\text{PhTe})_2$ demonstra ter propriedades anticonvulsivante, antioxidante, neuroprotetora, antifúngica e antiproliferativa (Brito et al., 2009; Cunha et al., 2009; Ibrahim et al., 2012; Rossato et al., 2002; Rosseti et al., 2011).

Figura 4. Esquema potenciais farmacológicos e toxicológicos do $(\text{PhTe})_2$



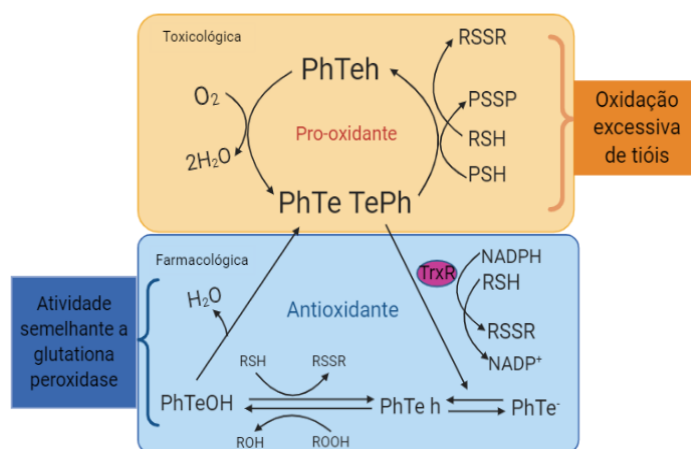
Fonte: Arquivo próprio

Em contraste ao potencial farmacológico estudos apontam efeito toxicológico do composto em diferentes modelos. Efeitos genotóxico, citotóxico e mutagênico foram avaliados em ensaios com leucócitos humanos, leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, cepas de *Salmonella typhimurium* e células V79 (Caeran Bueno et al., 2013; Degrandi et al., 2010; Jorge et al., 2015). Estudos com camundongos após a exposição ao (PhTe)₂ demonstrou aumento na frequência de micronúcleos o que indica potencial mutagênico, além de causar genotoxicidade, sendo associado aos efeitos pró-oxidantes deste composto (Meinerz et al., 2014).

Em pesquisa que avaliou a atividade dos complexos mitocondriais (I, II, I-III, II-III e IV) de fígado e rim de ratos, o (PhTe)₂ inibiu os complexos mitocondriais I e II, tanto no rim como no fígado, enquanto os complexos III e IV foram pouco modificados, sendo considerado que esta disfunção mitocondrial pode ser considerada um fator importante na toxicidade (Puntel et al., 2013a). Em estudos *in vivo* após uma exposição aguda em ratos, demonstrou afetar de maneira complexa o sistema glutamatérgico (Nogueira et al., 2001).

Em estudos de exposição materna em camundongos e ratos o (PhTe)₂ demonstrou ser teratogênico, causando várias anormalidades morfológicas em fetos de camundongos durante o desenvolvimento (Roman et al., 2007; Stangherlin et al., 2009), em estudos de exposição em ratos ao (PhTe)₂ foi demonstrado seu potencial neurotóxico e de disfunções citoesqueléticas (Heimfarth et al., 2017, 2012, 2008).

Figura 5 - Esquema do mecanismo toxicológico e farmacológico do composto (PhTe)₂,



Fonte: Arquivo próprio, adaptado de Trindade et al., 2019

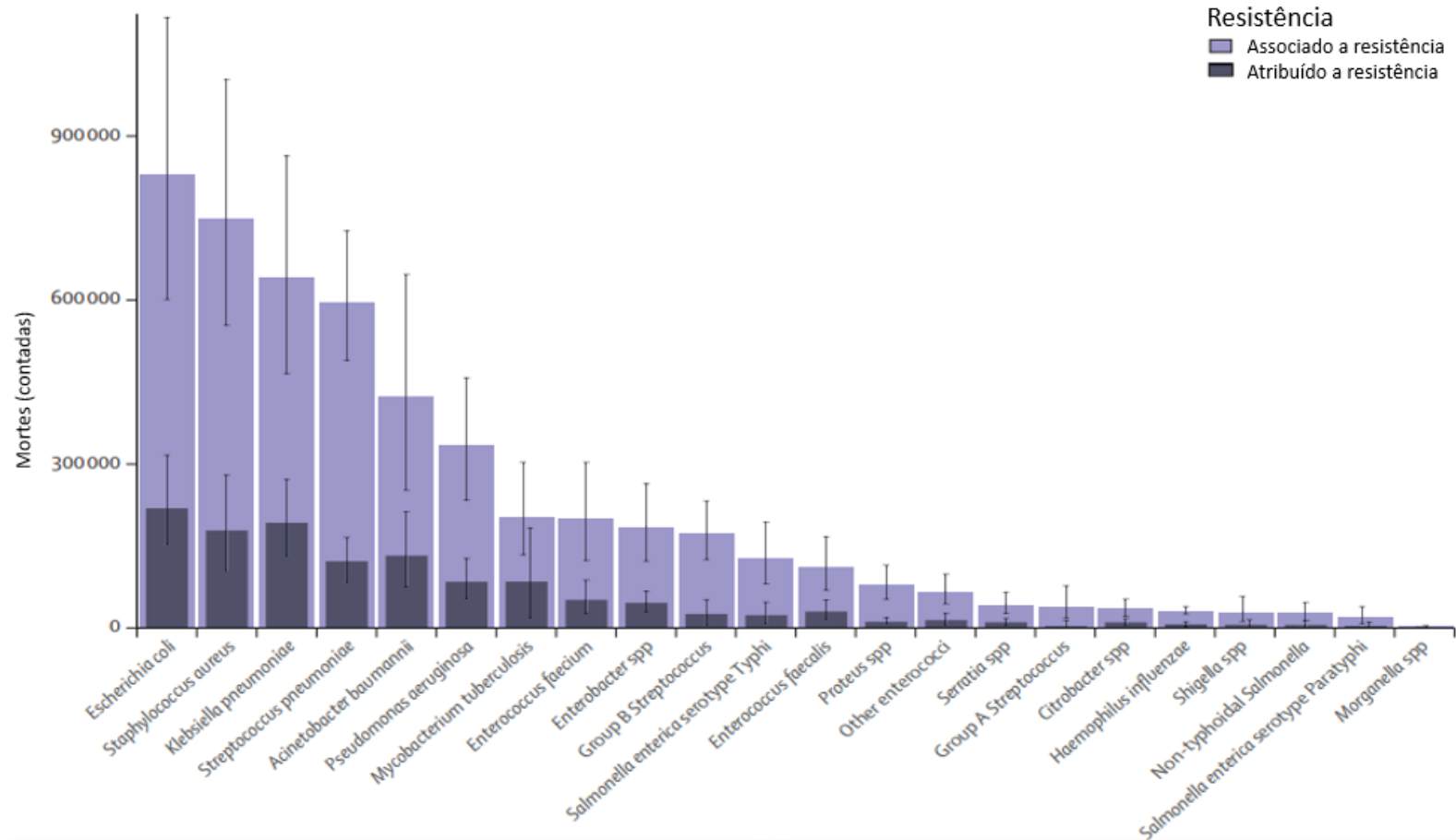
A literatura demonstra que o $(\text{PhTe})_2$ pode ter tanto efeito toxicológico como farmacológico, ou seja, ter atividade antioxidante ou pro-oxidante (Figura 5). Sua atividade antioxidante é atribuída a sua semelhança à glutathiona peroxidase, e ao fato de fazer parte de uma classe de compostos que podem ser substrato da tiorredoxina redutase em mamíferos, esta classe de compostos tem sua atividade antioxidante ligada a mudança no estado de oxidação do átomo de Te (Te(II)M Te(IV)). Enquanto seu potencial toxicológico associa-se em parte a capacidade desta classe de composto promover a oxidação excessiva de grupamentos tióis (Puntel et al., 2013a; Trindade et al., 2019).

Diante de estudos que apontam diferentes formas de telúrio como agente tóxico para microrganismo, estudos que utilizam a *Escherichia coli* são em geral usados como bactéria modelo para definir fábricas de células microbianas para muitos produtos e para investigar mecanismos de regulação (Wang et al., 2021).

2.2 Estudos de novos fármacos antimicrobianos

Estimativas de 2019 apontam que 1,27 milhões de indivíduos morreram em decorrência da resistência a antibióticos, dentre os patógenos resistentes destacam-se seis patógenos que foram os principais responsáveis por mais de 250.000 mortes associadas à resistência antibiótica, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, por ordem do número de óbitos. Para óbitos atribuíveis à resistência antibiótica a bactéria *Escherichia coli* foi responsável pela maioria das mortes em 2019, seguido por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis*, como demonstrado no gráfico da figura 6 (Murray et al, 2022).

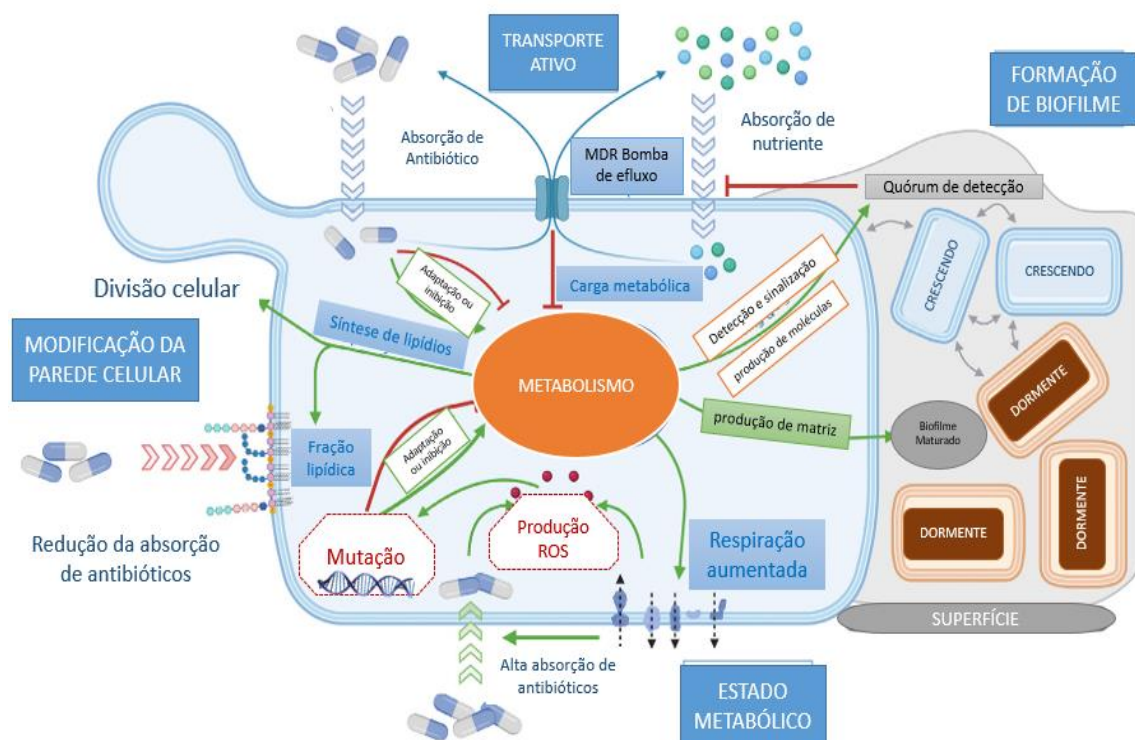
Figura 6 - Gráfico de mortes em decorrência da resistência a antibióticos, no ano de 2019.



Fonte: Arquivo próprio. Adaptado de Murray et al, (2022)

O surgimento de resistência antimicrobiana (RAM) em patógenos bacterianos representa um problema de ameaça à saúde global, estudos demonstram que o estado metabólico das bactérias está associado a uma série de mecanismos genéticos e fenotípicos de resistência, esses processos podem ser direcionados com o objetivo de ressensibilizar patógenos aos tratamentos com antibiótico. A análise abrangente do metabolismo microbiano relacionado à RAM, o que pode facilitar a descoberta de novos alvos de drogas e estratégias de tratamento. Pode-se observar na figura 7, uma visão geral do metabolismo bacteriano frente à ação de drogas antimicrobianas e mecanismos de resistência (Kok et al,022).

Figura 7 - Visão geral esquemática dos papéis do metabolismo bacteriano na ação de drogas antimicrobianas e mecanismos de resistência.



Fonte: Arquivo próprio, adaptado de Kok et al., (2022)

O uso em ampla escala de antibióticos tornou-se cada vez mais comum na prática médica, sendo usados tanto como medidas preventivas ou como agentes terapêuticos quando indivíduos sofrem de infecções bacterianas, aumentando a expectativa de vida e qualidade durante o século 20. Uma decorrência deste uso de certo

modo abusivo é o aumento da ineficiência dos antibióticos e o aumento da resistência bacteriana (Pinheiro et al., 2018; Chen et.al; 2021; Bram Van den Bergh, 2022)

A resistência bacteriana a antimicrobianos é a capacidade que as bactérias desenvolveram de resistir à ação dos antibióticos, isto devido ao desenvolvimento de mecanismos de adaptação e de resistência. A seleção artificial em ritmo acelerado de bactérias contra antibióticos comuns levou ao surgimento de cepas bacterianas altamente resistentes que potencialmente tornam uma grande variedade de antibióticos clinicamente ineficazes. A resistência de patógenos entéricos aos antibióticos atuais está aumentando em todo o mundo, com isso o surgimento de 'superbactérias', incluindo *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp* (Zhang et al,2021).

No passado, o desenvolvimento de novos fármacos antibióticos mantinha-se à frente do surgimento e disseminação da resistência, porém, este processo sofreu uma desaceleração associado a um retorno muito baixo sobre os altos investimentos, por exemplo, de desistências na transição *in vitro* para *in vivo* em fases pré-clínicas (Bram Van den Bergh, 2022). Em esforços mais recentes na busca de medicamentos antimicrobianos, estas têm se concentrado na compreensão das interações hospedeiro-patógeno na célula e níveis moleculares para identificar vias importantes para a infecção e progressão da doença (Chamilos, Samonis e Kontoyiannis, 2011).

Estudos já demonstraram que as principais classes de antibióticos bactericidas, independentemente de suas interações droga-alvo, induzem a morte celular através de dano oxidativo em bactérias, levando a produção de espécies reativas de oxigênio, através da interrupção do ciclo do ácido tricarbóxico e cadeia de transporte de elétrons (Kalghatgi, S et al., 201

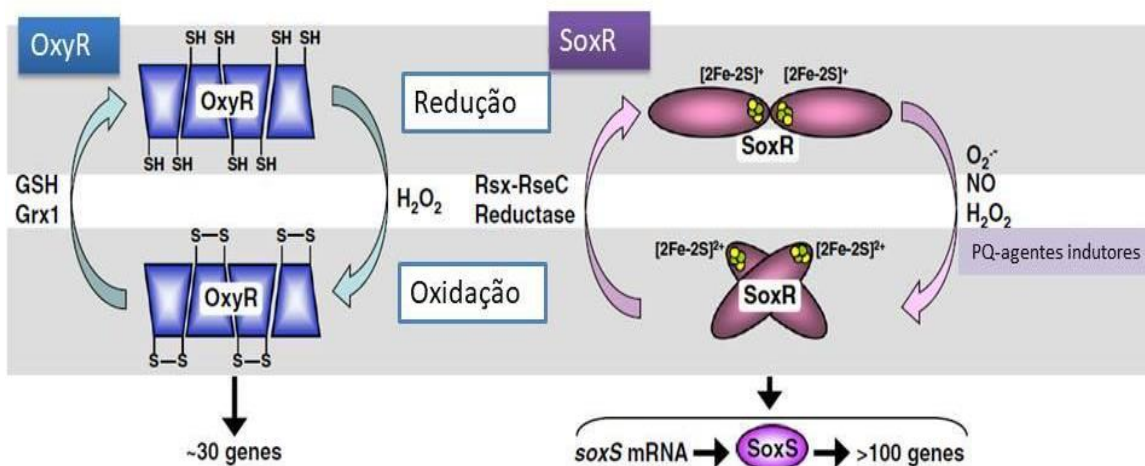
2.3 Resposta bacteriana ao estresse oxidativo

Em organismos mais simples, como as bactérias o aumento na produção de espécies reativas durante o estresse oxidativo leva à oxidação dos tióis, entre outros efeitos. Alguns desses tióis fazem parte de proteínas celulares como o regulador transcricional OxyR e SoxRS, que são altamente relevantes ao estresse oxidativo bacteriano e também no estresse gerado por metais tóxicos (Chasteen et al., 2009; Pérez et al., 2007).

As bactérias, em condições aeróbicas, passam por um processo de estresse oxidativo através da formação de espécies reativas de oxigênio que podem danificar suas estruturas celulares, o que inclui aglomerados de ferro-enxofre, cisteína e resíduos de proteína metionina e DNA. As espécies reativas de oxigênio são um subproduto inevitável da exposição e utilização do oxigênio, dentro da célula bacteriana. Pode-se citar o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzidos quando cofatores sofrem auto-oxidação, que reagem com moléculas de O_2 ; a hidroxila altamente reativa (OH^{\cdot}) que forma-se a partir da reação do peróxido de hidrogênio com O_2 não incorporado do ferro pela Reação de Fenton, e os reativos de óxido nítrico. Para garantir sobrevivência de organismos em condições aeróbicas, as bactérias evoluíram o sistema de respostas ao estresse oxidativo (Chiang and Schellhorn, 2012; Cabiscol et al, 2000).

Em respostas ao estresse oxidativo, os dois principais reguladores transcricionais (*OxyR* e *SoxRS*) são ativados pelas bactérias (Imlay, 2013; Imaly, 2008). A *Escherichia coli* possui este mesmo sistema de regulação, e em condição normal de crescimento, o regulador transcricional *SoxR* é produzido em uma forma inativada (reduzida), mas quando exposto a superóxido ou fármacos de ciclo redox é ativado, como observado na figura 8. O regulador transcricional *OxyR* é ativado principalmente pelo H_2O_2 , aumentando a transcrição de um conjunto de genes que aumenta a resistência ao peróxido de hidrogênio (Baez and Shiloach, 2013).

Figura 8 - Esquema de oxidação / redução dos principais reguladores do estresse oxidativo de *Escherichia coli*, OxyR e SoxR



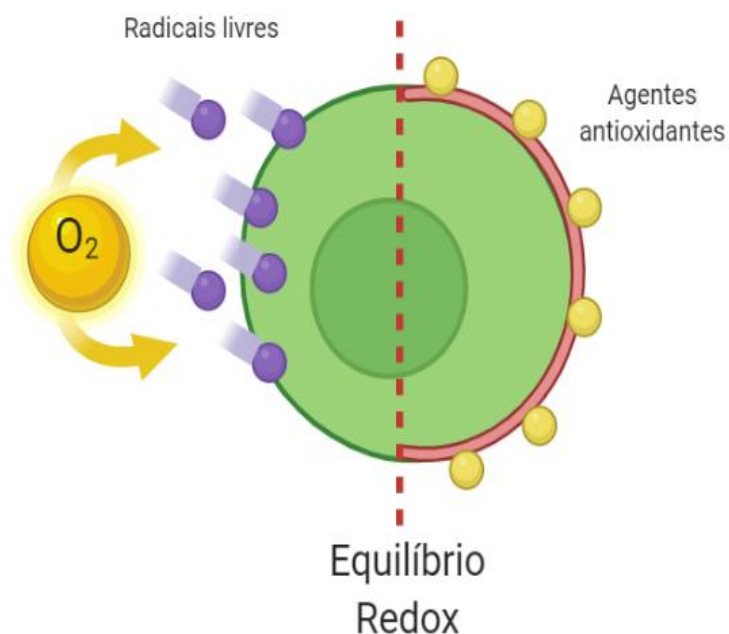
Fonte: Arquivo próprio, adaptado de Ching e Schellhorn, 2012.

2.4 Estresse Oxidativo, dano oxidativo e defesas antioxidantes

Conceitualmente o estresse oxidativo é definido como uma produção excessiva de espécies oxigenadas reativas que não pode ser neutralizada pela ação de antioxidantes, mas também como uma perturbação do equilíbrio redox celular (Pisoschi and Pop, 2015). A produção de EROs incluem radicais ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (Pinheiro et al., 2018). Quimicamente, os radicais livres são átomos, moléculas ou íons que apresentam um elétron desemparelhado, reativo e instável, o qual, para alcançar a estabilidade, tende a se ligar a outro elétron (Martindale and Holbrook, 2002).

