

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

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PROTEÇÃO DO  
DISSELENETO DE DIFENILA SOBRE A  
TOXICIDADE INDUZIDA POR METILMERCÚRIO  
EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Fabricio Luís Lovato**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PROTEÇÃO DO  
DISSELENETO DE DIFENILA SOBRE A TOXICIDADE  
INDUZIDA POR METILMERCÚRIO EM *SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE***

**Fabricio Luís Lovato**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Lenz Dalla Corte**  
**Co-orientador: Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha**

**Santa Maria, RS, Brasil**  
**2015**

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

Lovato, Fabricio Luís  
Mecanismos envolvidos na proteção do disseleneto de difenila sobre a toxicidade induzida por metilmercúrio em *Saccharomyces cerevisiae* / Fabricio Luís Lovato.-2015.  
87 p.; 30cm

Orientadora: Cristiane Lenz Dalla Corte  
Coorientador: João Batista Teixeira da Rocha  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2015

1. Disseleneto de difenila 2. Metilmercúrio 3. Estresse Oxidativo 4. Leveduras 5. Defesas antioxidantes  
I. Lenz Dalla Corte, Cristiane II. Teixeira da Rocha, João Batista III. Título.

Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica

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

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PROTEÇÃO DO  
DISSELENETO DE DIFENILA SOBRE A TOXICIDADE  
INDUZIDA POR METILMERCÚRIO EM *SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE***

Elaborada por  
**FABRICIO LUÍS LOVATO**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**Comissão Examinadora**

*Cristiane Lenz Dalla Corte*

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr.<sup>a</sup> Cristiane Lenz Dalla Corte (Orientadora)

*João Batista Teixeira da Rocha*

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha (Co-orientador)

*Denis Broock Rosenberg*

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Denis Broock Rosenberg (UFSM)

*Jenifer Saffi*

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr.<sup>a</sup> Jenifer Saffi (UFCSPA)

Santa Maria, 14 de dezembro de 2015.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, toda a honra e glória.

Aos meus pais, Aldo e Maria, e ao meu irmão Geovane.

À minha noiva Émilie, pela compreensão, carinho, apoio e motivação constantes ao longo de todo o mestrado. Você sempre me disse as palavras certas nos momentos necessários.

À minha orientadora Cristiane, pela paciência, dedicação e aprendizado. Sua orientação dada ao longo desses dois anos foi essencial.

Ao meu co-orientador João Batista, por ter me recebido tão afetuosamente para trabalhar em seu laboratório, pelas conversas e explicações que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os colegas que passaram pelo Laboratório de Bioquímica Toxicológica nesses dois anos. O trabalho foi mais divertido com vocês.

Aos colegas do Laboratório da Professora Nilda, pelas conversas, amizade e conhecimento compartilhado.

Aos meus bons amigos que sempre se preocuparam e me perguntaram: ‘E como está indo o mestrado?’.

À Universidade Federal de Santa Maria, que já tem me permitido até aqui a honra de cursar o ensino médio, a graduação e o mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, coordenação, professores e demais funcionários.

À CAPES e demais agências de fomento, pela bolsa de estudos concedida e suporte financeiro durante a realização deste trabalho.

Aos professores da banca, que se dispuseram à leitura desta dissertação e à composição da banca examinadora.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu chegasse até aqui, os meus mais sinceros agradecimentos.

“Vocês sabem, lá no fundo do coração e da alma, que nenhuma das boas promessas que o Senhor, o seu Deus, lhes fez deixou de cumprir-se. Todas se cumpriram; nenhuma delas  
falhou.”  
(Josué 23.14)

## RESUMO

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

### **Mecanismos envolvidos na proteção do disseleneto de difenila sobre a toxicidade induzida por metilmercúrio em *Saccharomyces cerevisiae***

AUTOR: Fabricio Luís Lovato  
ORIENTADORA: Cristiane Lenz Dalla Corte  
CO-ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha  
LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 14 de dezembro de 2015.