O estresse oxidativo emerge de uma geração de espécies reativas de oxigênio/espécie reativa de nitrogênio aprimorada ou de uma deterioração da capacidade protetora antioxidante, em 1991 foi descrito por Sies como “um distúrbio no equilíbrio entre pró-oxidante e antioxidante em favor das espécies oxidantes, levando a potenciais danos”, como demonstrado na figura 10.

Figura 10 - Demonstração do equilíbrio redox na célula



Fonte: Arquivo próprio.

O desequilíbrio entre as espécies oxidantes e o sistema de defesa antioxidante pode desencadear fatores específicos responsáveis pelo dano oxidativo, o aumento na

taxa de produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O^{2-}) e hidroxila ($OH \bullet$) estão entre os agentes mais comuns que danificam estruturas celulares, como a expressão de genes, geração de compostos mutagênicos, promoção de atividade aterogênica, ocorrência de placa senil ou inflamação, ao mesmo tempo em que atacam essencialmente todas as macromoléculas celulares, incluindo DNA, RNA, proteínas e lipídios o que pode levar ao surgimento de câncer, neurodegeneração, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças renais (Pisoschi and Pop, 2015).

A fim de compensar o desequilíbrio redox os seres vivos ao longo do processo evolutivo foram capazes de desenvolver e aprimorar mecanismos protetores contra o estresse oxidativo e os danos decorrentes deste desequilíbrio, que são as conhecidas defesas antioxidantes, compreendendo diversos mecanismos detoxificantes, entre eles pode-se citar a prevenção e o reparo, onde estão incluídos o sistema de defesa enzimático e o não enzimático (Kashmiri and Mankar, 2014).

Para proteger-se, sistema de defesa das células podem atuar em duas linhas: como detoxificador de agente antes que ele cause danos, isso através da atividade das enzimas glutathione reduzida (GSH), SOD, CAT, GPx e da vitamina E, e através da função de reparação dos danos ocorridos, mediado pelo ácido ascórbico, pela GSH e pela GPx (Ferreira e Matsubara, 1997). As enzimas CAT e SOD reagem com oxidantes prejudiciais e converte-os em produtos inofensivos a função é eliminar os radicais livres de oxigênio e proteger o organismo e indiretamente, podem refletir nas mudanças do teor de oxigênio nos radicais livres nas células vivas (Ezraty et al., 2017).

O papel das espécies reativas de oxigênio no metabolismo bacteriano e nas respostas ao estresse é um problema em processos fisiológicos e patológicos, o estresse oxidativo em bactérias danifica múltiplos alvos celulares, incluindo aglomerados de ferro-enxofre, resíduos de proteínas de cisteína e metionina e DNA (Jávega, B., Herrera, G., O'Connor, JE; 2022).

2.5 *Escherichia coli*

Em 1984 o microbiologista e pediatra alemão Theodor Escherich, iniciou um estudo da microbiota intestinal e seu o papel na digestão e doença do trato gastrointestinal. Durante seu estudo, ele descobriu uma bactéria de crescimento rápido

que chamou de *Bacterium coli comuna*, que hoje é conhecida como *Escherichia coli* (Blount, 2015).

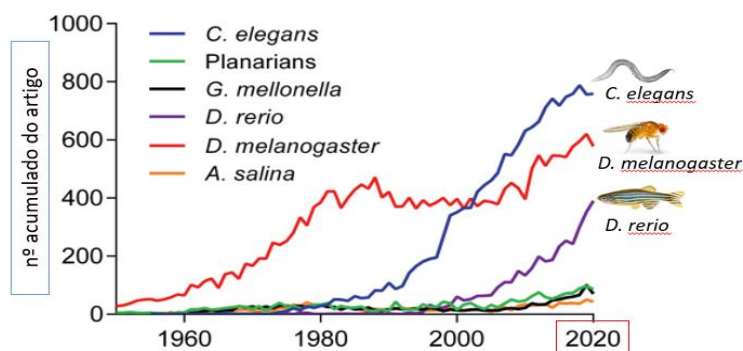
A *Escherichia coli*, pertence à família bacteriana das Enterobacteriaceae, é considerado o habitante comensal mais prevalente do trato gastrointestinal de humanos, sendo um dos patógenos mais importantes que vive em associação mutuamente benéfica com os hospedeiros, no entanto, também é considerado um dos patógenos humanos mais comuns, pois é responsável por um amplo espectro de doenças (Allocati et al., 2013).

Cepas de *Escherichia coli*, possuem características que facilitam seu manuseio, disponibilizando a sequência completa do genoma e sua capacidade de crescer tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas, fazem desta bactéria um importante organismo em biotecnologia, sendo utilizada em uma ampla variedade de aplicações tanto na área industrial quanto médica (Allocati et al., 2013;Blount, 2015).

2.6 *Drosophila melanogaster* como modelo de estudo antimicrobiano

O uso de modelos animais como camundongos, ratos e outros mamíferos tendem a ser demorados e caros, além das questões éticas envolvidas, no entanto, modelos alternativos buscam reduzir não só o tempo de pesquisa e seu custo, mas também preocupações éticas e sofrimento animal (Göethel et.al, 2022). Diante disto, o uso de modelos alternativos como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Danio rerio* (Figura 11) são alternativas promissoras, uma vez que seu custo é baixo e efetivo, para testar novos fármacos, possibilitando a observação dos mecanismos hospedeiro-patógeno (Tabela 2).

Figura 11 - Números de publicações com modelos animais alternativos.



Fonte: Arquivo próprio, adaptado de (Göethel et al., 2022).

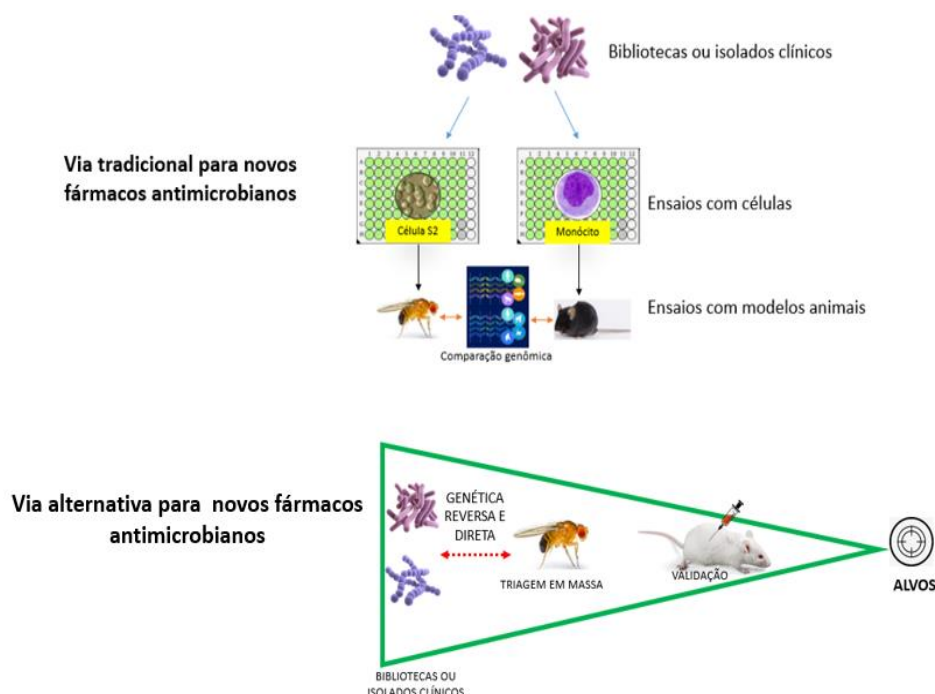
Tabela 2. Vantagens, limitações e principais testes de cada modelo alternativo in vivo, adaptado de Göethel et al., (2022).

Modelo alternativo	Vantagens	Desvantagens	Principais testes realizados
<i>Danio rerio</i>	Transparência óptica, fácil manuseio, fertilidade, pois os vertebrados são biologicamente mais semelhantes aos humanos.	Alta infraestrutura e manutenção o custo, problemas no controle e quantificação da exposição e absorção de drogas, desafiador produzir números suficientes para triagem de alto rendimento (HTS).	Angiogênese, imagem do coração, fígado, cérebro e pâncreas, câncer, obesidade, diabetes tipo 2, aterosclerose, ansiedade, depressão, distúrbios cognitivos, neurodegeneração, síndrome da serotonina, comer e dormir modelo de distúrbios, resposta inflamatória.
<i>Artemia salina</i>	Fácil manuseio pode dar resultados preliminares de ecotoxicologia marinha.	Possível solubilidade e problemas falso-positivo devido a médio e baixo agudo sensibilidade à toxicidade.	Letalidade por exposição aguda e prolongada, extrapolação de citotoxicidade, teste de eclodibilidade.
<i>Galleria melonella</i>	Baixo custo de manutenção e implementação, sobrevive a 37°C	Falta de padronização dos estudos e informações sobre condições otimizadas.	Eficácia dos antibióticos.
<i>Drosophila melanogaster</i>	Fácil e rápido de obter transgênicos, possui sistema imunológico, baixa custo de	Diferenças farmacodinâmicas humanas, alguns testes podem exigir o manuseio individual das moscas, dosagem de	Neurodegeneração, convulsões, distúrbios cognitivos, câncer, doenças cardiovasculares, inflamação, infecção e modelos de distúrbios

	manutenção.	drogas entre moscas pode tem alta variabilidade.	metabólicos.
<i>Planarians</i> (<i>Dugesia</i> , <i>Girardia</i> , <i>Schmidtea</i> , <i>Phagocata</i> and <i>Polycelis</i>)	A capacidade de regenerar completamente partes do corpo perdidas, incluindo o sistema nervoso, com neurotransmissores homólogos aos de mamíferos, pode fornecer informações de ecotoxicidade, fácil manuseio e manutenção barata.	Nenhum em particular, mas ainda sem HTS foi feito usando este modelo;	Estudos de regeneração e desenvolvimento, toxicidade, estudos comportamentais, dependência modelos, modelo de ansiedade, reprodução estudos.
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Fácil manuseio com amostras grandes, baixo custo de manutenção, alta homologação genética com mamíferos, corpo transparente, completamente elucidado genoma e disponibilidade de transgênicos cepas, capazes de automatizar e realizar HTS.	Ideal a 20°C.	Letalidade aguda, sub-crônica e crônica, atividade antioxidante, desenvolvimento, reprodução e neurotoxicidade. Pode detectar efeitos no sistema imunológico inato e fatores de virulência em modelos de infecção.

Pesquisas clássicas envolvem ensaios *in vitro* ou em cultura de células para seleção de alvos logo após essa primeira etapa, a eficácia e a segurança são validadas utilizando modelos de mamíferos ou hospedeiros invertebrados, o uso do modelo em mamíferos, torna os custos da pesquisa mais elevados. Em uma abordagem mais moderna busca-se priorizar a identificação de atributos moleculares de patogenicidade microbiana, avaliando a interação patógeno hospedeiro, e a validação do alvo é subsequentemente realizada usando modelos de doenças infecciosas em mamíferos (Chamilos, Samonis e Kontoyiannis, 2011), como demonstrado na figura 12.

Figura 12 - Via tradicional e alternativa para estudo de novos fármacos antimicrobianos.

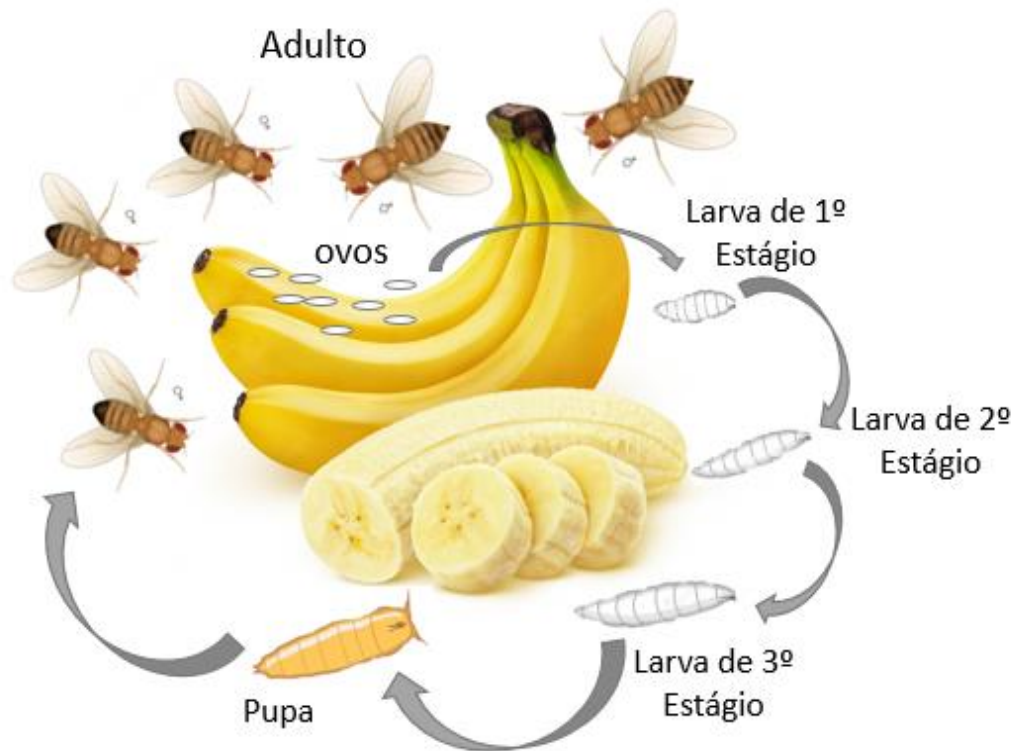


Fonte: Arquivo próprio, adaptado de Chamilos et al., (2011).

Drosophila melanogaster é conhecida como mosca da fruta e pertence à classe Insecta e ordem Diptera, possui desenvolvimento indireto (holometábolo). Seu ciclo de vida engloba quatro estágios de desenvolvimento embrionário: ovo, larva, pupa e adultos (Figura 13). Após a fertilização, o embrião se desenvolve no ovo durante cerca de um dia (a 25 °C) antes de eclodir como larva. A larva desenvolve-se ao longo de cinco dias até tornar-se pupa e sofrer metamorfose. Durante a metamorfose, a maior parte do embrião e o tecido larval são

destruídos. Os tecidos adultos se desenvolvem a partir de grupos de células que foram retiradas desde o início do desenvolvimento embrionário (Jennings B.H; 2011).

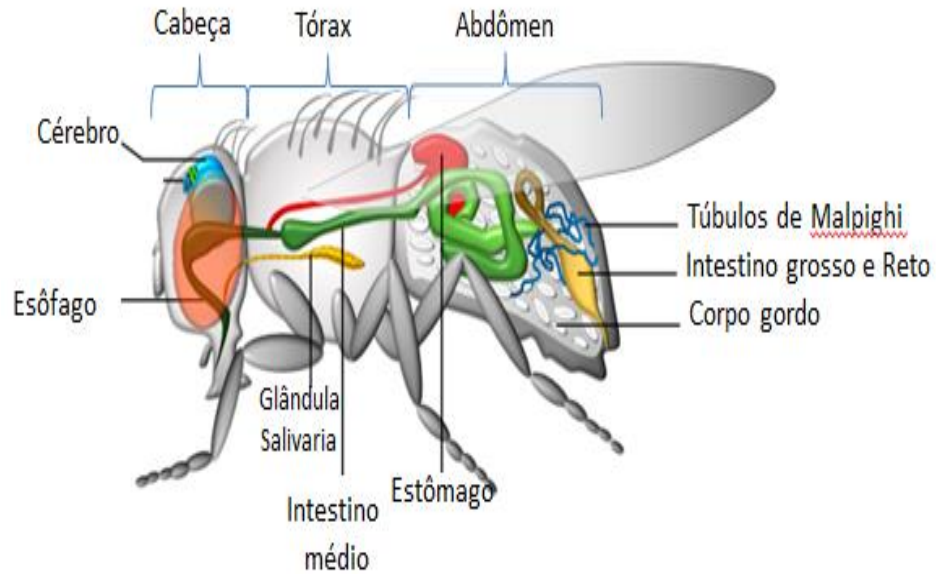
Figura 13 - Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*



Fonte: Arquivo próprio.

As *Drosophila melanogaster* possuem morfologia típica de insetos, seu corpo é segmentado, sendo dividido em três partes: a cabeça, o tórax e o abdômen (Figura 14). Sua cabeça carrega peças bucais de sucção e órgãos sensoriais, incluindo um par de antenas e olhos compostos. No tórax apresenta três segmentos (pró, meso e metatórax) e um par de membros, suas asas estão ligadas ao mesotórax. Os segmentos abdominais não possuem extremidades, mas contêm os órgãos de cópula do macho e da fêmea (Staats, et al., 2018).

Figura 14. Anatomia da *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Arquivo pr6prio, Adaptado de Staats et al., (2018)

Em estudos com modelos de invertebrados s6o usados para avaliar as intera666es hospedeiro microrganismo, uma vez que, estudos com modelos animais vertebrados provaram ser muito trabalhosos e caros para serem amplamente aceitos para a descoberta de antimicrobianos, diante destes pontos os pesquisadores optaram por utilizar organismos invertebrados geneticamente trat6veis, como moscas *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Arabidopsis thaliana* como hospedeiros de pat6genos microbianos, desta forma reduzindo o uso de modelos de vertebrados (Bram Van den Bergh (2022); Chamilos, Samonis e Kontoyiannis, 2011). Al6m disso, a simplicidade, baixo custo, tamanho pequeno e curto tempo de gera666o de esses hospedeiros invertebrados os torna ideais para triagem.

Em experimentos usando as moscas *Drosophila melanogaster* como modelo de infec666o, o pat6geno de interesse pode ser inoculado por diferentes m6todos, como agulhamento e ainda m6todos mais fisiol6gicos de infec666o, com o m6todo de rolamento e o m6todo oral, atrav6s da alimenta666o. Quando o intuito do estudo 6 avaliar a administra666o de agentes potencialmente antimicrobianos, serem administrados por per6odos mais longo, o m6todo de infec666o oral por alimenta666o 6 considerado o mais adequado (Chamilos et al., 2012).

3. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o potencial toxicológico dos compostos orgânicos de telúrio para grande maioria dos microrganismos, em especial o potencial toxicológico do ditelureto de difenila (PhTe)₂, este estudo busca elucidar os mecanismos moleculares envolvidos neste efeito. Outros estudos em organismos mais complexos e com concentrações de composto superior as deste estudo, e em estudos com o composto utilizando células e microrganismos, demonstraram que o (PhTe)₂ tem potencial tanto farmacológico como toxicológico, sendo seus efeitos dose dependente, uma vez que em concentrações mais elevadas tende a apresentar efeito toxicológico e em baixas concentrações possui potencial farmacológico, é importante ressaltar que as doses aplicadas e o efeito está associado ao modelo utilizado, ao tempo de exposição e concentração do (PhTe)₂.

Porém estes estudos foram capazes de elucidar apenas uma parte deste complexo mecanismo toxicológico buscamos ir além e demonstrar os alvos moleculares responsáveis pela resposta da *Escherichia coli* a exposição ao (PhTe)₂, através da expressão dos genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo. Conhecendo o mecanismo de ação toxicológica a aplicabilidade deste composto como um possível antimicrobiano será possível.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo central deste estudo foi avaliar os mecanismos moleculares de toxicidade do (PhTe)₂, em células de *Escherichia coli* (DE3)RIL, e investigar o efeito antimicrobiano do (PhTe)₂, através de modelo alternativo de infecção bacteriana por *Escherichia coli* em *Drosophila melanogaster*.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações composto (PhTe)₂ capaz de causar efeito bactericida e bacteriostático durante a exposição de cepas de *Escherichia coli*;
- Verificar se o (PhTe)₂ causa estresse oxidativo intra e extracelular;
- Avaliar os mecanismos reguladores da resposta ao estresse oxidativo e de defesa antioxidante;
- Determinar o impacto da exposição ao (PhTe)₂ sobre a atividades das enzimas de defesa antioxidantes catalase e superóxido dismutase;
- Determinar a segurança do (PhTe)₂ em *Drosophila melanogaster*, a fim de utiliza-lo como modelo de infecção por *Escherichia coli*;
- Avaliar efeito antimicrobiano do (PhTe)₂ em modelo animal de infecção por *Escherichia coli* em *Drosophila melanogaster*.

5. RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de 1 artigo científico e 1 manuscrito.

Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências, encontram-se nos textos do artigo e do manuscrito.

Artigo 1: Intitulado: Oxidative stress response system in *Escherichia coli* arising diphenyl ditelluride (PhTe)₂ exposure. Publicado na revista: *Toxicology in vitro*.

Manuscrito 1: Intitulado: Antimicrobial effect of (PhTe)₂ in a model of infection by *Escherichia coli* in *Drosophila melanogaster*. A ser submetido a revista:

O artigo está publicado na revista da Elsevier, que indicam no item “*Can I use material from my Elsevier journal article within my thesis/dissertation?*” a seguinte sentença:

“Como autor de um periódico da Elsevier, você tem o direito de incluir o artigo em uma tese ou dissertação (desde que não seja publicada comercialmente), no todo ou em parte, sujeito ao devido reconhecimento; consulte a página de direitos autorais para obter mais informações. Nenhuma permissão por escrito da Elsevier é necessária.

Este direito se estende à publicação de sua tese no repositório de sua universidade, desde que, se você incluir o artigo de jornal publicado, ele esteja incorporado em sua tese e não possa ser baixado separadamente”.

Fonte:

<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions>

Assim sendo, não há permissão por escrito da revista *Toxicology in vitro*.

6. ARTIGO 1

Oxidative stress response system in *Escherichia coli* arising diphenyl ditelluride
(PhTe)₂ exposure.

Publicado na revista: Toxicology *in vitro*.



Oxidative stress response system in *Escherichia coli* arising from diphenyl ditelluride (PhTe)₂ exposure

F.C. Pinheiro^a, V.C. Bortolotto^a, S.M. Araujo^a, S.F. Couto^a, M.M.M. Dahleh^a, M. Cancela^c, J. Neto^b, G. Zeni^b, A. Zaha^c, M. Prigol^{a,*}

^a Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas aplicadas às Moléculas Bioativas – Unipampa, Universidade Federal do Pampa - Campus Itaqui, Itaqui, RS, Brazil

^b Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênicos, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil

^c Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Editor: J Davila

Keywords:

Oxidative stress
Tellurium
Pro-oxidant
Oxidative damage

ABSTRACT

The toxicity of diphenyl ditelluride (PhTe)₂ is associated with its ability to oxidize sulfhydryl groups from biological molecules. Therefore, we evaluated possible molecular mechanisms of toxicity induced by this organochalcogen in *Escherichia coli* (*E. coli*) by evaluating oxidative damage markers, relative expression of genes associated with the cellular redox state in bacteria, such as *katG*, *sodA*, *sodB*, *soxS*, and *oxyR*, as well as the activity of enzymes responsible for cellular redox balance. After exposure of (PhTe)₂ (6, 12, and 24 µg/mL), there was a decrease in non-protein thiols (NPSH) levels, an increase in protein carbonylation and lipid peroxidation in *E. coli*. Intra- and extracellular reactive species (RS) was increased at concentrations of 6, 12, and 24 µg/mL. The superoxide dismutase (SOD) activity was increased at the three concentrations tested, while catalase (CAT) activity was higher at 12 and 24 µg/mL. The *soxS* gene showed lower expression at the three concentrations tested, while the *oxyR* gene was suppressed at 24 µg/mL. The *katG* antioxidant response gene showed lower expression, and *sodA* and *sodB* were positively activated, except for *sodB* at 6 µg/mL. Our findings demonstrate that exposure to (PhTe)₂ induced RS formation, NPSH depletion and changes in transcriptional factors regulation, characterizing it as a multi-target compound, causing disruption in cellular oxidative state, as well as molecular mechanisms associated in *E. coli*.

1. Introduction

Diphenyl ditelluride (PhTe)₂ is an organochalcogen compound and the subject of numerous pharmacological and toxicological studies, which have proven that, at low concentrations, it can prevent oxidative stress induced by various oxidizing agents (Bortoli et al., 2019; Brito et al., 2009; Ibrahim et al., 2012). Nevertheless, when considering human exposure, its lethal dose (LD₅₀) is low compared to other ecological contaminants (Stacchiotti et al., 2009). However, in studies with the V79 cell line, microorganisms such as the yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* and *Salmonella typhimurium* exposed to (PhTe)₂ demonstrated cytotoxic and mutagenic potential at the concentrations of 2.44, 12.21, and 24.42 µM (Degrandi et al., 2010; Jorge et al., 2015).

The study of compounds with toxicological and cytotoxic potential in

microorganisms is currently highlighted in the chemical industry, especially considering those with less environmental impact (Bu-Olayan and Thomas, 2020). In this sense, organic derivatives of tellurium arise, such as (PhTe)₂, characterized by having low ecotoxic effects and promoting cytotoxicity in microorganisms, derived from the ability to deplete thiols, through the depletion and/or conjugation of reduced glutathione (GSH), leading to an increase in reactive oxygen species (ROS), and increasing oxidative stress (Trindade et al., 2019; Hara et al., 2021). Furthermore, exposure to tellurium oxyanion, with similar mechanisms to (PhTe)₂ have shown to be harmful to most microorganisms, and having toxicological effects in bacteria (Díaz-Vásquez et al., 2015; Elías et al., 2015; Pérez et al., 2007; Sandoval et al., 2015).

Microorganisms such as *E. coli* use various defense mechanisms involving the complementary action of distinct pathways, and this

* Corresponding author at: Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n, Promorar, Itaqui, Rio Grande do Sul CEP 97650-000, Brazil.

E-mail address: marinaprigol@unipampa.edu.br (M. Prigol).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105404>

Received 21 January 2022; Received in revised form 25 April 2022; Accepted 26 May 2022

Available online 30 May 2022

0887-2333/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

includes the evolution of specific mechanisms directed against stressors and recruiting a well-established general defense (Aradska et al., 2013). The antioxidant defense system in *E. coli* is well known, where OxyR regulates the expression of genes inducible to hydrogen peroxide (H₂O₂). Among these genes, we found those encoding enzymes known to participate in the bacterial response to oxidative stress, including *katG* (hydrogen peroxidase 1), *gorA* (glutathione reductase), and *SoxS*, regulating the transcription system that responds to superoxide-generating species (Storz and Imlay, n.d.; Zheng and Storz, 1998; Zheng et al., 2001). Increased oxidative stress levels activate the bacterial antioxidant defense response in order to achieve a balance between reactive species production and its removal. Oxidative damage causes adverse effects on macromolecules such as proteins and lipids and alters enzymatic activity through the expression or repression of genes that regulate oxidative stress; the degree of accumulated damage is an indicator of the intensity of oxidative stress (Semchyshyn et al., 2005).

Given this scenario, it is expected that through molecular approaches, we can elucidate possible responses to oxidative stress developed by *E. coli* after exposure to (PhTe)₂, showing possible mechanisms of its toxicity to the microorganism.

2. Materials and methods

2.1. Chemical and strains

Diphenyl ditelluride (PhTe)₂ was prepared according to the method previously published by Petragnani (1994) (Fig. 1). The ¹H NMR and ¹³C NMR spectra analysis showed analytical and spectroscopic data in full agreement with their assigned structure; GC/HPLC determined the chemical purity of (PhTe)₂ (99.9%), which was diluted with dimethyl sulfoxide (DMSO). The bacterial strain used in this study is *E. coli* BL21 (DE3) RIL (*B F- ompT hsdS(rB - mB -) dcm + Tet(r) gal endA Hte [argU ileY leuW Cam(r)*). The strain was kept frozen in 10% glycerol until use.

2.2. Growth conditions and minimum inhibitory concentration determination

The strain was grown in Luria-Bertani broth (LB broth) containing tryptone (1 g), yeast extract (0.5 g), and sodium chloride (1 g) in distilled water (100 mL) without adding antimicrobials. Twenty-four hours before the experiments, the strains were transferred to LB broth to reactivate and replicate. Incubation was performed under shaking at 37 °C for 24 h and 200 rpm; shaking was done in a shaker incubator until reaching 0.5 OD 600. The minimum inhibitory concentration (MIC) is defined as the lowest concentration of an antimicrobial that will inhibit the visible growth of a microorganism overnight of subculture, and for its determination, aliquots of the cell culture were used in a 96-well microplate containing different concentrations of (PhTe)₂, as defined from the broth macrodilution method (Limago, 2001), which was used at concentrations of 1.5, 3, 6, 12, 24, 48, 96, 192, and 384 µg/mL, corresponding to 3.66, 7.32, 14.64, 29.30, 59.61, 117.239, 234.47, 468.95, and 937.91 µM (PhTe)₂.

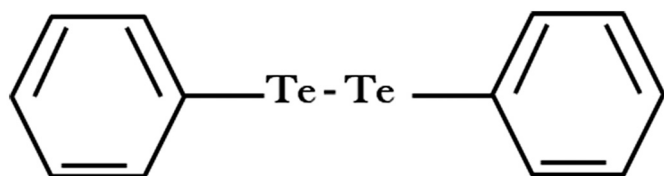


Fig. 1. Chemical structure of the compound diphenyl ditelluride (PhTe)₂.

2.3. Sample preparation (cell extract preparation)

An aliquot of *E. coli* (~1 µL) was transferred from the stock in 10% glycerol to the LB broth 24 h before the assay; on the day of the experiment, 0.1 mL was transferred to 100 mL of LB broth and monitored until reaching 0.5 OD 600, centrifuged, and washed with phosphate buffer. Then, each vial received one of the three tested concentrations of the compound (0.5, 1, and 2 MIC), respectively, being 6, 12, and 24 µg/mL, according to Limago (2001) and Pinheiro et al. (2018). The *E. coli* aliquots were incubated for 30 min at 37 °C because of the acute (PhTe)₂ exposure bias. This time was determined from a curve of 0, 15, 30, and 60 min, where it was observed that 30 min was the standard time to assess acute exposure to (PhTe)₂, as also reported by González et al. (2012) and Elías et al. (2015), where the exposure of oxyanion tellurite (TeO₃²⁻) for 30 min could modulate mechanisms associated with the endogenous antioxidant defenses of *E. coli*, presenting responses to acute toxicity. For all analyses, four independent experiments were carried out (*n* = 4).

2.4. Determination of pro-oxidant status and oxidative damage

In all analyzes the samples of *E. coli* BL21 (DE3) RIL were cultivated in LB broth until reaching 0.5 (OD 600), after which they were incubated for 30 min at 37 °C with (PhTe)₂ at 6, 12, and 24 µg/mL in all analyzes.

2.4.1. Reactive species – extracellular and intracellular

The extracellular reactive species (RS) were determined according to Reinoso et al. (2012), with some adaptations. For analysis the samples were washed, centrifuged, and suspended in 25 mM phosphate buffer pH 7.0, and the cells were incubated with 1 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; final concentration of 1 mM) for 30 min in the dark. Fluorescence intensity was also monitored (428 nm excitation and 522 nm emission).

The intracellular RS levels were measured according to the method described by Sandoval et al. (2011), with some modifications. Subsequently, it was centrifuged and washed with 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and incubated for 30 min with 10 mM DCF-DA in the dark. Then, they were centrifuged and washed with phosphate buffer; the reaction was stopped by the glass bead lysis method. The results were obtained and expressed as a percentage of the control DCF formation in arbitrary units (AU).

2.4.2. Carbonyl protein measurement

The content of carbonyl groups in proteins was determined using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) according to Lenz et al. (1989). Assays were performed using cell extracts as described above. Samples were incubated with 10.0 mM DNPH in 2.0 M HCl at room temperature for 60 min. Proteins were precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA), centrifuged at 10000 rpm for 5 min, and washed three times with 1 mL of ethyl acetate/ethanol (1:1). The pellet was kept and allowed to dry at room temperature; the sodium dodecyl sulfate (SDS) solution was then added to dissolve the pellet. The final solution was calculated by spectrophotometry at 370 nm using a molar extinction coefficient of $\epsilon = 22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and expressed as nmol carbonyl/mg protein.

2.4.3. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Tests were carried out using the cell extract, according to (Ohkawa et al., 1979), through the formation of malondialdehyde (MDA). The samples were prepared by pipetting the cell extract (1 mL) and precipitating with 20% TCA (1 mL), centrifugation, and using the supernatant as a sample. The reaction was performed with 0.8% thiobarbituric acid solution, acetic acid buffer, 8.1% SDS, water, and the sample (50 µL). The samples were heated for 120 min at 95 °C in a water bath; the mixture was later cooled, and the optical density was measured spectrophotometrically at 532 nm; the results were expressed as nmol MDA/g cell extract from a calibration curve of 0.3 mM MDA.

2.5. Relative gene expression

Gene expression quantification was done by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR) of the target genes: *katG*, *sodA*, *sodB*, *oxyR*, *soxS*, and *rpoD* was used as normalized. The strain was prepared as previously described until 0.5 (OD 600) and exposed to (PhTe)₂ (6, 12, and 24 µg/mL) for 30 min. RNA extraction was then performed using the standard TRIzol protocol, and quantification was performed using the Qubit RNA HS assay kit; the cDNA was prepared from approximately 1 µg of RNA using the M-MLV-RT kit (Invitrogen) as recommended. Primers used in qPCR analysis are described in (Table 1). Reactions were carried out using the LightCycler RNA amplification SYBR Green I kit (Invitrogen), as recommended by the manufacturer. Analysis of relative gene expression data was calculated using the 2^{-ΔΔCt} method according to (Livak and Schmittgen, 2001):

$$\Delta C_t \text{ control} = C_t \text{ target gene} - C_t \text{ normalizing gene (rpoD)}$$

$$\Delta C_t \text{ stress} = C_t \text{ target gene} - C_t \text{ normalizing gene (rpoD)}$$

$$\text{Normalization} : \Delta C_t \text{ control} - \Delta C_t \text{ stress}$$

$$\text{Qualification} : 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

2.6. Evaluation of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system

2.6.1. Enzymatic activity

Measurements of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity were made using the cell extract, as previously described. The CAT activity was quantified by consuming 10 mM H₂O₂, at 240 nm, in a molar extinction coefficient of $\epsilon = 43.60 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ according to Aebi (1984), with some modifications. Hydrogen peroxide demand was evaluated in microplates containing the buffer mix KPi 0.25 M/EDTA 2.5 mM pH 7.0 and triton X 100, and the sample was then added (30 µL), and finally, 0.5 M hydrogen peroxide (10 µL); readings were carried out for 5 min. Blanks were run in the absence of hydrogen peroxide. The results were expressed in U/mg of protein, where one CAT unit (U) corresponds to the enzyme activity required to consume 1 µmol of H₂O₂/min.

The SOD activity was quantified according to the method of Misra and Fridovich (1972), with some adaptations. The reaction was performed in a mixture and prepared in a final volume of 290 µL of bicarbonate buffer (0.057 M), the bacterial cell extract, and epinephrine (6 mM) and immediately read for 2 min in a microplate reader with an absorbance of 480 nm in a molar extinction coefficient of $\epsilon = 4020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The results were expressed in U/mg of protein, where one SOD unit (U) is defined as enzyme activity required for the 50% oxidative inhibition of epinephrine by dismutation of the superoxide anion.

2.6.2. Non-protein thiol (NPSH) levels

Non-protein intracellular thiol levels were estimated by

Table 1

Oligonucleotides used in this study.

Target genes	Primer	Sequences
<i>katG</i> (hydroperoxidase I and II)	katG F	5' GATATGCGTTACGAGTGAAAG 3'
	katG R	5' GTTAGAACCAACACCAGATCC 3'
<i>sodA</i> (MnSOD)	sodA F	5'TTTCTACTGCTAACCCAGGATTC 3'
	sodA R	5'CGTCCAGAACTCTTTGATGTAG3'
<i>sodB</i> (FeSOD)	sodB F	5'GGCTATCGTTTCAACCTCTAAC3.
	sodB R	5' CTCCTCCAGTGATTTACCTTCA3'
<i>soxS</i> (oxidative stress regulator)	soxF	5' CTCGTCAATCCATGCGATAA3'
	soxSR	5'GTACCACCTTGAATAGCCTGAT3'
<i>oxyR</i> (oxidative stress regulator)	oxyF	5'GGTGAAAGTCCTTAAAGAGATGG3'
	oxyR	5'GGTGCAGCATAGGATAAATATG 3'
<i>rpoD</i> (normalizer)	rpoDF	5'GACATCGCTAAGCGTATTGAAGA3'
	rpoDR	5'TCGTACTGTCCAGCAGATAGGT3'

spectrophotometry according to Ellman (1959), with adaptations. The samples were prepared with 200 µL of the supernatant, where 200 µL of TCA 10% was added, subsequently vortexed for 1 min, and centrifuged at 3000 rpm for 10 min; 50 µL of the supernatant, 180 µL of 1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), and 20 µL of 10 nM M-5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) were added. Absorbance was measured at 412 nm in a molar extinction coefficient of $\epsilon = 13,60 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ immediately after adding the reagents and expressed in nmol/g cell extract.

2.7. Statistical analysis

Data were verified for normal distribution using the Shapiro-Wilk test and homogeneity using the Brown-Forsythe test. The analyses of relative gene expression were calculated through the 2^{-ΔΔCt} method according to Livak and Schmittgen (2001), and the remaining results were compared using one-way ANOVA and Tukey post-hoc for multiple comparisons. Descriptive data were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Probability values below 0.05 ($p < 0.05$) were considered statistically significant. All statistical analysis results were performed using the GraphPad Prism 9.1.2 software.

3. Results

3.1. Response concentrations to (PhTe)₂

As determined by the MIC assay, the concentration of (PhTe)₂ at 12 µg/mL was the lowest concentration that inhibited the visible growth of *E. coli* in our study. The 0.5× (6 µg/mL), 1× (12 µg/mL), and 2× MIC (24 µg/mL) were defined as the lowest concentration to analyze the pro-oxidant profile, expression of genes that respond to oxidative stress, and activity of antioxidant enzymes CAT and SOD in 30 min exposure to (PhTe)₂ in *E. coli* BL21 (D3) RIL strain, enabling the assessment of acute toxicity of this organochalcogen.

3.2. Oxidative damage after (PhTe)₂ exposure

Oxidative insults and pro-oxidant effects of the compound were evaluated by determining RS levels in the intra- and extracellular environment and through markers of oxidative damage in proteins and lipids (Fig. 2). The results show that RS levels (intra- and extracellular) increased at 6, 12 and 24 µg/mL compared to the control group (Fig. 2A and B, respectively). In Fig. 2C and D, the results are indicators of the intensity of oxidative damage resulting from higher levels of oxidative stress caused by exposure to the compound, as demonstrated by the increased levels of carbonyl proteins (Fig. 2D) and lipid peroxidation (TBARS) (Fig. 2C) at all three concentrations (6, 12, and 24 µg/mL) after 30 min of exposure to (PhTe)₂.

3.3. Analysis of gene expression in response to stress caused by (PhTe)₂ exposure

Relative expression of oxidative stress-response genes related to oxidative stress *soxS* and *oxyR* and genes responsible for antioxidant response detoxification process *sodA*, *sodB*, and *katG* were evaluated by qRT-PCR 30 min after *E. coli* exposure to (PhTe)₂. The analysis of the oxidative stress response genes had a distinct behavior: *oxyR* was up-regulated in the concentrations of 1× (12 µg/mL) and 0.5× MIC (6 µg/mL), and it showed decreased expression at the highest concentration; when we analyzed *soxS* expression, a low expression was observed at the three concentrations (Table 2). The expression of *katG*, *sodA*, and *sodB* genes was evaluated in order to observe antioxidant defense responses; *katG* gene expression remained low at the study concentrations, while *sodA* was up-regulated at the three concentrations. Moreover, *sodB* remained repressed at 6 µg/mL and up-regulated at 12 and 24 µg/mL.