Os seres humanos normalmente são expostos à forma orgânica do Hg, o cátion organometálico metilmercúrio ( $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$ , MeHg), através da alimentação com peixes e frutos do mar. Os efeitos neurotóxicos do MeHg já são amplamente conhecidos. Indivíduos expostos a altas concentrações desse composto apresentaram distúrbios sensoriais nas mãos e pés, disfunção auditiva e visual, fraqueza e, em casos extremos, paralisia e morte. Embora os mecanismos exatos subjacentes à toxicidade do MeHg ainda não estejam totalmente elucidados, há evidências de que o estresse oxidativo desempenha um papel central nesse processo. O composto orgânico derivado do selênio, disseleneto de difenila  $[(\text{PhSe})_2]$  é um intermediário sintético eletrofílico simples na síntese de vários compostos orgânicos de interesse farmacológico contendo selênio, tendo apresentado as propriedades antioxidante, anti-nociceptiva, anti-inflamatória, antihiperlipidêmica, antiteratogênica, entre outras. O objetivo principal deste trabalho foi investigar alguns mecanismos envolvidos no efeito protetor do  $(\text{PhSe})_2$  sobre a toxicidade induzida por MeHg, utilizando cepas selvagem e *knockout* de *Saccharomyces cerevisiae* para diferentes enzimas e proteínas ligadas ao sistema de defesa antioxidante. Utilizando-se dessas linhagens, bem como diferentes concentrações de  $(\text{PhSe})_2$  e/ou MeHg, os objetivos específicos desse trabalho foram: i) avaliar a inibição do crescimento; ii) quantificar a produção de espécies reativas do oxigênio; iii) avaliar a permeabilidade das membranas celulares; iv) quantificar o conteúdo intracelular de GSH. O presente estudo lança luz sobre os mecanismos envolvidos na proteção do disseleneto de difenila contra o MeHg indicando o envolvimento do sistema de defesa antioxidante de *S. cerevisiae* e o sequestro de Hg na proteção do  $(\text{PhSe})_2$ . O composto disseleneto de difenila protege contra a toxicidade induzida pelo metilmercúrio, conforme observou-se na recuperação do crescimento e menores índices de espécies reativas de oxigênio, permeabilidade de membrana e restauração do conteúdo intracelular de GSH, em leveduras tratadas com ambos os compostos. O efeito protetor desencadeado pelo disseleneto de difenila parece estar relacionado com a ativação de algumas enzimas do sistema antioxidante das leveduras. Nem todas as enzimas antioxidantes analisadas tiveram a mesma participação ou importância no mecanismo de proteção. A similaridade funcional e genética entre células de leveduras e de mamíferos sugere que a elucidação desses mecanismos ajudará a direcionar a pesquisa para humanos.

**Palavras-chave:** Metilmercúrio. Disseleneto de difenila. *Saccharomyces cerevisiae*. Estresse Oxidativo. Defesas antioxidantes.

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Graduating Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **Mechanisms involved in the action of diphenyl diselenide on methylmercury-induced toxicity in *Saccharomyces cerevisiae***

AUTHOR: Fabricio Luís Lovato  
ADVISOR: Cristiane Lenz Dalla-Corte  
CO-ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha  
PLACE AND DATE OF THE DEFENSE: Santa Maria, 14<sup>th</sup> December, 2015.

Humans are usually exposed to organic form of mercury, the organometallic cation methylmercury ( $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$ , MeHg), by eating fish and seafood. The neurotoxic effects of MeHg are already widely known. Individuals exposed to high concentrations of this compound showed sensory disorders in the hands and feet, hearing and visual impairment, weakness and, in extreme cases, paralysis and death. Although the exact mechanisms underlying the toxicity of MeHg are not yet completely understood, there is evidence that oxidative stress plays a central role. The organic compound derived from selenium, diphenyl diselenide  $[(\text{PhSe})_2]$  is a simple electrophilic synthetic intermediate in the synthesis of various organic compounds of pharmaceutical interest containing selenium and have already presented antioxidant, anti-nociceptive, anti-inflammatory, antihyperglycemic, antitumorogenic, among others properties. The aim of this study was to investigate some mechanisms involved in the protective effect of  $(\text{PhSe})_2$  on the toxicity induced by MeHg, using wild and knockout strains of *S. cerevisiae* for different enzymes and proteins linked to the antioxidant defense system. Using these strains, as well as different concentrations  $(\text{PhSe})_2$  and/or MeHg, the specific objectives of this study were: i) to evaluate the growth inhibition; ii) to quantify the production of reactive oxygen species; iii) to evaluate the permeability of cell membranes; iv) to quantify the intracellular GSH content. This study sheds light on the mechanisms involved in the protection of diphenyl diselenide against MeHg indicating the involvement of the antioxidant defense system of *S. cerevisiae* and the sequestering of Hg in  $(\text{PhSe})_2$  protection. The compound diphenyl diselenide protects against the toxicity induced by methylmercury, as noted in the recovery of growth and lower levels of reactive oxygen species, membrane permeability and restoration of intracellular GSH content in yeasts treated with both compounds. The protective effect triggered by diphenyl diselenide seems to be related with the activation of some enzymes of antioxidant system of yeasts. Not all analyzed antioxidant enzymes had the same participation or importance in the protection mechanism. Functional and genetic similarities between yeast and mammalian cells suggests that the elucidation of these mechanisms will help direct the search to human.