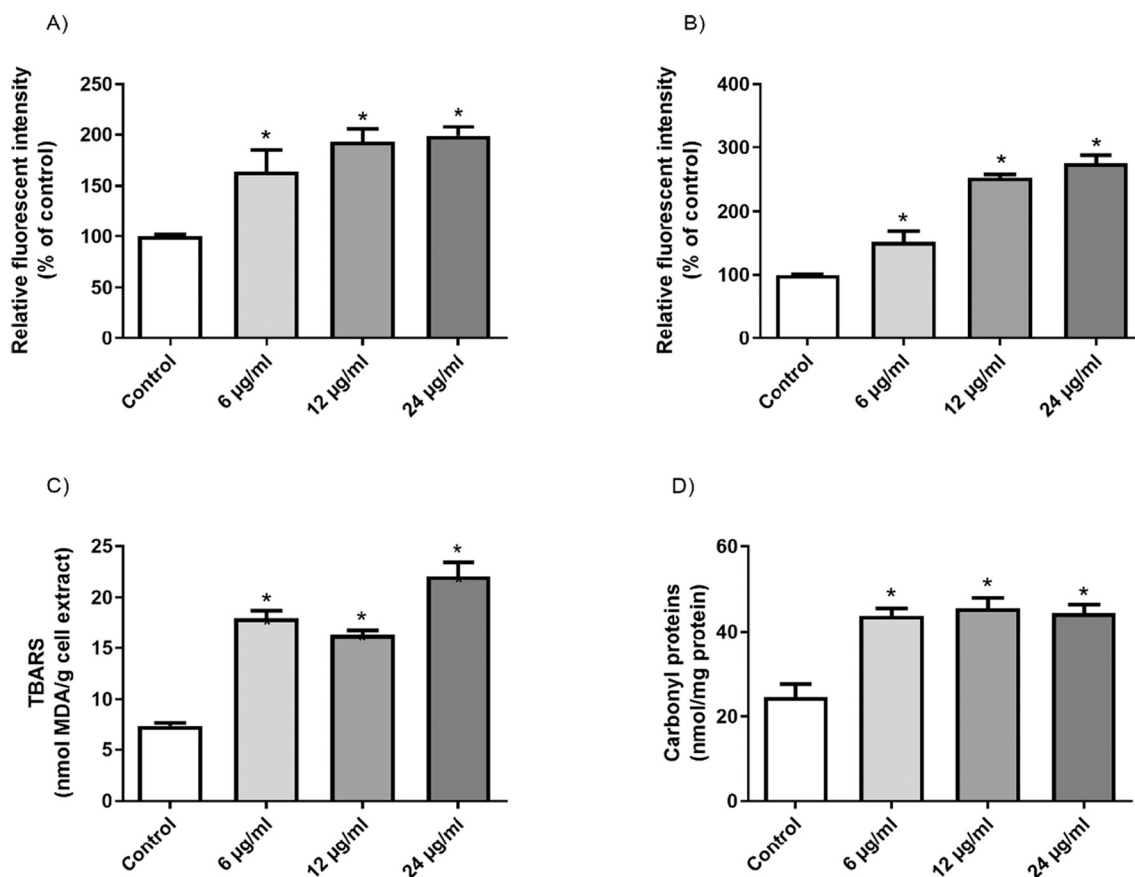


Fig. 2. Oxidative damage by exposing an *E. coli* BL21 (DE3) RIL strain to (PhTe)₂. Relative fluorescence intensity of intra- and extracellular reactive species (A and B, respectively). TBARS levels (C) and carbonyl proteins content (D). *Significant difference compared with the control group. Results are the average of four experiments ± error of the mean (SEM).

Table 2

Relative expression of indicated genes in *Escherichia coli* exposed for 30 min to 6, 12, and 24 µg/mL concentrations of (PhTe)₂.

Gene	Relative expression (PhTe) ₂ concentrations		
	6 µg/mL	12 µg/mL	24 µg/mL
<i>oxyR</i>	1.66	1.01	0.96
<i>soxS</i>	0.54	0.62	0.22
<i>katG</i>	0.64	0.86	0.98
<i>sodA</i>	1.95	1.01	1.36
<i>sodB</i>	0.26	1.27	1.66

3.4. Effects of (PhTe)₂ on the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system

The antioxidant system includes antioxidant enzymes and other non-enzymatic agents. Hence, we sought to determine the effects of (PhTe)₂ exposure on *E. coli* after 30 min of exposure, and the activities of the main antioxidant enzymes are shown in Figs. 3A and 4B. The CAT activity increased at 12 and 24 µg/mL, and at the lowest concentration, it was maintained at the control level; SOD activity increased at 6, 12, and 24 µg/mL compared to the control after 30 min of exposure.

As a non-enzymatic antioxidant marker, the non-protein thiols levels were measured (Fig. 4), and our findings revealed that, for all (PhTe)₂ concentrations, there was a drop of ≈ 55% in non-protein thiols levels compared to the control group.

4. Discussion

The toxicological effects of telluric forms and organic compounds of tellurium are proven for most microorganisms, especially gram-negative bacteria, including *E. coli*. (Díaz-Vásquez et al., 2014; Pinheiro et al., 2018; Sandoval et al., 2015). Our MIC results indicate that the concentration of 12 µg/mL (29.30 µM) (PhTe)₂ was the lowest capable of inhibiting the visible growth of *E. coli*, evaluated for 30 min and considering the acute exposure bias of this organochalcogen. In studies such as González et al. (2012) and Elías et al. (2015), acute TeO₃²⁻ exposure for 30 min of is mainly associated with increased production of RS and lipid peroxidation, increasing the antioxidant responses of *E. coli* to the toxicity of TeO₃²⁻, which has similar mechanisms to (PhTe)₂ at the cellular level (Cunha et al., 2009). Furthermore, the MIC concentration (29.30 µM) of (PhTe)₂ found corroborates Degrandi et al. (2010), in which the use of (PhTe)₂ at 1–50 µM, at all concentrations, induces increased oxidative stress, associated with higher genotoxic effects on V79 cells, causing apoptosis.

In our results, an increase in RS formation at the extra- and intracellular levels was verified at the concentrations of 6, 12, and 24 µg/mL of (PhTe)₂ in *E. coli*. The toxicity of (PhTe)₂ is associated with its ability to reduce thiols, depleting GSH, which concomitantly causes high production of RS, as demonstrated by Puntel et al. (2012), where (PhTe)₂ concentrations of 2.70–44.71 µM of caused toxicity to rat hepatocytes. The hydrophobic characteristic of (PhTe)₂ allows its diffusion through the cytoplasmic membrane and can be metabolized into hydrophilic and potentially more toxic intermediates, such as tellurol/tellurate, due to the ability of (PhTe)₂ to reduce thiol groups (thiol-oxidase activity) (Puntel et al., 2012; Trindade et al., 2019). A known mechanism of

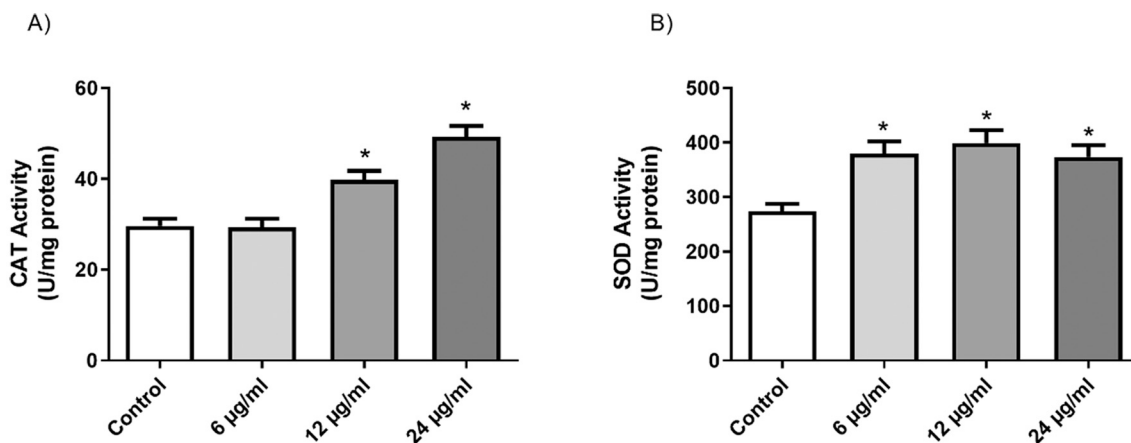


Fig. 3. CAT (A) and SOD (B) activity after exposure to three concentrations of (PhTe)₂ (6, 12, and 24 µg/mL) after 30 min. *Significant differences compared with the control group. Results are the average of four experiments ± error of the mean (SEM).

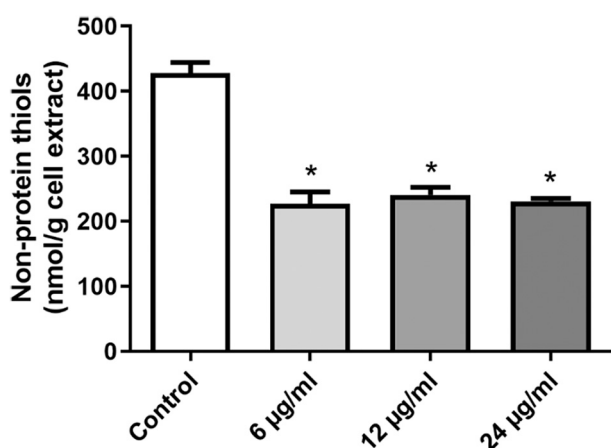


Fig. 4. Levels of non-protein thiols (NPSH) in *E. coli* BL21 (DE3) RIL exposed to (PhTe)₂. *Significant difference compared with the control group. Results are the average of four experiments ± error of the mean (SEM).

organochalcogen toxicity is the ability to enter the cell and increase NPSH depletion (Comparsi et al., 2012), as verified in our results, where there was a decrease in NPSH levels at concentrations of 6, 12, and 24 µg/mL of (PhTe)₂, demonstrating the thiol-oxidase activity of this organochalcogen (Puntel et al., 2012; Trindade et al., 2019). It is noteworthy that this (PhTe)₂ mechanism occurs mainly at the cellular level, as its stability allows it to maintain its organic form until it enters cells (Princival et al., 2017), forming potentially harmful compounds to the cell (Bueno et al., 2018).

The ability to enhance RS formation by (PhTe)₂ can significantly damage cellular integrity, including the cytoplasmic membrane of *E. coli* (Ezraty et al., 2017). Considering the phospholipid characteristic of the cytoplasmic membrane, it is important to emphasize that the increased RS formation can generate peroxy and hydroperoxide radicals, which are responsible for increasing the instability of this cytoplasmic membrane, allowing the entry of external harmful agents, in addition to (PhTe)₂, increasing the toxic effects of this compound (Doukyu and Taguchi, 2021). We can observe that at the concentrations of 6, 12, and 24 µg/mL, there were higher MDA levels, which characterizes the increase in lipid peroxidation and, therefore, cellular instability (Winterbourn et al., 2016). The increase in the entry of harmful substances is directly responsible for greater damage to cellular proteins, and at the three concentrations, one can note higher protein carbonylation, which may be related to the increased RS binding to 4Fe-4S groups, increasing the release of iron and inactivating several proteins that are essential for

cellular metabolism, mainly through the reduction and/or cysteine oxidation and oxidizing sulfhydryl groups. This redox mechanism may be associated with the regulation and modulation of genes responsible for controlling oxidative stress in bacteria, such as the expression of *oxyR* gene (Sies, 2015; Lu and Imlay, 2019).

By analyzing the results of the relative gene expression, one can note a decrease in *oxyR* at the highest concentration of (PhTe)₂, whereas we verified that, at the three concentrations, there was a decrease in *soxS* expression. The lower *oxyR* expression at the 24 µg/mL indicates the lower capacity of redox cycle renewal, and therefore, decreasing the ability of *E. coli* to restore GSH levels, disrupting glutathione metabolism, allowing higher cellular toxicity, and reducing its ability to neutralize peroxides (Pomposiello and Demple, 2001; Fu et al., 2018). The lower expression of *soxS* at the three concentrations demonstrates the lower resistance against peroxide agents at the cellular level, which in the same way as *oxyR*, increases GSH depletion (Pomposiello and Demple, 2001; Meinerz et al., 2014; Puntel et al., 2012; Fu et al., 2018; Trindade et al., 2019). The analysis of both genes, (*oxyR* and *soxS*) helps to understand the increase in the number of releases of sulfhydryl groups presented by the low levels of NPSH at the three concentrations *E. coli* (Baez and Shiloach, 2013).

The passage of harmful agents into the cell leads to a greater need for neutralizing agents to reduce these substances and transform them into less noxious products (Pisoschi and Pop, 2015). For this, we verified that there were higher levels of CAT activity at the concentrations 12 and 24 µg/mL, whereas SOD activity increased at the three concentrations. These findings demonstrate that (PhTe)₂ stimulated the primary antioxidant defenses in *E. coli* cells, an additional indication of the sensitization of these mechanisms associated with cellular toxicity (Trindade et al., 2019). In the relative expression of *katG*, we observed an increase in the three concentrations, and this may be mainly associated with the decreased renewal of enzymes such as CAT, which is responsible for cellular defenses against H₂O₂, demonstrating that even with the increase in the activity of enzymes such as CAT, a possible decrease in the renewal of this enzyme may occur (Zhang et al., 2015).

The increased expression of *sodA* and *sodB* genes at all concentrations (except 6 µg/mL in *sodB*) indicates the ability of (PhTe)₂ to alter SOD defense mechanisms. The increased expression of these genes, together with the increased SOD activity, may be involved with the accumulation of hydroperoxide and superoxide agents at the cellular level, indicating redox instability (Tabrizi et al., 2018; Doukyu and Taguchi, 2021). The expression of *sodA* is regulated by the *marA/soxS/rob* and *Fur* (Ferric uptake regulator) pathway; both mechanisms are related to the higher oxidation of sulfhydryl groups, where the decrease in *soxS* expression (GSH depletion), and release of groups 4Fe-4S, directly influences the expression of *sodA*, which is responsible for preventing DNA damage in

bacteria (Tabrizi et al., 2018; Doukyu and Taguchi, 2021). Nonetheless, the toxicity of (PhTe)₂ in *sodB* is lower as this gene is less sensitive to the action of hydroperoxides and peroxides compared to *sodA*. However, the increase in its expression directly indicates the higher SOD activity at the cytoplasmic level, indicating an increase in superoxide radicals and increased cell toxicity induced by (PhTe)₂ in *E. coli* (Tabrizi et al., 2018; Doukyu and Taguchi, 2021).

5. Conclusions

The (PhTe)₂ was responsible for increased levels of lipid peroxidation, protein carbonylation, and RS at extra- and intracellular levels, with increased CAT and SOD activity at higher (PhTe)₂ concentrations involved with the suppression of *katG* and higher expression of *sodA* and *sodB*, genetic regulators for the metabolism of these enzymes. Our findings also demonstrated lower NPSH levels, which may be indirectly associated with increased GSH depletion and lower *oxyR* and *soxS* expression at higher (PhTe)₂ concentrations. This may be associated with excessive RS production and cell lipid and protein damage, characterizing (PhTe)₂ as a multi-target compound capable of triggering molecular mechanisms associated with promoting greater cellular toxicity in *E. coli*.

Author contributions

- PINHEIRO, F-C and PRIGOL M had access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.
- PINHEIRO, F-C, ZAHA, A, CANCELA, M, BORTOLOTTI V-C, and ARAUJO S.M conceived and designed the project and drafted the manuscript.
- PINHEIRO, F-C, BORTOLOTTI V-C data processing in software.
- ZENI G, NETO J synthesis and characterization of (PhTe)₂.
- PINHEIRO, F-C, CANCELA, M, BORTOLOTTI V-C, ARAUJO S.M and DAHLEH M.M.M performed the biochemical measurements, molecular analysis and acquisition of data.
- PINHEIRO, F-C, BORTOLOTTI V-C, DAHLEH M.M.M interpretation of data and statistical analysis.
- PINHEIRO, F-C, ZAHA, A, CANCELA, M, DAHLEH M.M.M, PRIGOL M. critical revision of the manuscript for important intellectual content.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support received from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (308120/2020-5), the Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS) (PQG 19/2551-0001913-0), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Financial Code 001, for the support and research grants provided. We would also like to thank Atlas Assessoria Linguística for language editing.

References

Aebi, H., 1984. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).

Aradská, J., Šmidák, R., Turkovičová, L., Turňa, J., Lubec, G., 2013. Proteomic differences between tellurite-sensitive and tellurite-resistant *E. coli*. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078010>.

Baez, A., Shiloach, J., 2013. *Escherichia coli* avoids high dissolved oxygen stress by activation of SoxRS and manganese-superoxide dismutase. *Microb. Cell Factories* 12 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-23>.

Bortoli, M., Tiezza, M.D., Muraro, C., Saielli, G., Orlian, L., 2019. The 125Te chemical shift of diphenyl ditelluride: chasing conformers over a flat energy surface. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24071250>.

Brito, V.B., Rocha, J.B.T., Folmer, V., Erthal, F., 2009. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice. *Acta Biochim. Pol.* 56, 125–134. <https://doi.org/10.18388/abp.2009.2524>.

Bueno, D., Meinerz, D., Waczuk, E., de Souza, D., Batista Rocha, J., 2018. Toxicity of organochalcogens in human leukocytes is associated, but not directly related with reactive species production, apoptosis and changes in antioxidant gene expression. *Free Radic. Res.* 52 (10), 1158–1169. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1536824>.

Bu-Olayan, A.H., Thomas, B.V., 2020. Bourgeoning impact of the technology critical elements in the marine environment. *Environ. Pollut.* 265, 115064 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115064>.

Compari, B., Meinerz, D.F., Franco, J.L., Posser, T., de Souza Prestes, A., Stefanello, S.T., Rocha, J.B., 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), 173–182. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1408-6>.

Cunha, R.L., Gouvea, I.E., Juliano, L., 2009. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. *An. Acad. Bras. Cienc.* 81 (3), 393–407. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652009000300006>.

Degrandi, T.H., De Oliveira, I.M., D'Almeida, G.S., Garcia, C.R.L., Villela, I.V., Guecheva, T.N., Rosa, R.M., Henriques, J.A.P., 2010. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 25, 257–269. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq002>.

Díaz-Vásquez, W.A., Abarca-Lagunas, M.J., Arenas, F.A., Pinto, C.A., Cornejo, F.A., Wansapura, P.T., Appuhamillage, G.A., Chasteen, T.G., Vásquez, C.C., 2014. Tellurite reduction by *Escherichia coli* NDH-II dehydrogenase results in superoxide production in membranes of toxicant-exposed cells. *BioMetals* 27, 237–246. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9701-8>.

Díaz-Vásquez, W.A., Abarca-Lagunas, M.J., Cornejo, F.A., Pinto, C.A., Arenas, F.A., Vásquez, C.C., 2015. Tellurite-mediated damage to the *Escherichia coli* NDH-dehydrogenases and terminal oxidases in aerobic conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* 566, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.10.011>.

Doukyu, N., Taguchi, K., 2021. Involvement of catalase and superoxide dismutase in hydrophobic organic solvent tolerance of *Escherichia coli*. *AMB Express* 11 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01258-w>.

Elías, A., Díaz-Vásquez, W., Abarca-Lagunas, M.J., Chasteen, T.G., Arenas, F., Vásquez, C.C., 2015. The ActP acetate transporter acts prior to the PitA phosphate carrier in tellurite uptake by *Escherichia coli*. *Microbiol. Res.* 177, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.04.010>.

Ellman, G.L., 1959. Tissue S_u ~ yd ~ 1 Groups 70–77.

Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., Collet, J.F., 2017. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 15 (7), 385–396. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>.

Fu, L.H., Wei, Z.Z., Hu, K.D., Hu, L.Y., Li, Y.H., Chen, X.Y., Zhang, H., 2018. Hydrogen sulfide inhibits the growth of *Escherichia coli* through oxidative damage. *J. Microbiol.* 56 (4), 238–245. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7537-1>.

González, M.V., Pérez-Donoso, J.M., Vásquez, C.C., 2012. Effect of tellurite-mediated oxidative stress on the *Escherichia coli* glycolytic pathway. *Biometals* 25 (2), 451–458. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9518-x>.

Hara, T., Okazaki, T., Hashiya, T., Nozawa, K., Yasuike, S., Kurita, J., Kaji, T., 2021. Effects of substitution on cytotoxicity of diphenyl Ditelluride in cultured vascular endothelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (19), 10520. <https://doi.org/10.3390/ijms221910520>.

Ibrahim, M., Hassan, W., Anwar, J., Nogueira, C.W., Teixeira Rocha, J.B., 2012. Fe(II) and sodium nitroprusside induce oxidative stress: a comparative study of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride with their naphthyl analog. *Drug Chem. Toxicol.* 35, 48–56. <https://doi.org/10.3109/01480545.2011.588711>.

Jorge, P.M., de Oliveira, I.M., Filippi Chiela, E.C., Viau, C.M., Saffi, J., Horn, F., Rosa, R.M., Guecheva, T.N., Pêgas Henriques, J.A., 2015. Diphenyl ditelluride-induced cell cycle arrest and apoptosis: a relation with topoisomerase I inhibition. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 116, 273–280. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12315>.

Lenz, A.G., Costabel, U., Shaltiel, S., Levine, R.L., 1989. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. *Anal. Biochem.* 177, 419–425. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90077-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90077-8).

Limbago, B., 2001. M100-S11, performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Newsl.* 23, 49. [https://doi.org/10.1016/S0196-4399\(01\)88009-0](https://doi.org/10.1016/S0196-4399(01)88009-0).

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Lu, Z., Imlay, J.A., 2019. A conserved motif liganding the [4Fe–4S] cluster in [4Fe–4S] fumarases prevents irreversible inactivation of the enzyme during hydrogen peroxide stress. *Redox Biol.* 26, 101296 <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101296>.

Meinerz, D.F., Allebrandt, J., Mariano, D.O.C., Waczuk, E.P., Soares, F.A., Hassan, W., Rocha, J.B.T., 2014. Differential genotoxicity of diphenyl diselenide (PhSe)₂ and diphenyl ditelluride (phte)₂. *PeerJ* 2014, 1–11. <https://doi.org/10.7717/peerj.290>.

- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)45228-9).
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- Pérez, J.M., Calderón, I.L., Arenas, F.A., Fuentes, D.E., Pradenas, G.A., Fuentes, E.L., Sandoval, J.M., Castro, M.E., Elías, A.O., Vásquez, C.C., 2007. Bacterial toxicity of potassium tellurite: unveiling an ancient enigma. *PLoS One* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000211>.
- Petragani, Nicola, 1994. *Tellurium in Organic Synthesis*, 1st ed. Academic Press.
- Pinheiro, F.C., Bortolotto, V.C., Araujo, S.M., Poetini, M.R., Sehn, C.P., Neto, J.S.S., Zeni, G., Prigol, M., 2018. Antimicrobial effect of 2-phenylethynyl-butyltellurium in *Escherichia coli* and its association with oxidative stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1209–1216. <https://doi.org/10.4014/jmb.1802.12074>.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.
- Pomposiello, P.J., Demple, B., 2001. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* 19, 109–114. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01542-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01542-0).
- Princival, C.R., Archilha, M.V., Dos Santos, A.A., Franco, M.P., Braga, A.A., Rodrigues-Oliveira, A.F., Comasseto, J.V., 2017. Stability study of hypervalent tellurium compounds in aqueous solutions. *ACS Omega* 2 (8), 4431–4439. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00628>.
- Puntel, R.L., Roos, D.H., Seeger, R.L., Rocha, J.B.T., 2012. Mitochondrial electron transfer chain complexes inhibition by different organochalcogens. *Toxicol. in Vitro* 27, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.011>.
- Reinoso, C.A., Auger, C., Appanna, V.D., Vásquez, C.C., 2012. Tellurite-exposed *Escherichia coli* exhibits increased intracellular α -ketoglutarate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 721–726. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.069>.
- Sandoval, J.M., Arenas, F.A., Vásquez, C.C., 2011. Glucose-6-phosphate dehydrogenase protects *Escherichia coli* from tellurite-mediated oxidative stress. *PLoS One* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025573>.
- Sandoval, J.M., Arenas, F.A., García, J.A., Díaz-Vásquez, W.A., Valdivia-González, M., Sabotier, M., Vásquez, C.C., 2015. *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydrogenase aids in tellurite resistance by reducing the toxicant in a NADPH-dependent manner. *Microbiol. Res.* 177, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.002>.
- Semchshyn, H., Bagnyukova, T., Storey, K., Lushchak, V., 2005. Hydrogen peroxide increases the activities of soxRS regulon enzymes and the levels of oxidized proteins and lipids in *Escherichia coli*. *Cell Biol. Int.* 29, 898–902. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.08.002>.
- Sies, H., 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.
- Stacchiotti, A., Volti, G.L., Lavazza, A., Rezzani, R., Rodella, L.F., 2009. Schisandrin B stimulates a cytoprotective response in rat liver exposed to mercuric chloride. *Food Chem. Toxicol.* 47 (11), 2834–2840. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.003>.
- Storz, G., Imlay, J.A., n.d. Oxidative stress Gisela Storz * and James A Imlay ? *Curr. Opin. Microbiol.* 188–194.
- Tabrizi, P.F., Wennige, S., Berneburg, M., Maisch, T., 2018. Susceptibility of sodaA- and sodB-deficient *Escherichia coli* mutant towards antimicrobial photodynamic inactivation via the type I-mechanism of action. *Photochem. Photobiol. Sci.* 17 (3), 352–362. <https://doi.org/10.1039/c7pp00370f>.
- Trindade, C., Juchem, A.L.M., Guecheva, T.N., De Oliveira, I.M., Dos Santos Silveira, P., Vargas, J.E., Puga, R., Pessoa, C., Henriques, J.A.P., 2019. Diphenyl Ditetelluride: redox-modulating and Antiproliferative properties. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2019 <https://doi.org/10.1155/2019/2510936>.
- Winterbourn, C.C., Kettle, A.J., Hampton, M.B., 2016. Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 765–792. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014442>.
- Zhang, Lu, et al., 2015. Proline metabolism increases *katG* Expression and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriology* 197 (3), 431–440. <https://doi.org/10.1128/JB.02282-14>. In press.
- Zheng, M., Storz, G., 1998. *Was Deter*, 279, 11–14.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., 2001. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the. *J. Bacteriol.* 183, 4562–4570. <https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4562>.

7. MANUSCRITO 1:

Antimicrobial effect of (PhTe)₂ in a model of infection by *Escherichia coli* in *Drosophila melanogaster*

Pinheiro FC¹; Bortolotto VC¹; Araujo SM¹; Dahleh MMM¹; Neto J²; Zeni G²; Zaha A³; Prigol M¹ *

¹ Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas aplicadas às Moléculas Bioativas –Unipampa, Universidade Federal do Pampa - Campus Itaqui, Itaqui, RS, Brazil.

² Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênios, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil

³ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author:

Marina Prigol

Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui

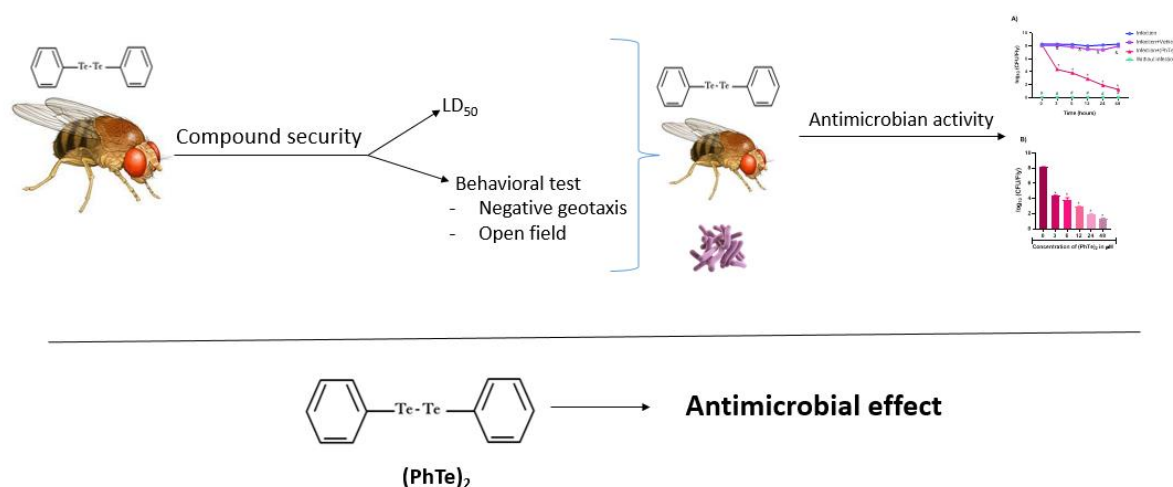
Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n - Bairro: Promorar, Itaqui, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 97650-000

E-mail addresses: marinaprigol@unipampa.edu.br (M.Prigol)

Abstract: Diphenyl ditelluride (PhTe)₂ is an organotelluric compound that has pharmacological and toxicological properties, this compound has demonstrated toxicological potential in studies with microorganisms. The use of an alternative animal model such as *Drosophila melanogaster* for the study of new antimicrobials has gained more and more space, since this model is cheaper, easier to handle and as effective as vertebrate models. Studies that analyze new antimicrobials are necessary, in view of the growing number of microorganisms resistant to known antibiotics, including *Escherichia coli*. In this study, we demonstrate that the concentration of 10 μM (PhTe)₂ is below the LC_{50} of (PhTe)₂, for a time of 48 hours (44.12 μM) of exposure. We evaluated through negative geotaxis and open field behavioral tests, possible motor and neurological damage, it was observed that the compound did not cause motor and/or neurological damage, as it did not change the behavior of the flies. After confirming that the compound is safe for the model, we determined its antimicrobial potential of (PhTe)₂, using an oral infection model, with axenic flies. Axenic flies were exposed to *Escherichia coli* for 18-20 hours, after which they were treated with 10 μM (PhTe)₂ for 0, 3, 6, 12 and 24 and 48 hours, and then plating and colony counts were performed. A logarithmic curve of bacterial load was constructed to demonstrate the antimicrobial effect of the compound, where we could observe that the concentration of 10 μM of (PhTe)₂ was able to significantly reduce the bacterial load of flies exposed to *Escherichia coli* and later treated with the compound. We observed that this compound is effective after 3 hours of exposure, and it should be noted that the longer the flies were exposed to the compound, the lower the number of colonies found. Given these results, we can conclude that 10 μM of (PhTe)₂ is able to reduce the bacterial load in *Drosophila melanogaster* without causing motor and/or neurological damage to the flies.

Key words: oral infection, Difenil ditelureto, *Drosophila melanogaster*, *Escherichia coli*

Graphic abstract:



1. Introduction

The use of antibiotics, since their introduction in 1940, has progressively increased, being used both as preventive measures in routine and life-saving procedures, as curative agents in case of bacterial infections (Bram Van den Bergh, 2022). In 2019, it was pointed out that about 1,27 million individuals died as a result of antibiotic resistance six pathogens were primarily responsible for more than 250,000 deaths associated with antibiotic resistance *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *K pneumoniae*, *S pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, in order of number of deaths, with *Escherichia coli* being the most responsible for deaths due to antibiotic resistance (Matharu et al., 2018; Murray et al, 2022).

Escherichia coli is an Enterobacteriaceae, the most prevalent commensal inhabitant of the gastrointestinal tract of humans, as well as one of the most important pathogens that live in mutually beneficial association with the hosts this microorganism has characteristics that facilitate its handling, providing the complete genome .Its sequence and ability to grow under both aerobic and anaerobic conditions make this bacterium an important organism in biotechnology, being used in a wide variety of applications in both industrial and medical areas (Allocati et al., 2013).

With the emergence of bacterial strains resistant to known drugs, studies that evaluate new compounds with antimicrobial properties become increasingly relevant to the academic community, there is an urgent need for new agents with new mechanisms of action against a growing list of multidrug-resistant pathogens. (Chamilos et al., 2011). In this sense, compounds such as diphenyl ditelluride (PhTe)₂, an organic derivative of tellurium, which has antioxidant, antigenotoxic, antimutagenic and anticancer properties, have become the subject of studies, as the antioxidant and pro-oxidant properties of (PhTe)₂ are complex and depend on experimental conditions, such as which experimental model is used, since in studies with microorganisms they tend to have a toxicological effect, which may explain the contradictory reports of their properties (Trintade et al., 2019). In experiments with the V79 cell line, yeast strains *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* strains exposed to different concentrations of (PhTe)₂ demonstrated the toxicological potential of this compound (Pinheiro et al., 2022; Degrandi et al., 2010 ; Jorge et al., 2015).

Recent studies with *Escherichia coli*, where the toxicological effect of (PhTe)₂ was evaluated, demonstrated that this compound has a toxicological effect on this

microorganism through the increase in the levels of reactive species, lipid peroxidation, protein carbonylation and reduction of non-protein thios, in addition to altering the expression of *soxS* and *oxyR* oxidative stress regulators, thus altering the activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase and catalase (Pinheiro et al., 2022) . Considering that studies with this compound have already demonstrated its toxicological effect on microorganisms and its molecular mechanism has already been described, in a study with *Escherichia coli*, (PhTe)₂ has become a promising agent for in vivo antimicrobial activity studies.

Therefore, several invertebrate models, including *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella*, have been developed as promising alternatives to study the pathogenesis of important drugs (Maliki et al., 2017). *Drosophila melanogaster* is a proven model organism in genetic research established as a model in experimental food and nutrition research, is suitable for nutritional intervention studies (Staats et al, 2018), as well as being a model for pathogenicity studies, offers many insights essential information on the development of cell biology and infectious diseases. (Maliki et al., 2017). Many pharmaceutical companies are using this model for drug discovery, including drugs with antimicrobial potential, and for these trials, the use of an oral infection model, via food, is considered the most appropriate to administer antimicrobial agents when long-term treatment is required (Chamilos et al., 2012). This study aims to evaluate the antimicrobial effect of (PhTe)₂, through an alternative model of bacterial oral infection of *Escherichia coli* strains in *Drosophila melanogaster*.

2. Materials and methods

2.1 Chemical

Diphenyl ditelluride (PhTe)₂ was prepared according to the method previously published by Petragani (1994) (Figure 1). The ¹H NMR and ¹³CNMR spectra analysis showed analytical and spectroscopic data in full agreement with their assigned structure; GC/HPLC determined the chemical purity of (PhTe)₂ (99.9%), which was diluted with dimethyl sulfoxide (DMSO).

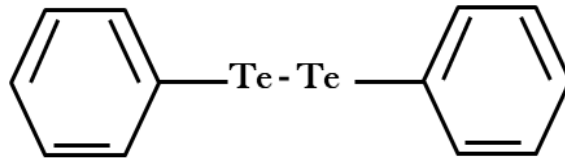


Figure 1. Chemical structure of the compound diphenyl ditelluride (PhTe)₂.

2.2 *Drosophila melanogaster* and *Escherichia coli* stock and culture

Drosophila melanogaster (Harwich strain) of the wild type was obtained from Laftambio (Unipampa, Itaqui-RS). The flies were kept in glass flasks, under controlled temperature of 25 ± 1 °C, humidity of 60–70% and circadian cycle light/dark of 12 h, fed with standard food composed of corn flour (76,59%), wheat germ (8,51%), sugar (7,23%), milk powder (7,23%), salt (0,43%) and Nipagin (antifungal)

The bacterial strain used in this study is *E. coli* BL21 (DE3) RIL (B F– ompT hsdS(rB – mB –) dcm+ Tet(r) gal endA Hte [argU ileY leuW Cam(r), from Biotechnology Center (CBiot)/ UFRGS. The strain was kept frozen in 10% glycerol until use.

2.3. Diphenyl ditelluride (PhTe)₂ safety in *Drosophila melanogaster*

To determine (PhTe)₂ safe concentrations for the study, we started with concentrations of 1, 10, 25, 50, 100 and 200 µM of the compound, diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) at 0.1% of the total volume. The different concentrations of (PhTe)₂ were mixed with 10ml of the standard diet and homogenized, two control groups were used, one without the compound (PhTe)₂ and the other control with the vehicle only (DMSO). For each group, 50 flies of both sexes kept (50% females, 50% males) were kept in standard medium, under conditions of 25 ± 1 °C, in a light:dark cycle of 12 h:12 h with ~60 % of unit. To determine the safety of the compound determined by LC₅₀ and behavioral tests were evaluated after 48 hours of exposure.

2.3.1 Survival Curve

After the start of treatment, survival counted every day until the end of the 48 hours, the diet changed every day and dead flies were discarded. Mortality rate analysis

performed at 48 hours to determine the safety of the compound. To determine the safety of the compound we determined the LC₅₀.

2.3.2 Behavioral test

Negative geotaxis test: A negative geotaxis test was performed to assess possible behavioral changes related to hyperactivity in flies, which can determine the locomotor function of flies. The test was performed with 20 flies from each experimental group, and the time required to reach the 8 cm of the tube was counted, according to Ternes et al. (2014). The test was repeated five times for each fly, and data were expressed as the average of five trials in the treatment group.

Open field test: The open field test was used to assess the locomotor activity of flies, as in the study by Kaur et al. (2015). Flies after 48 hours of treatment were kept in a 9 cm diameter arena that was divided into squares (11 cm), and the area was covered with a Petri dish. The activities and movements of the flies were timed, and the trajectory was recorded at a given time (60 s). Results are expressed as the average number of squares crossed by the group of flies. About 20 flies per group were included in this test.

2.4 Oral infection and treatment with diphenyl ditelluride

2.4.1 Bacteria preparation:

Escherichi coli strains Bl 21-DE RIL, these were kept in standard LB broth at 37° C, +/- 150rpm overnight, an aliquot was transferred to 50ml of new LB broth until reaching the OD600 0.6 – 0.8, were centrifuged at 2,500 Xg for 15 minutes at 4°C, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in a 5% sucrose water solution.

2.4.2 Preparation of the fly for exposure:

To obtain axenic flies for the study, eggs were first collected in sterile apple agar medium (1 L of distilled H₂O, 30 g of agar, 33 g of sucrose, 330 ml of apple juice and Nipagin antifungal agent) with yeast for 24 hours. Then the collected eggs were washed 3x in a 10% sodium hypochlorite solution, interspersed with washing in PBS X1 buffer.

After the cleaning and asepsis process, the eggs were transferred to flasks containing Lewis standard medium (1 L triple distilled H₂O, 6.1 g agar, 93.6 g brown sugar, 68 g maize, 18.7 g instant yeast, 10g Nipagin antifungal agent), sterile, and incubators at 25 ± 1 °C, on a 12h:12h light:dark cycle with ~60% humidity. After hatching, 2-3 day old flies were used for the experiments (Figure 2) (Siva-Jothy et al.,2018) .

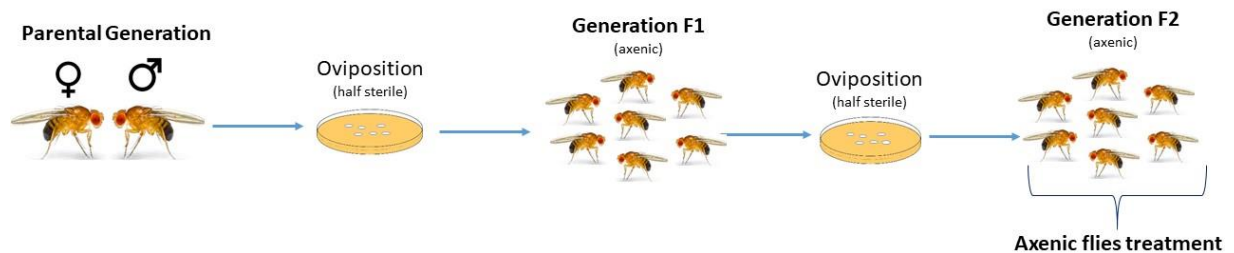


Figure 2. Experimental design of rearing axenic flies for use in the model of oral infection of *Drosophila melanogaster* by *Escherichia coli*.

2.5 Oral infection model and (PhTe)₂ treatment:

For infection, the infection model used the methodology according to Siva-Jothy et al. (2018) (Figure 2), where flies were hunger 2-4 hours before exposure to the bacteria. Sterile 40 ml Falcon vials were placed, where 500 µL of standard sugar agar was pipetted into the cap and allowed to dry, then sterile filter paper discs were placed on the agar and 100 µL of bacterial culture at OD₆₀₀ 0.5 -0.8, were pipetted directly onto filter paper. The seven flies were exposed individually and remained in contact with the bacterial solution between 18-20 hours at 25°C, in a light and dark cycle of 12h: 12h, with 60% humidity. In the control (without infection), the bacterial solution was replaced in the same volume by a 5% sucrose aqueous solution on filter paper, and incubated again at 25°C, in a light and dark cycle of 12h:12H, with 60% of moisture.