**Key-words:** Methylmercury. Diphenyl diselenide. *Saccharomyces cerevisiae*. Oxidative stress. Antioxidant defenses.



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Descrição das cepas de leveduras knockout utilizadas.....	24
--	----

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Processo de metilação do Mercúrio.....	4
Figura 2 – Estrutura tridimensional do Metilmercúrio.....	5
Figura 3 – Reação do MeHg com uma proteína genérica contendo tiol (PSH)....	6
Figura 4 – Reação do MeHg com uma proteína genérica contendo selenol (PSeH).....	10
Figura 5 – Disseleneto de difenila reduz a toxicidade do MeHg através de sua redução a fenil selenolato.....	11
Figura 6 – Mecanismo catalítico para a ação antioxidante do disseleneto de difenila.....	12
Figura 7 – Estrutura planar do Disseleneto de Difenila.....	13
Figura 8 – Leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	15

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT = Catalase Peroxissomal

CMFDA = 5-chloromethylfluorescein diacetate

CTT = Catalase Citosólica

DMSO = Dimetilsulfóxido

(PhSe)<sub>2</sub> = Disseleneto de Difenila

EROs = Espécies Reativas de Oxigênio

GPx = Glutaciona Peroxidase

GSH = Glutaciona Reduzida

GSSH = Glutaciona Oxidada

GST = Glutaciona S-Transferase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Peróxido de Hidrogênio

Hg = Mercúrio

MeHg = Metilmercúrio

OD<sub>600</sub> = Densidade óptica no comprimento de onda 600 nm

PBS = Tampão Fosfato-Salino ou Phosphate Buffered Saline

PI = Iodeto de Propídio

Se = Selênio

SH = Sulfidril

SOD = Superóxido Dismutase

Trx = Tiorredoxina

TrxR = Tiorredoxina Redutase

YPD = Yeast Extract Peptone Dextrose

WT = Wild Type / Linhagem Selvagem

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	IV
<b>EPÍGRAFE</b> .....	V
<b>RESUMO</b> .....	VI
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	VIII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	X
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 Mercúrio (Hg).....	3
2.2 Metilmercúrio (MeHg).....	4
2.3 Estresse Oxidativo.....	6
2.4 Selênio (Se).....	8
2.5 Disseleneto de Difenila [(PhSe) <sub>2</sub> ].....	10
2.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	13
2.7 Os sistemas de defesa das leveduras.....	15
2.7.1 O fator de transcrição YAP1.....	16
2.7.2 YBP1 (Proteína de ligação a Yap1).....	16
2.7.3 GC sintetase e Glutathiona sintetase (GSH1 e GSH2).....	17
2.7.4 Glutathiona S-transferases (GSTs).....	18
2.7.5 Superóxido Dismutases (SODs).....	19
2.7.6 Catalases (CAT e CTT).....	20
2.7.7 Glutathiona peroxidases (GPx).....	21
2.7.8 Tiorredoxinas (TRx).....	22
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	26
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	70
<b>6. PERSPECTIVAS</b> .....	71
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	72

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções **Materiais e Métodos**, **Resultados**, **Discussão dos Resultados** e **Referências Bibliográficas**, encontram-se no **ARTIGO CIENTÍFICO** e representam a íntegra deste estudo.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** desta dissertação.

## 1 INTRODUÇÃO

O elemento químico Mercúrio (Hg) pode se apresentar como mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ), em formas inorgânicas (mercuroso –  $\text{Hg}_2^{++}$  ou mercúrico –  $\text{Hg}_2^+$ ) ou formas orgânicas (principalmente compostos alquila). Essas diferentes espécies de Hg diferem entre si com respeito ao seu comportamento no ambiente e interação com processos biológicos (Syversen & Kaur, 2012). Diferenças de toxicidade há muito são observadas entre as formas orgânicas e inorgânicas de Hg (Roderer, 1983), com as formas orgânicas apresentando maior toxicidade. Todas as formas de Hg no ambiente representam um risco real para a intoxicação humana, pois a metilação de Hg a metilmercúrio (MeHg) por microrganismos dos sedimentos em cursos de água pode resultar na acumulação deste na cadeia alimentar aquática, com o consumo de peixe representando uma fonte comum para a exposição humana (Aschner et al., 2007).

Os seres humanos normalmente são expostos à forma orgânica do Hg, o cátion organometálico metilmercúrio ( $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$ , sigla MeHg), através da alimentação com peixes e frutos do mar, uma vez que todas as formas de peixe contêm pelo menos vestígios de MeHg (Ralston et al., 2008), sendo este consumo um risco principalmente para mulheres antes e durante a gravidez. MeHg possui uma forte afinidade com grupos –SH (Hughes, 1957; Rabenstein, 1973), atuando em diversos alvos moleculares, o que contribui para uma distribuição uniforme do composto no organismo, após uma exposição a longo prazo (Syversen & Kaur, 2012).