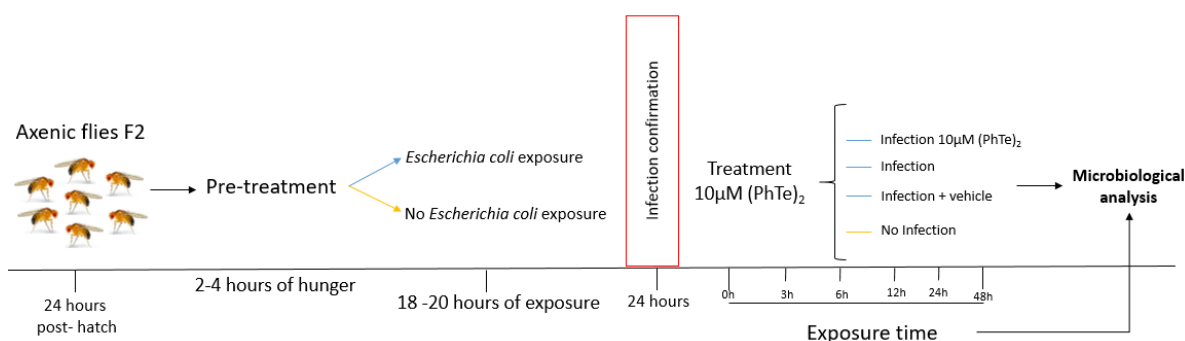


Figure 3: Experimental design of oral infection of *Drosophila melanogaster*, by *Escherichia coli* treated with Diphenyl ditelluride (PhTe)₂

At the end of the exposure time to the bacteria, a sample of two flies per group was seeded to confirm contamination. The flies were divided into four groups: 1- without infection; 2- infection + vehicle; 3- infection + 10uM (PhTe)₂; 4- infection. Each group consisted of five flies placed in flasks containing 10ml of agar (2% sucrose, 1% milk powder, 1% agar; 0.08% Nipagin). The flies were exposed to the compound during times of 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours. The experiments were performed in experimental triplicate.

After exposure to the compound, flies were washed immediately after bacterial exposure by placing them in 100 µL of 70% ethanol for +/- 20-30 s, ethanol was removed and 100 µL of distilled water was added for 20- 30 s, for washing, the washing process was done three times, the water was removed and 100 µL of 1x PBS was added and mixed. The experiments were carried out in experimental triplicate.

2.6 Microbiological analysis

The homogenate was transferred to a 96-well plate and 90µl of 1XPBS was added to each well, the samples were serially diluted, after which 5µl of each serial dilution were seeded in nutrient LB agar and subsequently incubated for 24 hours at 37°C. The number of CFU per fly was calculated by counting the number of colonies present in the serial dilution, where the number of colonies was multiplied by the dilution factor, in order to calculate the probable number of bacteria per fly. For the statistical analysis of CFUs by flies, a normal distribution was made, transforming into

Log, once this process was done, and generalized linear models were used to test the treatment groups. The experiments were carried out in experimental triplicate.

2.7 Analyze statistical

The results were verified for normality of distribution by the Shapiro-Wilk test and homogeneity by the Brown-forsythe test. Results were compared using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc for multiple comparisons. Descriptive data were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Probability values lower than 0.05 ($p < 0.05$) were considered statistically significant. All statistical analysis results were performed by the GraphPad Prism 9.1.2 program.

3 Results

3.1 Diphenyl ditelluride (PhTe)₂ safety in *Drosophila melanogaster*

To establish the safety of using the compound (PhTe)₂, the 50% lethal concentration (LC₅₀) was determined based on the mortality rate using the same time interval as the mortality curve. After analyzing the results, we can observe in figure 4, that in the time of 48 hours the LC₅₀ of the compound was 44,12 μ M, this result demonstrates that the concentration of 10 μ M of (PhTe)₂ is safe for the *Drosophila melanogaster* model, as this value represents approximately 1/4 of the LC₅₀ in the 48 hours of exposure.

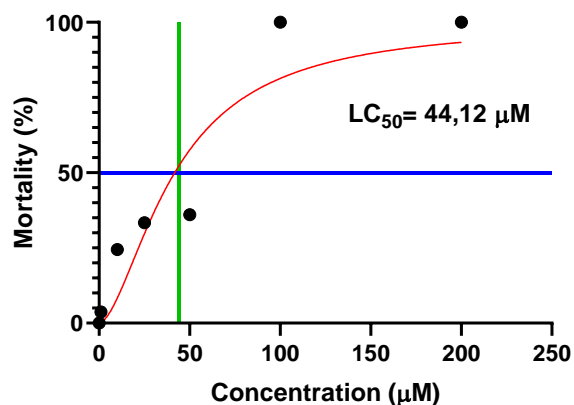


Figure 4. Determination of LC₅₀ of (PhTe)₂: Analysis of the lethal concentration of the compound that can cause 50% of deaths during exposure of flies to different concentrations (1, 10, 25, 50, 100 and 200 µM) of (PhTe)₂, within 48 hours. A logarithmic curve of bacterial load was constructed to demonstrate the antimicrobial effect of the compound. The mean and SE of each time point are calculated from 5 subjects, in experimental triplicate (p < 0.0001).

3.2 Evaluation of (PhTe)₂ effect on behavior of *Drosophila melanogaster*

Behavioral tests of negative geotaxis and in open field were performed in order to determine the safety of the compound (PhTe)₂. The tests were performed in experimental triplicate, the results are shown in Figure 5 (A and B) negative geotaxis test and open field respectively. In the negative geotaxis test, no significant difference was observed in relation to the control in the tested concentrations (Figure 5-A), which demonstrates that no alteration occurred in relation to locomotor function of the flies. Regarding the open field test (Figure 5-B), we observed that the concentrations of 50, 100 and 200µM significantly reduced the exploratory capacity of the flies, when compared to the control (*) and the DMSO vehicle (#). Behavioral tests were performed after 48 hours of exposure to concentrations of 1, 10, 25, 50, 100 and 200 µM compound.

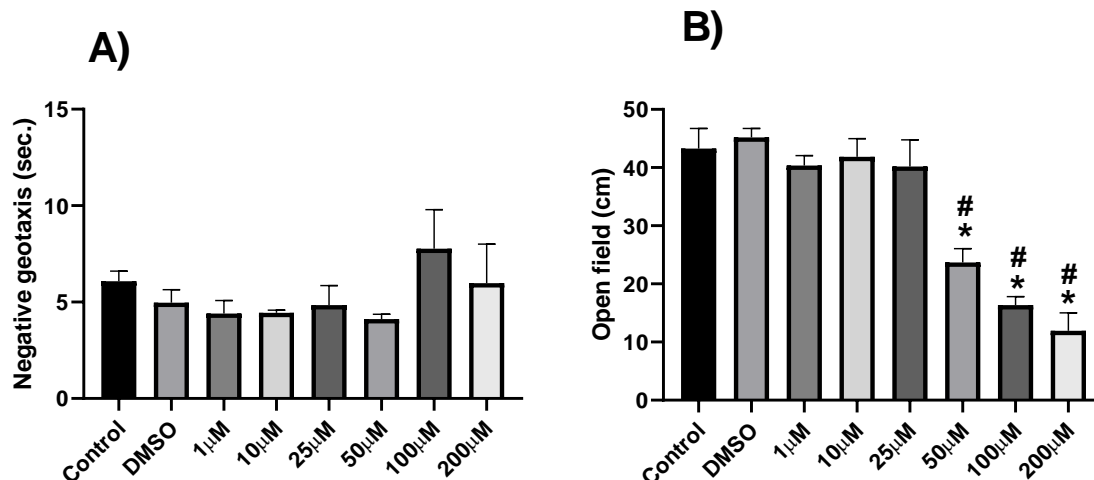


Figure 5. Assessment of physical and behavioral changes after exposure to (PhTe)₂. Behavioral test results, after exposure to 10 μM to (PhTe)₂, for 48 hours. Negative geotaxis (A) and open field (B). We used 20 adult flies (3-5 days old), male and female. The statistical analysis used was one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. * indicates different from the control and # indicates different from DMSO. Statistical difference was considered P<0.05.

3.3 Antimicrobial effect of (PhTe)₂ in a model of oral infection in *Drosophila melanogaster*

After determining the safety of (PhTe)₂ at a concentration of 10 μM, we evaluated the antimicrobial potential of the compound through an oral infection model, the results are shown in figure 6 (A). To quantify the bacterial load, the CFUs per fly were calculated from the number of colonies present in the lowest possible dilution to count the visible colonies, then the number of CFUs was multiplied by the present dilution factor, and thus we obtained the number of CFUs. For the statistical analysis and construction of the logarithmic curve, the CFUs of each fly were log-transformed. As a result, we obtained a curve of Log₁₀ per CFU/fly, where we can observe that the flies treated with 10 μM of (PhTe)₂ had a significant reduction in the bacterial load over the exposure time, when compared to the infection group and in the group infection+vehicle. For each experiment, 5 flies were used per group, the experiments were performed in triplicate.

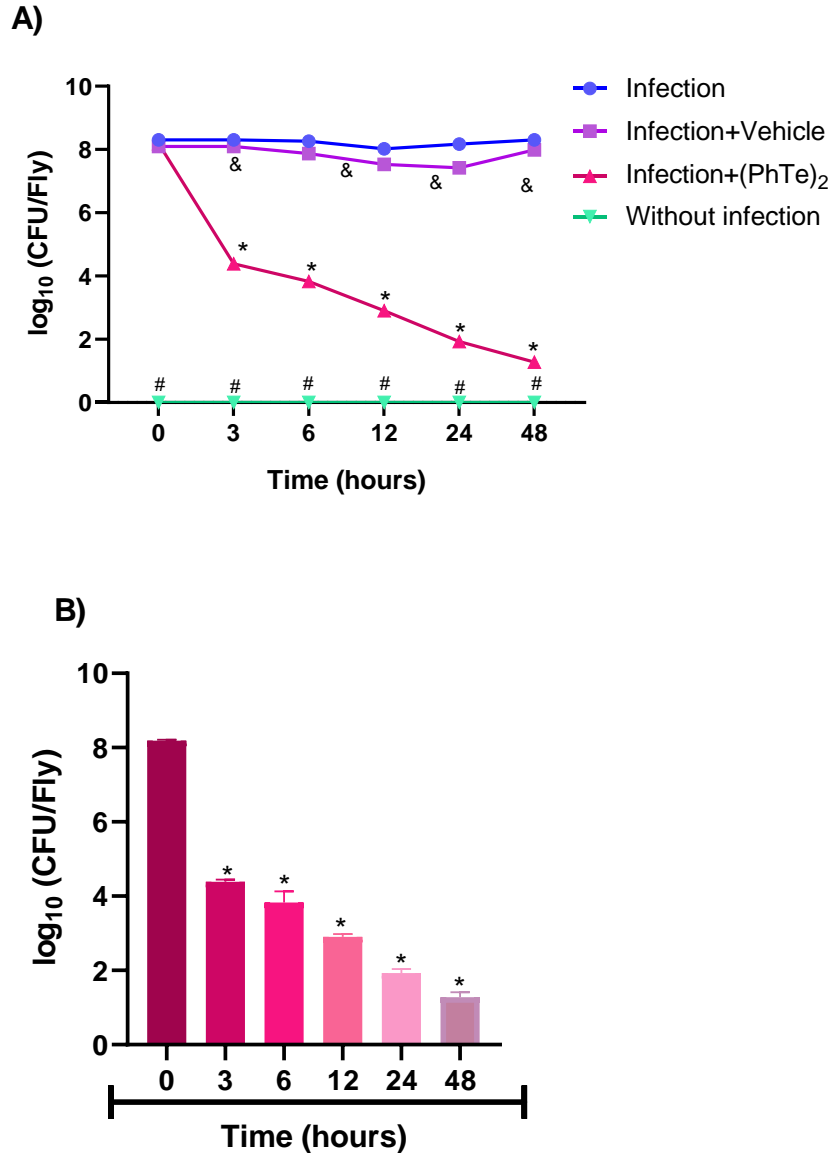


Figure 6. Antimicrobial effect of (PhTe)₂ in a model of oral infection in *Drosophila melanogaster*. (A) Internal load of *Escherichia coli* in flies after oral infection and treatment with 10μM (PhTe)₂. Mean ± SE bacterial load of 1-2 day old female and male flies after 48 hours of infection with *Escherichia coli* (OD600 = 0.8) and treatment as (PhTe)₂ at times of 0.3,6, 12 and 24 hours post-infection. (B) Comparison of treated and control groups after 48 hours of treatment. The mean and SE of each time point are calculated from 5 subjects, in experimental triplicate (p < 0.0001).

(A) *Significant difference compared with the infection, infection+vehicle and without infection groups; &Significant difference compared with the infection, infection+(PhTe)₂ and without infection groups; #Significant difference compared with the infection, infection+vehicle and infection+(PhTe)₂ groups;

(B) *Difference between the group and the control

In figure 6 (B), we can see the effect of 10μM of (PhTe)₂ throughout the entire exposure time, it can be seen that this concentration is capable of reducing the bacterial load proportionally to the exposure time, starting from the time of 3 hours of exposure

to the compound.

4. Discussion

In this study, the use of axenic *Drosophila melanogaster* as a model of oral *Escherichia coli* infection was explored, with the central objective of evaluating the antimicrobial effect of (PhTe)₂ in an alternative animal model, observing the bacterial load, in order to determine the antimicrobial potential of the compound. Firstly, we determined the safety of the compound in the *Drosophila melanogaster* model, evaluating behavioral tests of negative geotaxis, open field and lethal concentration.

Our LC₅₀ result in the maximum time of 48 hours of exposure to the compound was 44,12 µM of (PhTe)₂, this result determined the concentration of 10 µM of the compound to be used in the other phases of the study, since this concentration is well below the LC₅₀ at 48 hours. In studies toxicological capacity of (PhTe)₂ in vitro in yeast strains *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* strains exposed to different concentrations of (PhTe)₂ demonstrated the toxicological potential, at different concentrations (Pinheiro et al., 2022; Degrandi et al., 2010; Jorge et al., 2015). We can say that the compound (PhTe)₂ is safe for *Drosophila melanogaster* at a concentration of 10 µM, although it shows toxicity in in vitro studies with microorganisms with concentrations of up to 100 µM and in animal cells it shows toxicity at concentrations between 5 and 10 µM (Degrandi et al., 2010) in our study com an animal model in *Drosophila melanogaster* concentration of the study is low and does not cause toxicological effects capable of altering the physical integrity of the flies.

Our results showed that there were no changes in the behavior of the flies during the climbing time in the negative geotaxis test, in all tested concentrations when compared to the control group, this test is carried out in order to verify the effects of the compound on the physical integrity of the flies, presumed from their locomotor behavior (Fedele et al., 2014). Open field test, corroborates with the evaluation of the physical integrity of the flies (Prut and Belzung, 2003) in our findings we observed that the lowest concentrations (1.10 and 25 µM) did not cause significant alterations when compared to our control group however, at the highest concentrations (50, 100 and 200µM) of the compound we can observe a decline in the exploratory activities of the flies. Based on our results, we can determine that at low concentrations of 1,10 and 25

μM of $(\text{PhTe})_2$, it does not present toxicity, maintaining the physical integrity of the flies.

$(\text{PhTe})_2$ is an organic tellurium compound, with contrasting chemical properties (Pessoa-Pureur et al., 2014). Studies have demonstrated its dose-dependent toxicological potential, showing potential neurotoxicity, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity (Pessoa-Pureur et al., 2014; Degrandi et al., 2010; Trindade et al., 2019; Heimfartha et al., 2017; Bueno et al., 2017; Bueno et al., 2010; Trindade et al., 2019; al., 2013). In a recently published study, it was shown that $(\text{PhTe})_2$ has a toxicological effect on a strain of *Escherichia coli* (Pinheiro et al., 2022). In view of the findings of our study, we showed that the compound has no harmful effect in the *Drosophila melanogaster* model, based on previous studies we observed that this compound has a toxicological effect on microorganisms, so we performed the model of oral infection in *Drosophila melanogaster* with axenic flies.

The use of alternative animal models, such as the fruit fly, has been widely used in studies to evaluate drug-microorganism interactions, since studies with vertebrate animal models are very laborious and expensive (Bram Van den Bergh, 2022; Chamilos, Samonis and Kontoyiannis, 2011). The main objective of this study was to evaluate the potential antimicrobial effect of $(\text{PhTe})_2$. Our results in Figure 6 demonstrate the toxicological effect of the compound on *Escherichia coli* strains we can observe that during the period of exposure the bacterial load was progressively regressing during the periods of time in the treatment group and remained constant in the control group.

This study demonstrated that the model of infection in *Drosophila melanogaster* orally is valid for screening studies of agents with antimicrobial potential it should be noted that the pharmaceutical industry has demonstrated that the use of this alternative, low cost and high profitability model, are effective and tend to be used more and more in research. The results of the microbiological evaluation demonstrate that $(\text{PhTe})_2$ has antimicrobial potential at a concentration of $10\mu\text{M}$, as it is capable of reducing the bacterial load, that is, causing damage to the bacteria, without causing damage to the model.

$(\text{PhTe})_2$ is described as a contrasting organotelluric compound of interest in biological activities, which includes its antioxidant properties and pharmacological potential, but its toxicological properties are expressive (Pessoa-Pureur et al., 2014). The toxicological potential of this compound is associated with its ability to oxidize –

SH groups of important biomolecules (Puntel et al., 2013a; Trindade et al., 2019). The toxicity of (PhTe)₂ is associated with its pro-oxidant potential, through the increase in the production of reactive species, signaling the expression of genes that regulate oxidative stress in *Escherichia coli* soxS and oxyR (Pinheiro et al., 2021). The exposure of flies to 10µM (PhTe)₂ did not result in physical and locomotor alteration of the flies, and this concentration is well below the LC₅₀=44,12 µM, for the proposed exposure times, demonstrating that the compound at this study dose does not cause toxicity to flies, but it is able to significantly reduce the bacterial load of axenic flies exposed to oral contamination by *Escherichia coli*.

Notes from 2019 estimate that 1.27 million individuals died as a result of antibiotic resistance, among the six most relevant pathogens is *Escherichia coli*, which is identified as responsible for the majority of deaths in 2019, due to antibiotic resistance (Murray et al, 2022). Faced with studies like this, there is a need for research that seeks new alternative drugs for use in resistant microorganisms in a study recently published by our research group we showed that (PhTe)₂ has a toxicological effect on *Escherichia coli* strains, associated with its pro-oxidant potential (Pinheiro et al., 2022). From this study, (PhTe)₂ can be considered a potential target of studies as an antimicrobial drug.