Os mecanismos de toxicidade do MeHg, bem como os mecanismos de proteção celular, continuam pouco compreendidos. Embora os mecanismos exatos subjacentes à toxicidade do MeHg ainda não estejam totalmente elucidados, há evidências de que o estresse oxidativo desempenha um papel central nesse processo, o qual pode estar relacionado, ao menos em parte, à alta afinidade do MeHg por tióis endógenos (Farina et al., 2011; Mori et al., 2007).

A eficácia de diferentes agentes e nutrientes para prevenir ou reverter a toxicidade do MeHg tem sido investigada. Entre estes, estão compostos contendo selênio. O elemento selênio (Se) é um nutriente essencial para seres humanos e animais (Zheng & Ouyang, 2001). Na espécie humana, o Se entra na composição de 25 selenoproteínas, as quais desempenham um papel importante ao nível celular em muitos processos metabólicos (Kryukov et al., 2003).

O composto orgânico derivado do Se, disseleneto de difenila  $[(\text{PhSe})_2]$  é um intermediário sintético eletrofílico simples na síntese de vários compostos orgânicos de interesse farmacológico contendo selênio (Moreira et al., 2005). Já apresentou as propriedades

antioxidante, anti-nociceptiva, anti-inflamatória, antihiperlicêmica, antiteratogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiúlcera, antidepressiva e ansiolítica (Glaser et al., 2013; Nogueira et al., 2004; Rosa et al., 2007b; Rosa et al., 2007d), sendo, inclusive, vários desses efeitos superiores para o  $(\text{PhSe})_2$  do que para o composto ebselen (Nogueira et al., 2004).

Vários fatores tornam as leveduras modelos ideais para a realização de estudos de natureza toxicológica, a fim de avaliar potenciais mecanismos celulares e moleculares de toxicidade. As leveduras são micro-organismos eucarióticos, pertencentes ao reino dos fungos (Kurtzman e Fell, 2006), sendo também os primeiros organismos eucarióticos a terem o seu genoma completamente sequenciado, em 1996 (Goffeau et al., 1996). Células de leveduras geram EROs da mesma forma que células de organismos mamíferos e expressam muitas das mesmas defesas antioxidantes (Jamieson, 1998).

Os efeitos tóxicos do MeHg são possivelmente causados pelo estresse oxidativo mediado por MeHg, e o composto  $(\text{PhSe})_2$  pode atenuar essa toxicidade por meio de dois mecanismos: através da formação de complexo com o MeHg e através da modulação do estresse oxidativo (Freitas et al., 2009). O objetivo do presente estudo foi buscar uma maior compreensão sobre os mecanismos associados à capacidade do  $(\text{PhSe})_2$  em atenuar a toxicidade induzida por MeHg, utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mercúrio (Hg)

O mercúrio (Hg), com número atômico 80, é um elemento químico metálico de importância global. Grandes quantidades desse poluente já foram lançadas no meio ambiente por processos naturais ou devido a atividades antropogênicas, tais como o tratamento de sementes, mineração, obturações dentárias e a síntese de conservantes para vacinas (Counter & Buchanan, 2004). Todos estamos sujeitos à sua exposição por via aérea ou pela água e alimentos que ingerimos (Syversen & Kaur, 2012). Seus efeitos sobre a saúde humana e os ecossistemas são de grande preocupação (Kiyono et al., 2011), visto que é listado pelo International Program of Chemical Safety como um dos produtos químicos mais perigosos presentes no ambiente (Gilbert & Grant-Webster, 1995).

O elemento Hg pode se apresentar como mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ), em formas inorgânicas (mercuroso –  $\text{Hg}_2^{++}$  ou mercúrico –  $\text{Hg}_2^+$ ) ou formas orgânicas (principalmente compostos alquila). Essas diferentes espécies de Hg diferem entre si com respeito ao seu comportamento no ambiente e interação com processos biológicos (Syversen & Kaur, 2012).

Diferenças de toxicidade há muito são observadas entre as formas orgânicas e inorgânicas de Hg (Roderer, 1983), com as formas orgânicas apresentando maior toxicidade. Todas as formas de Hg no ambiente representam um risco real para a intoxicação humana, pois a metilação de Hg a metilmercúrio (MeHg) por microrganismos dos sedimentos em cursos de água pode resultar na acumulação deste na cadeia alimentar aquática, com o consumo de peixe representando uma fonte comum para a exposição humana (Aschner et al., 2007).



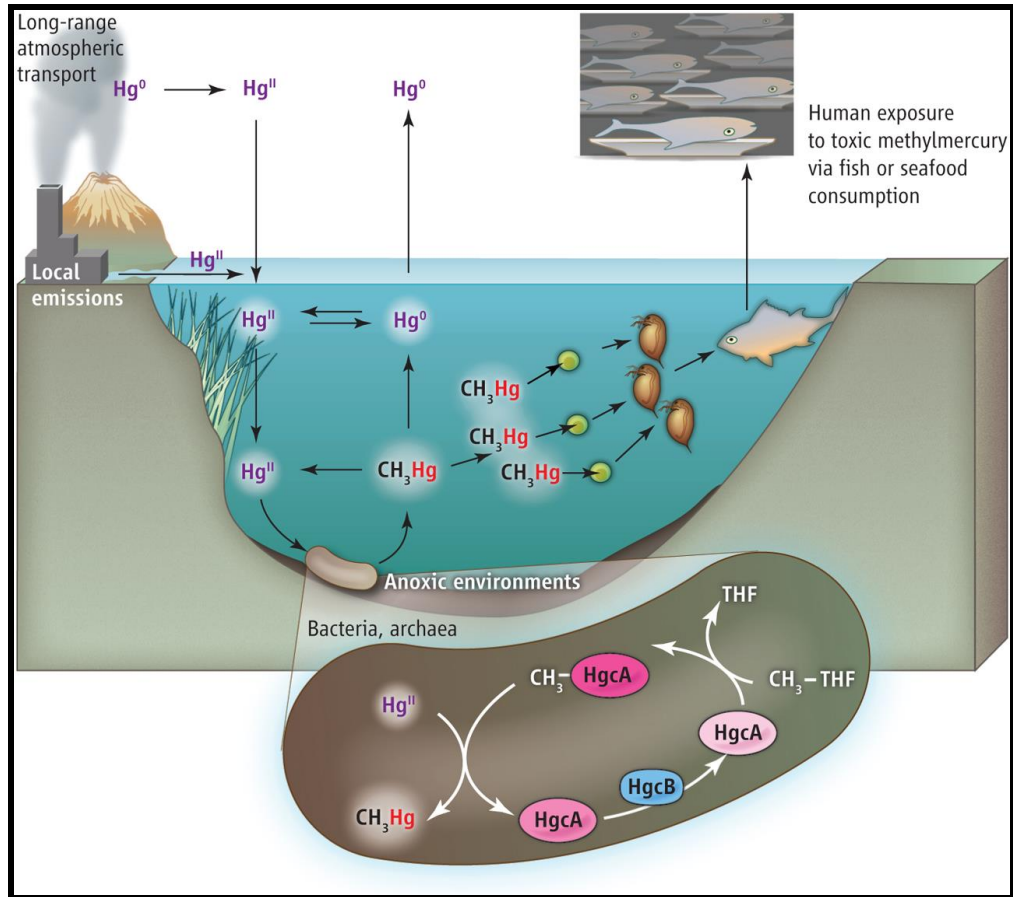


Figura 1 – Processo de metilação do Mercúrio.

Fonte: Poulain & Barkay. Cracking the Mercury Methylation Code. Science 2013; 339(6125): 1280-81

## 2.2 Metilmercúrio (MeHg)

Os seres humanos normalmente são expostos à forma orgânica do Hg, o cátion organometálico metilmercúrio ( $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$ , sigla MeHg), através da alimentação com peixes e frutos do mar. Todas as formas de peixe contêm pelo menos vestígios de MeHg (Ralston et al., 2008), e seu consumo é um risco principalmente para mulheres antes e durante a gravidez. Os perigos ocupacionais e as propriedades toxicológicas do Hg orgânico foram primeiramente descritos exaustivamente por Hunter e colaboradores (Hunter et al., 1940).

MeHg possui uma forte afinidade com grupos  $-\text{SH}$  (Hughes, 1957), encontrando alvos moleculares em vários lugares por todo o corpo, o que contribui para uma distribuição uniforme do composto no organismo, após uma exposição a longo prazo (Syversen & Kaur, 2012). MeHg é prontamente absorvido por inalação, e cerca de 80% é retido após a exposição ao vapor. Após a exposição oral, a absorção pelo intestino é praticamente 100%, mesmo que o MeHg na comida esteja ligado a grupos  $-\text{SH}$ . MeHg é também absorvido pelo contato com a

pele. Os compostos de Hg são metabolizados principalmente no fígado, onde eles podem sofrer demetilação ou serem submetidos a reações de conjugação com glutatona (GSH) e selênio (Branco et al., 2012). Sua principal via de excreção é por meio da bile e rins (Syversen & Kaur, 2012).