Conclusion

This study is unprecedented, as it demonstrated that 10µM of (PhTe)₂ proved to be effective in controlling bacterial load in an oral infection model without causing toxicity to *Drosophila melanogaster*. Based on these findings, and with previous studies we can place the (PhTe)₂ as an organotelluric compound with antimicrobial, bacteriostatic and bacteriostatic properties. More tests can be carried out to elucidate the effect of (PhTe)₂ in the *Drosophila melanogaster* model, as well as the use of a superior model, to determine the antimicrobial effect of the compound

Referencial Bibliográfico

Aradská, J., Šmidák, R., Turkovičová, L., Turňa, J., Lubec, G., 2013. Proteomic differences between tellurite-sensitive and tellurite-resistant E.coli. PLoS One 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078010>

- Arenas, F.A., Pugin, B., Henríquez, N.A., Arenas-Salinas, M.A., Díaz-Vásquez, W.A., Pozo, M.F., Muñoz, C.M., Chasteen, T.G., Pérez-Donoso, J.M., Vásquez, C.C., 2014. Isolation, identification and characterization of highly tellurite-resistant, tellurite-reducing bacteria from Antarctica. *Polar Sci.* 8, 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2014.01.001>
- Ba, L.A., Döring, M., Jamier, V., Jacob, C., 2010. Tellurium: An element with great biological potency and potential. *Org. Biomol. Chem.* 8, 4203–4216. <https://doi.org/10.1039/c0ob000086h>
- Baez, A., Shiloach, J., 2013. *Escherichia coli* avoids high dissolved oxygen stress by activation of SoxRS and manganese-superoxide dismutase. *Microb. Cell Fact.* 12, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-23>
- Barbosa, E.B., Vidotto, A., Polachini, G.M., Henrique, T., Trovó de Marqui, A.B., Tajara, E.H., 2012. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 58, 366–375. <https://doi.org/10.1590/s0104-42302012000300019>
- Bortoli, M., Tiezza, M.D., Muraro, C., Saielli, G., Orian, L., 2019. The ¹²⁵Te chemical shift of diphenyl ditelluride: Chasing conformers over a flat energy surface. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24071250>
- Brito, V.B., Rocha, J.B.T., Folmer, V., Erthal, F., 2009. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice. *Acta Biochim. Pol.* 56, 125–134. https://doi.org/10.18388/abp.2009_2524
- Brynildsen, M.P., Winkler, J.A., Spina, C.S., MacDonald, I.C., Collins, J.J., 2013. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. *Nat. Biotechnol.* 31, 160–165. <https://doi.org/10.1038/nbt.2458>
- Caeran Bueno, D., Meinerz, D.F., Allebrandt, J., Waczuk, E.P., Dos Santos, D.B., Mariano, D.O.C., Rocha, J.B.T., 2013. Cytotoxicity and genotoxicity evaluation of organochalcogens in human leucocytes: A comparative study between ebselen, diphenyl diselenide, and diphenyl ditelluride. *Biomed Res. Int.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/537279>
- Calderón, I.L., Elías, A.O., Fuentes, E.L., Pradenas, G.A., Castro, M.E., Arenas, F.A., Pérez, J.M., Vásquez, C.C., 2009. Tellurite-mediated disabling of [4Fe-4S] clusters of *Escherichia coli* dehydratases. *Microbiology* 155, 1840–1846. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026260-0>
- Chasteen, T.G., Fuentes, D.E., Tantaleán, J.C., Vásquez, C.C., 2009. Tellurite: History, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance: Review article. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 820–832. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00177.x>
- Chiang, S.M., Schellhorn, H.E., 2012a. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 525, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.007>
- Chiang, S.M., Schellhorn, H.E., 2012b. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch. Biochem.*

- Biophys. 525, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.007>
- Choi, H., Yang, Z., Weisshaar, J.C., 2015. Single-cell, real-time detection of oxidative stress induced in *Escherichia coli* by the antimicrobial peptide CM15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E303–E310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417703112>
- Cunha, R.L.O.R., Gouvea, I.E., Juliano, L., 2009. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. *An. Acad. Bras. Cienc.* 81, 393–407. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652009000300006>
- de Ávila, D.S., Beque, M.C., Folmer, V., Braga, A.L., Zeni, G., Nogueira, C.W., Soares, F.A.A., Rocha, J.B.T., 2006. Diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate: An organotellurium compound with low toxicity. *Toxicology* 224, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.04.027>
- Degrandi, T.H., De Oliveira, I.M., D’Almeida, G.S., Garcia, C.R.L., Villela, I.V., Guecheva, T.N., Rosa, R.M., Henriques, J.A.P., 2010a. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 25, 257–269. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq002>
- Degrandi, T.H., De Oliveira, I.M., D’Almeida, G.S., Garcia, C.R.L., Villela, I.V., Guecheva, T.N., Rosa, R.M., Henriques, J.A.P., 2010b. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 25, 257–269. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq002>
- Díaz-Vásquez, W.A., Abarca-Lagunas, M.J., Arenas, F.A., Pinto, C.A., Cornejo, F.A., Wansapura, P.T., Appuhamillage, G.A., Chasteen, T.G., Vásquez, C.C., 2014. Tellurite reduction by *Escherichia coli* NDH-II dehydrogenase results in superoxide production in membranes of toxicant-exposed cells. *BioMetals* 27, 237–246. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9701-8>
- Díaz-Vásquez, W.A., Abarca-Lagunas, M.J., Cornejo, F.A., Pinto, C.A., Arenas, F.A., Vásquez, C.C., 2015. Tellurite-mediated damage to the *Escherichia coli* NDH-dehydrogenases and terminal oxidases in aerobic conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* 566, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.10.011>
- Elías, A., Díaz-Vásquez, W., Abarca-Lagunas, M.J., Chasteen, T.G., Arenas, F., Vásquez, C.C., 2015. The ActP acetate transporter acts prior to the PitA phosphate carrier in tellurite uptake by *Escherichia coli*. *Microbiol. Res.* 177, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.04.010>
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., Collet, J.F., 2017. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 385–396. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>
- Heimfarth, L., da Silva Ferreira, F., Pierozan, P., Mingori, M.R., Moreira, J.C.F., da Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2017. Astrocyte-neuron interaction in diphenyl ditelluride toxicity directed to the cytoskeleton. *Toxicology* 379, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.01.015>
- Heimfarth, L., Loureiro, S.O., Dutra, M.F., Andrade, C., Pettenuzzo, L., Guma,

- F.T.C.R., Gonçalves, C.A.S., da Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2012. In vivo treatment with diphenyl ditelluride induces neurodegeneration in striatum of young rats: Implications of MAPK and Akt pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.025>
- Heimfarth, L., Loureiro, S.O., Zamoner, A., Pelaez, P. de L., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T. da, Pessoa-Pureur, R., 2008. Effects of in vivo treatment with diphenyl ditelluride on the phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex and hippocampus of rats. *Neurotoxicology* 29, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.08.012>
- Ibrahim, M., Hassan, W., Anwar, J., Nogueira, C.W., Teixeira Rocha, J.B., 2012. Fe(II) and sodium nitroprusside induce oxidative stress: A comparative study of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride with their naphthyl analog. *Drug Chem. Toxicol.* 35, 48–56. <https://doi.org/10.3109/01480545.2011.588711>
- Imlay, J.A., 2013. The oxidative stress : lessons from a model bacterium, *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>.The
- Jorge, P.M., de Oliveira, I.M., Filippi Chiela, E.C., Viau, C.M., Saffi, J., Horn, F., Rosa, R.M., Guecheva, T.N., Pêgas Henriques, J.A., 2015. Diphenyl ditelluride-induced cell cycle arrest and apoptosis: A relation with topoisomerase I inhibition. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 116, 273–280. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12315>
- Kashmiri, Z.N., Mankar, S.A., 2014. Free radicals and oxidative stress in bacteria. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 3, 34–40.
- Li, W., Zhang, S., Wang, X., Yu, J., Li, Z., Lin, W., Lin, X., 2018. Systematically integrated metabonomic-proteomic studies of *Escherichia coli* under ciprofloxacin stress. *J. Proteomics* 179, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.002>
- Martindale, J.L., Holbrook, N.J., 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192, 1–15. <https://doi.org/10.1002/jcp.10119>
- Matharu, R.K., Charani, Z., Ciric, L., Illangakoon, U.E., Edirisinghe, M., 2018. Antimicrobial activity of tellurium-loaded polymeric fiber meshes. *J. Appl. Polym. Sci.* 135, 1–7. <https://doi.org/10.1002/app.46368>
- Meinerz, D.F., Allebrandt, J., Mariano, D.O.C., Waczuk, E.P., Soares, F.A., Hassan, W., Rocha, J.B.T., 2014. Differential genotoxicity of diphenyl diselenide (PhSe)₂ and diphenyl ditelluride (phte)₂. *PeerJ* 2014, 1–11. <https://doi.org/10.7717/peerj.290>
- Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Perry, M.L., Souza, D.O., Teixeira da Rocha, J.B., 2001. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res.* 906, 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02165-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02165-5)
- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104, 6255–6285. <https://doi.org/10.1021/cr0406559>
- Ogra, Y., 2017. Biology and toxicology of tellurium explored by speciation analysis.

Metallomics 9, 435–441. <https://doi.org/10.1039/c7mt00022g>

- Pérez, J.M., Calderón, I.L., Arenas, F.A., Fuentes, D.E., Pradenas, G.A., Fuentes, E.L., Sandoval, J.M., Castro, M.E., Elías, A.O., Vásquez, C.C., 2007. Bacterial toxicity of potassium tellurite: Unveiling an ancient enigma. *PLoS One* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000211>
- Pessoa-Pureur, R., Heimfarth, L., Rocha, J.B., 2014. Signaling mechanisms and disrupted cytoskeleton in the diphenyl ditelluride neurotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/458601>
- Pinheiro, F.C., Bortolotto, V.C., Araujo, S.M., Poetini, M.R., Sehn, C.P., Neto, J.S.S., Zeni, G., Prigol, M., 2018. Antimicrobial effect of 2-phenylethynyl-butyltellurium in *Escherichia coli* and its association with oxidative stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1209–1216. <https://doi.org/10.4014/jmb.1802.12074>
- Pinton, S., Luchese, C., Curte Stangherlin, E., Wayne Nogueira, C., 2011. Acute exposure to diphenyl ditelluride causes oxidative damage in rat lungs. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.031>
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Puntel, R.L., Roos, D.H., Seeger, R.L., Rocha, J.B.T., 2013a. Mitochondrial electron transfer chain complexes inhibition by different organochalcogens. *Toxicol. Vitro.* 27, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.011>
- Puntel, R.L., Roos, D.H., Seeger, R.L., Rocha, J.B.T., 2013b. Mitochondrial electron transfer chain complexes inhibition by different organochalcogens. *Toxicol. Vitro.* 27, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.011>
- Quines, C.B., Da Rocha, J.T., Sampaio, T.B., Pesarico, A.P., Neto, J.S.S., Zeni, G., Nogueira, C.W., 2015. Involvement of the serotonergic system in the anxiolytic-like effect of 2-phenylethynyl butyltellurium in mice. *Behav. Brain Res.* 277, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.071>
- Reinoso, C.A., Auger, C., Appanna, V.D., Vásquez, C.C., 2012. Tellurite-exposed *Escherichia coli* exhibits increased intracellular α -ketoglutarate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 721–726. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.069>
- Roman, S.S., Nava, A., Favero, A.M., Weis, S.N., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2007. Diphenyl ditelluride effect on embryo/fetal development in mice: Interspecies differences. *Toxicology* 231, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.070>
- Rossato, J.I., Ketzer, L.A., Centurião, F.B., Silva, S.J.N., Lüdtke, D.S., Zeni, G., Braga, A.L., Rubin, M.A., Da Rocha, J.B.T., 2002. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* 27, 297–303. <https://doi.org/10.1023/A:1014907228580>
- Rosseti, I.B., Wagner, C., Fachineto, R., Taube Junior, P., Costa, M.S., 2011. *Candida albicans* growth and germ tube formation can be inhibited by simple diphenyl diselenides [(PhSe)₂, (MeOPhSe)₂, (p-Cl-PhSe)₂, (F₃CPhSe)₂] and diphenyl

ditelluride. *Mycoses* 54, 506–513. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01888.x>

- Sandoval, J.M., Arenas, F.A., García, J.A., Díaz-Vásquez, W.A., Valdivia-González, M., Sabotier, M., Vásquez, C.C., 2015. *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydrogenase aids in tellurite resistance by reducing the toxicant in a NADPH-dependent manner. *Microbiol. Res.* 177, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.002>
- Sandoval, J.M., Arenas, F.A., Vásquez, C.C., 2011. Glucose-6-phosphate dehydrogenase protects *Escherichia coli* from tellurite-mediated oxidative stress. *PLoS One* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025573>
- Schiar, V.P.P., dos Santos, D.B., Paixão, M.W., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., Zeni, G., 2009. Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: A possible involvement of reactive oxygen species. *Chem. Biol. Interact.* 177, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.007>
- Stangherlin, E.C., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2009. Diphenyl ditelluride impairs short-term memory and alters neurochemical parameters in young rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 91, 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.08.020>
- Storz, G., Imlay, J.A., n.d. Oxidative stress Gisela Storz * and James A Imlay ? *Curr. Opin. Microbiol.* 188–194.
- Trindade, C., Juchem, A.L.M., Guecheva, T.N., De Oliveira, I.M., Dos Santos Silveira, P., Vargas, J.E., Puga, R., Pessoa, C., Henriques, J.A.P., 2019. Diphenyl Ditelluride: Redox-Modulating and Antiproliferative Properties. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2510936>
- Turner, R.J., Weiner, J.H., Taylor, D.E., 1999. Tellurite-mediated thiol oxidation in *Escherichia coli*. *Microbiology* 145, 2549–2557. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2549>
- Valdivia-González, M., Pérez-Donoso, J.M., Vásquez, C.C., 2012. Effect of tellurite-mediated oxidative stress on the *Escherichia coli* glycolytic pathway. *BioMetals* 25, 451–458. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9518-x>
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L., 1996. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13, 19–50. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>
- Zeni, G., Formiga, H.B., Comasseto, J. V., 2000. Improved procedure for the hydrotelluration of alkynes. *Tetrahedron Lett.* 41, 1311–1313. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(99\)02297-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)02297-2)
- Zheng, M., Storz, G., 1998. Was Deter- 279, 11–14.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., 2001. DNA Microarray-Mediated Transcriptional Profiling of the *J. Bacteriol.* 183, 4562–4570. <https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4562>

8. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo central avaliar os alvos moleculares do composto ditelureto de difenila (PhTe)₂ em células de *Escherichia coli*, a fim de elucidar a expressão gênica e os reguladores da resposta ao estresse oxidativo, decorrentes da exposição das células ao composto, bem como investigar o efeito antimicrobiano do (PhTe)₂, através de modelo alternativo de infecção oral por *Escherichia coli* em *Drosophila melanogaster*.

O composto alvo deste estudo é o ditelureto de difenila (PhTe)₂, que tem sido descrito como contrastante e de interesse em atividades biológicas, que inclui suas propriedades antioxidantes e potencial farmacológico, porém suas propriedades toxicológicas são expressivas (Pessoa-Pureur et al., 2014; Degrandi et al., 2010; Heimfarth et al., 2017) em estudos toxicológicos tem demonstrado seus efeitos potencialmente citotóxicos e mutagênicos em ensaios com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, cepas de *Salmonella typhimurium* e células V79 (Degrandi et al., 2010; Jorge et al., 2015); e efeitos genotóxicos e neurotóxico em estudos com camundongos demonstrou potencial mutagênico (Meinerz et al., 2014; Caeran Bueno et al., 2013; Heimfarth et al., 2017, 2012, 2008), tendo o efeito toxicológico associado a oxidação de grupamento -SH de moléculas biologicamente importantes.

O ponto de partida deste estudo foi avaliar os efeitos do (PhTe)₂ em células bacterianas de *Escherichia coli*, nos alvos moleculares, determinando os marcadores de estresse oxidativo intra e extracelular; a expressão dos reguladores da resposta ao estresse oxidativo *soxS* e *oxyR*, e os genes de defesa antioxidante *katG*, *sodA*, *sodB* e *gnd*; o impacto da exposição ao (PhTe)₂ sobre a atividades das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase e determinar concentrações do (PhTe)₂ capazes de causar efeito bactericida e bacteriostático.

Os resultados desta primeira etapa, demonstraram que o potencial efeito toxicológico do (PhTe)₂ está associado aos efeitos pró-oxidantes deste, a regulação desse processo, em resultados a expressão de *soxS* foi reprimida nas concentrações avaliadas e a expressão de *oxyR* foi induzida nas concentrações de 6 e 12 µg/mL, e expressão diminuída na concentração mais alta. Estudos demonstram que a regulação do *soxS* é pela oxidação dos clusters (2Fe-2S), e permanece em níveis baixos na ausência de oxidação do regulon *soxR*. A regulação do *oxyR* ocorre através da oxidação dos grupos -SH do *oxyR* transcricional e confere ao sistema uma capacidade auto-reguladora

durante o estresse oxidativo (Pomposiello e Demple, 2001). Os achados deste estudo trazem a compreensão que a resposta global ao estresse oxidativo foi caracterizada por uma regulação negativa transitória de genes envolvidos no metabolismo geral, e uma regulação positiva do sistema de defesa, desta forma como resultado da exposição aguda ao (PhTe)₂, ocorreu uma desregulação do sistema de resposta e de defesa antioxidante, impossibilitando uma resposta protetora a célula bacteriana.

No primeiro artigo a exposição de cepas de *Escherichia coli* ao (PhTe)₂, resultou no aumento da atividade das enzimas de defesa antioxidante superóxido dismutase e catalase, e elevou o nível de peroxidação lipídica e de carbonilação de proteínas, além dos níveis de ER tanto a nível intracelular como extracelular. A exposição também foi capaz de reduzir em ~55% os níveis de tiol não proteico, nas células bacterianas. Ao conectar o potencial toxicológico do (PhTe)₂ com a produção excessiva de espécies reativas e danos oxidativos a lipídios e proteínas, sugerimos que a toxicidade desse composto afeta a resposta de regulação gênica ao estresse oxidativo e defesa antioxidante, levando à morte celular bacteriana. Neste estudo sugeriu-se que os efeitos tóxicos do (PhTe)₂ se devam à sua atividade pró-oxidante, que desregula a expressão do sistema de resposta ao estresse oxidativo, tornando-o ineficaz a ponto de não reverter o dano oxidativo.

Após determinar o mecanismo toxicológico de (PhTe)₂ em células bacterianas de *Escherichia coli*, na primeira parte do estudo, avaliou-se um possível efeito antimicrobiano, utilizando modelo alternativo de infecção oral por *Escherichia coli* em *Drosophila melanogaster*. O uso de modelos animais alternativos, ao invés de modelos animais tradicionais como camundongos, ratos e outros mamíferos que tendem a ser demorados e com custos mais elevados. Cabe ainda a ressalva sobre as questões éticas envolvidas no uso destes modelos, assim o uso de modelos alternativos busca reduzir não só o tempo de pesquisa e seu custo, mas também, preocupações éticas com o sofrimento animal (Göethel et.al, 2022).

Muitas empresas farmacêuticas e de biotecnologia estão usando cada vez mais modelos de mini hospedeiros com a *Drosophila melanogaster*, para a descoberta de medicamentos. Em experimentos usando as moscas como modelo de infecção, o patógeno de interesse pode ser inoculado por diferentes métodos, como o método de agulhamento, onde o inóculo é injetado no tórax dorsal usando agulhas, ou utilizando métodos mais fisiológicos de infecção com o método de rolamento e o método oral, através da alimentação. O método de infecção oral, por alimentação é considerado o

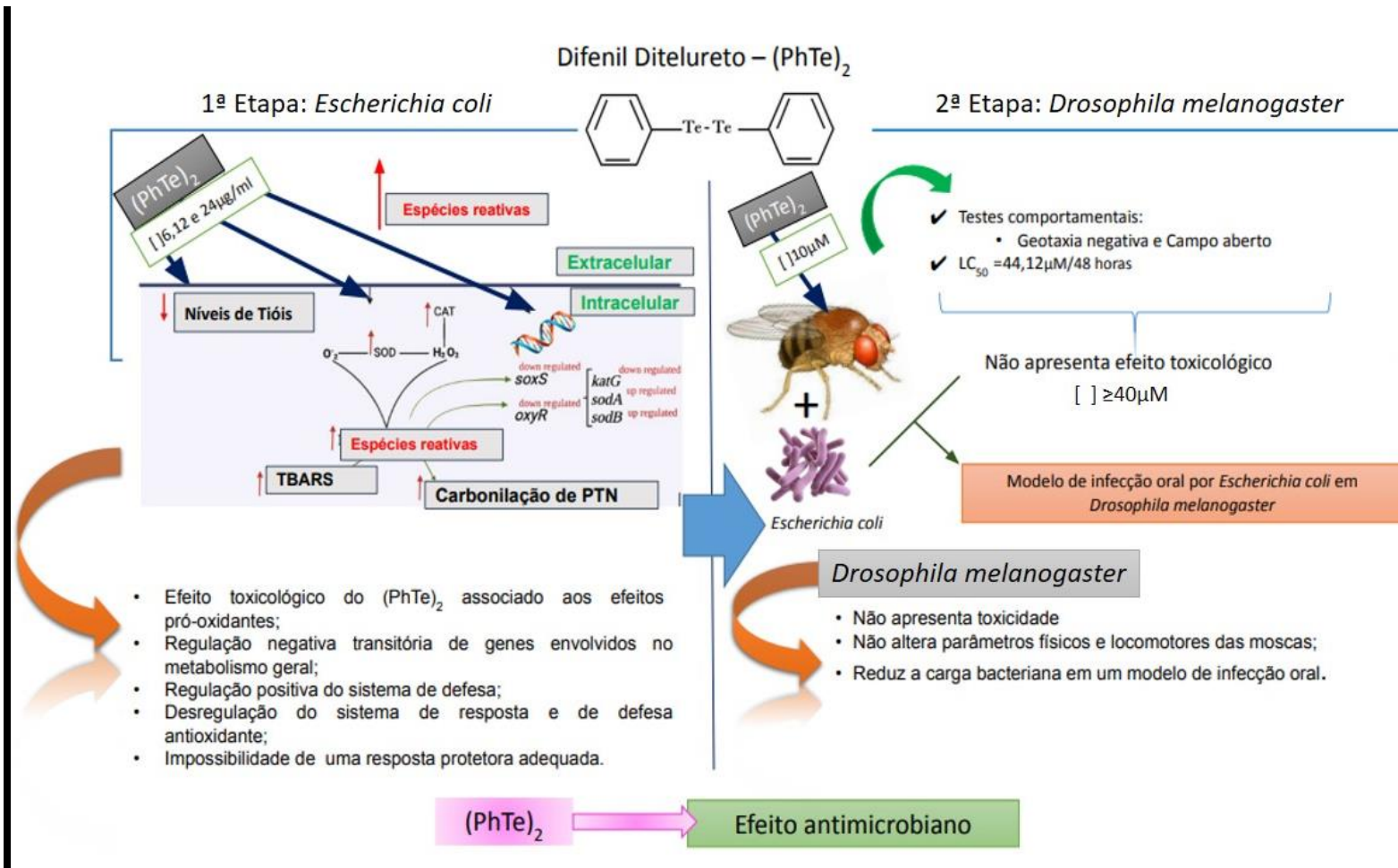
mais adequado para administrar agentes antimicrobianos quando é necessário um tratamento de longo prazo (Chamilos et al., 2012).