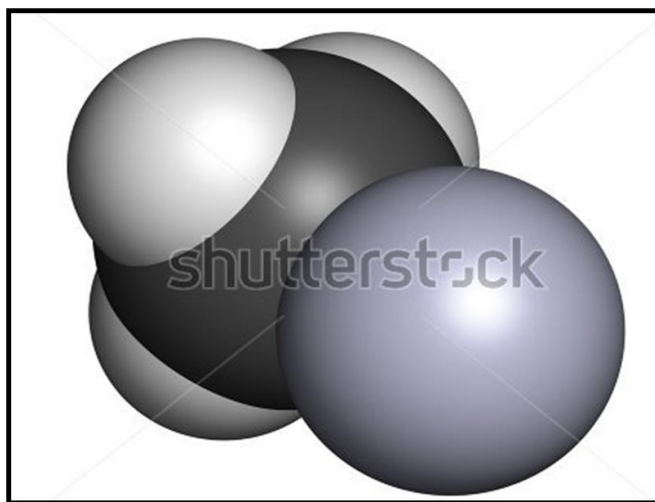


Figura 2 – Estrutura tridimensional do Metilmercúrio  
Fonte: [www.shutterstock.com](http://www.shutterstock.com)

Devido ao seu potencial de bioacumulação em peixes, bem como suas aplicações na indústria, centrais elétricas a carvão e mineração, episódios de intoxicação ocorrem devido principalmente à dieta e exposição ocupacional (Clarkson et al., 2003). O primeiro caso de intoxicação ocupacional fatal por MeHg ocorreu em 1863, quando uma equipe laboratorial que trabalhava com a síntese de compostos orgânicos derivados de Hg não percebeu a toxicidade dos compostos com os quais trabalhavam (Edwards, 1865).

Os efeitos neurotóxicos do MeHg já são amplamente conhecidos (Newland et al., 2006). Após os trágicos episódios históricos em Minamata, no Japão, e na região rural do Iraque, onde ocorreram os mais notórios acidentes históricos envolvendo contaminação por Hg, os indivíduos expostos a altas concentrações desse composto apresentaram distúrbios sensoriais nas mãos e pés, disfunção auditiva e visual, fraqueza e, em casos extremos, paralisia e morte (Fukuda et al., 1999). A primeira grande intoxicação por MeHg ocorreu no final dos anos 1940, onde uma fábrica liberou esse composto como um subproduto industrial na bacia de Minamata, no Japão, sendo as pessoas expostas por até 20 anos ao consumo de

peixe contaminado. Estima-se que a população exposta foi cerca de 200 mil pessoas (Ekino et al., 2007).

Durante o inverno de 1971-1972, cerca de 40 mil pessoas foram intoxicadas no Iraque, devido ao consumo de pão caseiro feito a partir de grãos de sementes tratados com compostos orgânicos derivados de Hg, como MeHg e etilmercúrio (Bakir et al., 1973). No próprio Brasil ocorreram sérios problemas com exposição ao Hg orgânico (Dolbec et al., 2000). A neurotoxicidade foi descrita em crianças que se alimentaram de peixe contaminado, apontando assim também os efeitos adversos sobre o cérebro em uma exposição pós-natal (Takeuchi & Eto, 1999), ainda que haja uma imprecisão inerente em estimativas de exposição em diferentes estágios do desenvolvimento.

Os mecanismos de toxicidade do MeHg, bem como os mecanismos de proteção celular, continuam pouco compreendidos. Contudo, há evidências de que o estresse oxidativo desempenha um papel central nesse processo, o qual pode estar relacionado, ao menos em parte, à alta afinidade do MeHg por tióis endógenos (Farina et al., 2011; Mori et al., 2007).



Figura 3 – Reação do MeHg com uma proteína genérica contendo tiol (PSH).

Fonte: Farina et al. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. Toxicol Appl Pharm 2011; 256:405-417



Figura 4 – Reação do MeHg com uma proteína genérica contendo selenol (PSeH).

Fonte: Farina et al. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. Toxicol Appl Pharm 2011; 256:405-417

## 2.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de oxidantes e o sistema de defesa do organismo, levando ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) – compostos químicos resultantes do metabolismo do oxigênio molecular (Abuja & Albertini, 2001), levando a danos nas estruturas celulares. As EROs incluem tanto os radicais livres instáveis (espécies químicas com elétrons desemparelhados na última camada, como o íon superóxido e o radical hidroxila) quanto moléculas estáveis, como o peróxido de hidrogênio (Szazs et al., 2007). São formadas em decorrência do metabolismo celular, pela exposição à radiação ionizante ou metais pesados, e pelo ciclo-redox presente no ambiente (Brennan & Schiest, 1996).

São espécies altamente reativas que podem oxidar proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, além de conduzir a extensas lesões nos componentes celulares e até mesmo morte celular (Zhang et al., 2003). Os danos ao DNA induzidos pelas EROs incluem alterações estruturais nas bases nitrogenadas e desoxirribose, e alterações nas ligações cruzadas entre DNA e proteínas, juntamente com quebras na fita simples ou dupla do DNA (Moore et al., 2000).

Evidências ligam o estresse oxidativo à patogênese de várias doenças humanas (Haddad, 2002), como o câncer, isquemia, diabetes, arteriosclerose e mal de Parkinson. É amplamente reconhecido que as EROs estão envolvidas na aceleração do envelhecimento e diminuição do tempo de vida, apresentando também efeitos inibitórios sobre a esporulação, atraso na progressão do ciclo celular e morte em células de leveduras (Azad et al., 2014).

A fim de protegerem-se dessas lesões celulares, os organismos vivos apresentam sistemas de defesa. Estes mecanismos incluem moléculas antioxidantes de baixo peso molecular (sistema não-enzimático), como o ácido ascórbico e a glutathiona, e enzimas antioxidantes (sistema enzimático), como tiorredoxina redutase, superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase (Azad et al., 2014), os quais desempenham um papel-chave na minimização dos níveis fisiológicos de EROs.

Os efeitos inibitórios do MeHg em relação a enzimas como a glutathiona peroxidase (GPx) e tiorredoxina redutase (TRxR) têm sido apontados como um mecanismo fundamental sobre a produção de EROs induzida por MeHg e o consequente estresse oxidativo (Wagner et al., 2010). O MeHg interage com grupos nucleofílicos, como tiol e selenol, de várias moléculas de diferentes pesos moleculares. Assim, as selenoproteínas, como GPx e TRxR, podem ser consideradas alvos primários durante uma intoxicação com esse organometálico

(Zemolin et al., 2012). Tendo em vista que esses grupos podem ter uma ação crítica na atividade catalítica de muitas enzimas envolvidas nos processos antioxidantes, torna-se razoável supor que devido a essa interação há um acréscimo nos níveis de espécies reativas (Farina et al., 2011).

## 2.4 Selênio (Se)

A eficácia de diferentes agentes e nutrientes para prevenir ou reverter a toxicidade do MeHg tem sido investigada. Entre estes, estão compostos contendo selênio. O elemento selênio (Se) é um nutriente essencial para seres humanos e animais (Zheng & Ouyang, 2001). Na espécie humana, o Se entra na composição de 25 selenoproteínas, as quais desempenham um papel importante ao nível celular em muitos processos metabólicos (Kryukov et al., 2003). Entre elas, podemos citar a enzima glutationa peroxidase - GPx (Rotruck et al., 1973), que possui um resíduo de selenocisteína incorporado em cada uma de suas quatro cadeias polipeptídicas e é ainda considerada uma enzima chave na degradação do peróxido de hidrogênio; e a tiorredoxina redutase - TrxR, uma flavoproteína dependente de selênio (Tamura & Stadtman, 1996; Lu & Holmgren, 2014).

Esse elemento traço foi descoberto em 1817 pelo químico e médico sueco Jöns Jakob Berzelius (Kim & Maham, 2003), sendo um calcogênio (grupo 16 da tabela periódica). Entretanto, apenas na década de 1950 o Se foi reconhecido como um micronutriente essencial na dieta de seres humanos e animais (Schwarz et al., 1957). O elemento Se pode apresentar-se em 4 estados de oxidação: selenato ( $\text{Se}^{+6}$ ), selenito ( $\text{Se}^{+4}$ ), selênio elementar ( $\text{Se}^0$ ) e seleneto ( $\text{Se}^{-2}$ ) (Parnham e Graf, 1991). Sob baixas concentrações apresenta propriedades farmacológicas, como atividade anticancerígena, tornando-se tóxico em concentrações mais elevadas, induzindo o estresse oxidativo pelo decréscimo de tióis e a geração de EROs, provocando danos celulares (Valdiglesias et al., 2010).

Na natureza ocorre principalmente na forma de sais inorgânicos, como selenato e selenito (Letavayova et al., 2006). O selenito de sódio apresenta uma maior toxicidade quando comparado às formas orgânicas de Se, o que se deve a uma maior produção de EROs (Yan & Spallholz, 1993). Resultados obtidos empregando-se Se-DL-metionina confirmaram que compostos orgânicos de Se são menos tóxicos e mutagênicos, em dose similar, quando comparados a formas inorgânicas de Se (Mukhopadhyay-Sardar et al., 2000).