Os achados demonstraram que o $(\text{PhTe})_2$ é seguro para o uso no modelo alternativo animal sugerido no estudo, uma vez que não demonstrou causar toxicidade na concentração e tempo de exposição do estudo. Os resultados com a dose de $10\mu\text{M}$ de $(\text{PhTe})_2$ não alteraram o estado físico ou locomotor das moscas, parâmetro que nos indica a segurança do uso, e está bem abaixo da $\text{LC}_{50}=44,12\mu\text{M}$ para o tempo máximo de 48 horas de exposição. O uso deste modelo de infecção, por via oral, demonstrou ser válido, para este tipo de estudo, pois ao avaliar a carga bacteriana ao longo tempo de exposição, é notável a diminuição significativa dos níveis de carga bacteriana, nas moscas expostas ao composto e ao inóculo. Cabe ressaltar que a dose de $10\mu\text{M}$ é a abaixo da LC_{50} , o que nos dá segurança para colocar o $(\text{PhTe})_2$ como um potencial agente antimicrobiano.

A avaliação do efeito antimicrobiano do $(\text{PhTe})_2$ neste estudo, é positiva, a concentração de exposição reduzir a carga de bactérias a partir do tempo de 3 horas, e de acordo com os dados apresentados, pode-se observar que o número de colônias diminui progressivamente ao tempo de exposição, chegando a zerar ao final de 48 horas de exposição. Este resultado é empolgante e possibilita acrescer as potencialidades do $(\text{PhTe})_2$ a efeito antimicrobiano, comprovado por modelo de alternativo em animal.

As etapas deste estudo elucidaram o mecanismo de ação do $(\text{PhTe})_2$ em células bacterianas e seu potencial antimicrobiano (Figura 15), na primeira etapa do estudo e de modo pioneiro determinamos as vias de expressão gênica em resposta ao estresse oxidativo decorrente da exposição de cepas de *Escherichia coli* ao composto, o que levou segunda etapa deste estudo, que foi determinar o potencial antimicrobiano do $(\text{PhTe})_2$, em modelo animal alternativo de infecção oral em *Drosophila melanogaster*, diante dos resultados deste estudo, sugere-se que o $(\text{PhTe})_2$ tem potencial antimicrobiano comprovado e que seu mecanismo de ação é através do aumento da produção de espécies reativas e alteração dos mecanismos de reparo dos danos oxidativos, nas células bacterianas.

Figura 15 - Esquema resumo do estudo de mecanismos moleculares de toxicidade do ditelureto de difenila (PhTe)₂ em cepas de *Escherichia coli* e potencial antimicrobiano em modelo um infecção em *Drosophila melanogaster*



Fonte: Arquivo próprio

9. CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos através de nossos estudos, podemos concluir que:

- O composto ditelureto de difenila (PhTe)₂ altera a expressão dos reguladores do estresse oxidativo *soxS* e *oxyR*; aumenta os níveis e estresse oxidativo, diminui os níveis de tiois não proteicos, altera a expressão dos genes *sodA*, *sodB* e *katG*, bem como a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), além de aumentar a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, em cepas de *Escherichia coli*, demonstrando que este composto tem potencial de causar graves danos oxidativos, levando a morte bacteriana;
- Este estudo demonstrou o potencial bactericida (12µg/ml) e bacteriostático (6µg/ml) do (PhTe)₂, além de demonstrar seu potencial toxicológico associado ao seu efeito pro-oxidante em *Escherichia coli*;
- Ao final deste estudo demonstramos que uso do (PhTe)₂ na concentração de 10µM é segura e eficaz para estudos de infecção oral em *Drosophila melanogaster*, demonstrando que o uso deste é válido e promissor;
- Por fim este estudo foi capaz de demonstrar o potencial efeito antimicrobiano do (PhTe)₂, e elucidar os mecanismos moleculares de expressão gênica de resposta ao estresse oxidativo do (PhTe)₂

10. PERSPECTIVAS

Este estudo possibilitou elucidar os mecanismos de ação do (PhTe)₂ e apontá-lo como promissor agente antimicrobiano. Acreditamos que devemos ir além deste estudo e buscar compreender o mecanismo que envolve a interação hospedeiro–fármaco-microrganismo. Para tal sugerimos novas etapas, onde, buscaremos esclarecer de que forma o (PhTe)₂ age durante a exposição das moscas, reduzindo a carga bacteriana e não causando danos as mesmas.

Em uma primeira etapa elucidaremos se os mecanismos de defesa das moscas foram alterados, possibilitando ampla defesa contra microrganismo invasor, através de análises bioquímicas de quantificação de parâmetros de estresse oxidativo, como espécies reativas (RS), TBARs, atividade enzimática (SOD, CAT e GST), carbonilação de proteínas, tióis não proteicos. E analisar os parâmetros comportamentais, a fim de determinar algum possível dano decorrente desta interação.

Em uma segunda etapa buscaremos determinar o envolvimento do estresse oxidativo na resposta das moscas a exposição ao (PhTe)₂, avaliando parâmetros moleculares. Nosso intuito seria elucidar de que modo o composto atua em um modelo animal e quais são seus efeitos tanto modelo com no microrganismo invasor.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- Aradská, J., Šmidák, R., Turkovičová, L., Turňa, J., Lubec, G., 2013. Proteomic differences between tellurite-sensitive and tellurite-resistant E.coli. PLoS One 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078010>
- Arenas, F.A., Pugin, B., Henríquez, N.A., Arenas-Salinas, M.A., Díaz-Vásquez, W.A., Pozo, M.F., Muñoz, C.M., Chasteen, T.G., Pérez-Donoso, J.M., Vásquez, C.C., 2014. Isolation, identification and characterization of highly tellurite-resistant, tellurite-reducing bacteria from Antarctica. Polar Sci. 8, 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2014.01.001>
- Ba, L.A., Döring, M., Jamier, V., Jacob, C., 2010. Tellurium: An element with great biological potency and potential. Org. Biomol. Chem. 8, 4203–4216. <https://doi.org/10.1039/c0ob00086h>
- Baez, A., Shiloach, J., 2013. Escherichia coli avoids high dissolved oxygen stress by activation of SoxRS and manganese-superoxide dismutase. Microb. Cell Fact. 12, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-23>
- Barbosa, E.B., Vidotto, A., Polachini, G.M., Henrique, T., Trovó de Marqui, A.B., Tajara, E.H., 2012. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. Rev. Assoc. Med. Bras. 58, 366–375. <https://doi.org/10.1590/s0104-42302012000300019>
- Blount, Z.D., 2015. The unexhausted potential of E. coli. Elife 4, 1–12. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Bortoli, M., Tiezza, M.D., Muraro, C., Saielli, G., Orian, L., 2019. The ¹²⁵Te chemical shift of diphenyl ditelluride: Chasing conformers over a flat energy surface. Molecules 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24071250>
- Brito, V.B., Rocha, J.B.T., Folmer, V., Erthal, F., 2009. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice. Acta Biochim. Pol. 56, 125–134. https://doi.org/10.18388/abp.2009_2524
- Brynildsen, M.P., Winkler, J.A., Spina, C.S., MacDonald, I.C., Collins, J.J., 2013. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. Nat. Biotechnol. 31, 160–165. <https://doi.org/10.1038/nbt.2458>
- Caeran Bueno, D., Meinerz, D.F., Allebrandt, J., Waczuk, E.P., Dos Santos, D.B., Mariano, D.O.C., Rocha, J.B.T., 2013. Cytotoxicity and genotoxicity evaluation of organochalcogens in human leucocytes: A comparative study between ebselen, diphenyl diselenide, and diphenyl ditelluride. Biomed Res. Int. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/537279>
- Calderón, I.L., Elías, A.O., Fuentes, E.L., Pradenas, G.A., Castro, M.E., Arenas, F.A.,

- Pérez, J.M., Vásquez, C.C., 2009. Tellurite-mediated disabling of [4Fe-4S] clusters of *Escherichia coli* dehydratases. *Microbiology* 155, 1840–1846. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026260-0>
- Chasteen, T.G., Fuentes, D.E., Tantaleán, J.C., Vásquez, C.C., 2009. Tellurite: History, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance: Review article. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 820–832. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00177.x>
- Chiang, S.M., Schellhorn, H.E., 2012a. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 525, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.007>
- Chiang, S.M., Schellhorn, H.E., 2012b. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 525, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.007>
- Choi, H., Yang, Z., Weisshaar, J.C., 2015. Single-cell, real-time detection of oxidative stress induced in *Escherichia coli* by the antimicrobial peptide CM15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E303–E310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417703112>
- Cunha, R.L.O.R., Gouvea, I.E., Juliano, L., 2009. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. *An. Acad. Bras. Cienc.* 81, 393–407. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652009000300006>
- de Ávila, D.S., Beque, M.C., Folmer, V., Braga, A.L., Zeni, G., Nogueira, C.W., Soares, F.A.A., Rocha, J.B.T., 2006. Diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate: An organotellurium compound with low toxicity. *Toxicology* 224, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.04.027>
- Degrandi, T.H., De Oliveira, I.M., D’Almeida, G.S., Garcia, C.R.L., Villela, I.V., Guecheva, T.N., Rosa, R.M., Henriques, J.A.P., 2010a. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 25, 257–269. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq002>
- Degrandi, T.H., De Oliveira, I.M., D’Almeida, G.S., Garcia, C.R.L., Villela, I.V., Guecheva, T.N., Rosa, R.M., Henriques, J.A.P., 2010b. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis* 25, 257–269. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq002>
- Díaz-Vásquez, W.A., Abarca-Lagunas, M.J., Arenas, F.A., Pinto, C.A., Cornejo, F.A., Wansapura, P.T., Appuhamillage, G.A., Chasteen, T.G., Vásquez, C.C., 2014. Tellurite reduction by *Escherichia coli* NDH-II dehydrogenase results in superoxide production in membranes of toxicant-exposed cells. *BioMetals* 27, 237–246. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9701-8>
- Díaz-Vásquez, W.A., Abarca-Lagunas, M.J., Cornejo, F.A., Pinto, C.A., Arenas, F.A., Vásquez, C.C., 2015. Tellurite-mediated damage to the *Escherichia coli* NDH-dehydrogenases and terminal oxidases in aerobic conditions. *Arch. Biochem.*

- Biophys. 566, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.10.011>
- Elías, A., Díaz-Vásquez, W., Abarca-Lagunas, M.J., Chasteen, T.G., Arenas, F., Vásquez, C.C., 2015. The ActP acetate transporter acts prior to the PitA phosphate carrier in tellurite uptake by *Escherichia coli*. *Microbiol. Res.* 177, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.04.010>
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., Collet, J.F., 2017. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 385–396. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>
- Heimfarth, L., da Silva Ferreira, F., Pierozan, P., Mingori, M.R., Moreira, J.C.F., da Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2017. Astrocyte-neuron interaction in diphenyl ditelluride toxicity directed to the cytoskeleton. *Toxicology* 379, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.01.015>
- Heimfarth, L., Loureiro, S.O., Dutra, M.F., Andrade, C., Pettenuzzo, L., Guma, F.T.C.R., Gonçalves, C.A.S., da Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2012. In vivo treatment with diphenyl ditelluride induces neurodegeneration in striatum of young rats: Implications of MAPK and Akt pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.025>
- Heimfarth, L., Loureiro, S.O., Zamoner, A., Pelaez, P. de L., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T. da, Pessoa-Pureur, R., 2008. Effects of in vivo treatment with diphenyl ditelluride on the phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex and hippocampus of rats. *Neurotoxicology* 29, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.08.012>
- Ibrahim, M., Hassan, W., Anwar, J., Nogueira, C.W., Teixeira Rocha, J.B., 2012. Fe(II) and sodium nitroprusside induce oxidative stress: A comparative study of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride with their naphthyl analog. *Drug Chem. Toxicol.* 35, 48–56. <https://doi.org/10.3109/01480545.2011.588711>
- Imlay, J.A., 2013. The oxidative stress : lessons from a model bacterium, *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>. [The](https://doi.org/10.1038/nrmicro3032)
- Jorge, P.M., de Oliveira, I.M., Filippi Chiela, E.C., Viau, C.M., Saffi, J., Horn, F., Rosa, R.M., Guecheva, T.N., Pêgas Henriques, J.A., 2015. Diphenyl ditelluride-induced cell cycle arrest and apoptosis: A relation with topoisomerase I inhibition. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 116, 273–280. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12315>
- Kashmiri, Z.N., Mankar, S.A., 2014. Free radicals and oxidative stress in bacteria. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 3, 34–40.
- Li, W., Zhang, S., Wang, X., Yu, J., Li, Z., Lin, W., Lin, X., 2018. Systematically integrated metabolomic-proteomic studies of *Escherichia coli* under ciprofloxacin stress. *J. Proteomics* 179, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.002>
- Martindale, J.L., Holbrook, N.J., 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192, 1–15.

<https://doi.org/10.1002/jcp.10119>

- Matharu, R.K., Charani, Z., Ciric, L., Illangakoon, U.E., Edirisinghe, M., 2018. Antimicrobial activity of tellurium-loaded polymeric fiber meshes. *J. Appl. Polym. Sci.* 135, 1–7. <https://doi.org/10.1002/app.46368>
- Meinerz, D.F., Allebrandt, J., Mariano, D.O.C., Waczuk, E.P., Soares, F.A., Hassan, W., Rocha, J.B.T., 2014. Differential genotoxicity of diphenyl diselenide (PhSe)₂ and diphenyl ditelluride (phte)₂. *PeerJ* 2014, 1–11. <https://doi.org/10.7717/peerj.290>
- Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Perry, M.L., Souza, D.O., Teixeira da Rocha, J.B., 2001. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res.* 906, 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02165-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02165-5)
- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104, 6255–6285. <https://doi.org/10.1021/cr0406559>
- Ogra, Y., 2017. Biology and toxicology of tellurium explored by speciation analysis. *Metallomics* 9, 435–441. <https://doi.org/10.1039/c7mt00022g>
- Pérez, J.M., Calderón, I.L., Arenas, F.A., Fuentes, D.E., Pradenas, G.A., Fuentes, E.L., Sandoval, J.M., Castro, M.E., Elías, A.O., Vásquez, C.C., 2007. Bacterial toxicity of potassium tellurite: Unveiling an ancient enigma. *PLoS One* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000211>
- Pessoa-Pureur, R., Heimfarth, L., Rocha, J.B., 2014. Signaling mechanisms and disrupted cytoskeleton in the diphenyl ditelluride neurotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/458601>
- Pinheiro, F.C., Bortolotto, V.C., Araujo, S.M., Poetini, M.R., Sehn, C.P., Neto, J.S.S., Zeni, G., Prigol, M., 2018. Antimicrobial effect of 2-phenylethynyl-butyltellurium in *Escherichia coli* and its association with oxidative stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1209–1216. <https://doi.org/10.4014/jmb.1802.12074>
- Pinton, S., Luchese, C., Curte Stangherlin, E., Wayne Nogueira, C., 2011. Acute exposure to diphenyl ditelluride causes oxidative damage in rat lungs. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.031>
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Puntel, R.L., Roos, D.H., Seeger, R.L., Rocha, J.B.T., 2013a. Mitochondrial electron transfer chain complexes inhibition by different organochalcogens. *Toxicol. Vitro* 27, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.011>
- Puntel, R.L., Roos, D.H., Seeger, R.L., Rocha, J.B.T., 2013b. Mitochondrial electron

- transfer chain complexes inhibition by different organochalcogens. *Toxicol. Vitro*. 27, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.011>
- Quines, C.B., Da Rocha, J.T., Sampaio, T.B., Pesarico, A.P., Neto, J.S.S., Zeni, G., Nogueira, C.W., 2015. Involvement of the serotonergic system in the anxiolytic-like effect of 2-phenylethynyl butyltellurium in mice. *Behav. Brain Res.* 277, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.071>
- Reinoso, C.A., Auger, C., Appanna, V.D., Vásquez, C.C., 2012. Tellurite-exposed *Escherichia coli* exhibits increased intracellular α -ketoglutarate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 721–726. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.069>
- Roman, S.S., Nava, A., Favero, A.M., Weis, S.N., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2007. Diphenyl ditelluride effect on embryo/fetal development in mice: Interspecies differences. *Toxicology* 231, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.070>
- Rossato, J.I., Ketzer, L.A., Centurião, F.B., Silva, S.J.N., Lüdtke, D.S., Zeni, G., Braga, A.L., Rubin, M.A., Da Rocha, J.B.T., 2002. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* 27, 297–303. <https://doi.org/10.1023/A:1014907228580>
- Rosseti, I.B., Wagner, C., Fachineto, R., Taube Junior, P., Costa, M.S., 2011. *Candida albicans* growth and germ tube formation can be inhibited by simple diphenyl diselenides [(PhSe)₂, (MeOPhSe)₂, (p-Cl-PhSe)₂, (F 3CPhSe)₂] and diphenyl ditelluride. *Mycoses* 54, 506–513. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01888.x>
- Sandoval, J.M., Arenas, F.A., García, J.A., Díaz-Vásquez, W.A., Valdivia-González, M., Sabotier, M., Vásquez, C.C., 2015. *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydrogenase aids in tellurite resistance by reducing the toxicant in a NADPH-dependent manner. *Microbiol. Res.* 177, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.002>
- Sandoval, J.M., Arenas, F.A., Vásquez, C.C., 2011. Glucose-6-phosphate dehydrogenase protects *Escherichia coli* from tellurite-mediated oxidative stress. *PLoS One* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025573>
- Schiar, V.P.P., dos Santos, D.B., Paixão, M.W., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., Zeni, G., 2009. Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: A possible involvement of reactive oxygen species. *Chem. Biol. Interact.* 177, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.007>
- Stangherlin, E.C., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2009. Diphenyl ditelluride impairs short-term memory and alters neurochemical parameters in young rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 91, 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.08.020>
- Storz, G., Imlay, J.A., n.d. Oxidative stress Gisela Storz * and James A Imlay ? *Curr. Opin. Microbiol.* 188–194.

- Trindade, C., Juchem, A.L.M., Guecheva, T.N., De Oliveira, I.M., Dos Santos Silveira, P., Vargas, J.E., Puga, R., Pessoa, C., Henriques, J.A.P., 2019. Diphenyl Ditelluride: Redox-Modulating and Antiproliferative Properties. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2510936>
- Turner, R.J., Weiner, J.H., Taylor, D.E., 1999. Tellurite-mediated thiol oxidation in *Escherichia coli*. *Microbiology* 145, 2549–2557. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2549>
- Valdivia-González, M., Pérez-Donoso, J.M., Vásquez, C.C., 2012. Effect of tellurite-mediated oxidative stress on the *Escherichia coli* glycolytic pathway. *BioMetals* 25, 451–458. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9518-x>
- Wang, J., Ma, W., Wang, X., 2021. Insights into the structure of *Escherichia coli* outer membrane as the target for engineering microbial cell factories. *Microb. Cell Fact.* 20, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01565-8>
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L., 1996. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13, 19–50. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>
- Zeni, G., Formiga, H.B., Comasseto, J. V., 2000. Improved procedure for the hydrotelluration of alkynes. *Tetrahedron Lett.* 41, 1311–1313. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(99\)02297-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)02297-2)
- Zheng, M., Storz, G., 1998. Was Deter- 279, 11–14.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., 2001. DNA Microarray-Mediated Transcriptional Profiling of the. *J. Bacteriol.* 183, 4562–4570. <https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4562>