O Se é único entre os nutrientes traço minerais, devido à sua atividade catalítica e toxicidade. A escala nutricional entre doses essenciais e doses tóxicas é bastante limitada quando comparada com outros elementos essenciais. Em baixas concentrações, os compostos contendo Se são anti-mutagênicos e anti-carcinogênicos, enquanto em altas concentrações eles são mutagênicos e possivelmente carcinogênicos (Letavayová et al., 2008).

As células não distinguem entre os aminoácidos metionina e selenometionina durante a síntese proteica, de modo que esse selenoaminoácido incorpora-se às proteínas do corpo no lugar da metionina (Shiobara et al. 1998). Outras formas orgânicas de Se como Selenometilcisteína (MSeC) acumulam-se em algumas plantas, a qual têm-se sugerido ser uma forma potencialmente ativa na prevenção do câncer (Ellis et al., 2004).

O Se ativa fatores antineoplásicos, previne doenças do coração, apresenta propriedades antiproliferativas e anti-inflamatórias, estimula o sistema imunológico, e exerce ação antagonista em relação a metais pesados (Alaejos et al., 2000). Um estudo de 1996 realizado em humanos demonstrou que o grupo que recebeu suplemento de Se apresentou uma diminuição na incidência de câncer de próstata, pulmão e colorretal (Clark et al., 1996). Também em humanos a deficiência de Se na dieta está relacionada a um aumento nos níveis plasmáticos de colesterol (Suadicaní et al., 1992). A ocorrência de polimorfismos em genes que codificam selenoproteínas, como a glutathione peroxidase 1 (GPx1) e a selenoproteína 15 (Sep15) aumentam o risco de alguns tipos de câncer, e uma mudança na expressão de proteínas como GPx1, GPx2, selenoproteína P (SELP) e TRx1 estão associados com o desenvolvimento de câncer e tumorigênese (Diwadkar-Navsariwala & Diamond, 2004; Diwadkar-Navsariwala et al., 2006).

Estudos sugeriram que a biodisponibilidade nutricional do Se, sua toxicidade e capacidades preventivas são influenciadas principalmente pela sua forma química e estado de oxidação. Portanto, as diferentes formas químicas dos compostos de Se disponíveis para suplementação na dieta humana acentuam a necessidade de se estabelecer doses benéficas e prejudiciais para cada composto (Letavayová et al., 2008).

O Se também protege contra algumas consequências neurológicas da exposição a Hg (Ralston et al., 2008). Esta proteção pode ocorrer devido à ligação Hg-Se (Heath et al., 2010), sendo a afinidade do Se com o Hg um milhão de vezes maior do que a sua afinidade com o enxofre, em formas análogas (Dyrssen & Wedborg, 1991). O mecanismo de redução de toxicidade do MeHg por meio do Se incluem: o sequestro de Hg, efeito antioxidante, síntese de GSH, aumento da atividade da glutathione peroxidase, dos níveis de selenoproteínas e da demetilação (Syversen & Kaur, 2012). Teoricamente, a suplementação com selênio poderia

substituir o selênio que foi inativado devido à sua ligação com Hg (Ralston et al., 2008). Heath et al. (2010) relataram fortes evidências de que uma dieta com Se atrasa o aparecimento de sinais neurológicos selecionados de longo prazo, em exposição de adultos ao MeHg, sendo observados também benefícios do consumo a longo prazo de Se em animais não expostos, especialmente quando eles se aproximaram da senescência.

Nas duas últimas décadas, o interesse na química e bioquímica de organocompostos derivados do Se vem aumentando, devido ao fato de que uma variedade desses compostos poderiam ser utilizadas como antioxidantes, inibidores de enzimas, neuroprotetores, agentes anti-tumorais e anti-infecciosos, indutores de citocinas e imunomoduladores (Mugesh et al., 2001; Letavayová et al., 2008). Especialmente, os diaril disselenetos têm demonstrado importantes propriedades antioxidantes (Mugesh et al., 2001), com destaque para o composto disseleneto de difenila, o mais simples entre os diaril disselenetos (ver seção a seguir).

## **2.5 Disseleneto de Difenila [(PhSe)<sub>2</sub>]**

O composto orgânico derivado do Se, disseleneto de difenila [(PhSe)<sub>2</sub>] é um intermediário sintético eletrofílico simples na síntese de vários compostos orgânicos de interesse farmacológico contendo selênio (Moreira et al., 2005). Já apresentou as propriedades antioxidante, anti-nociceptiva, anti-inflamatória, antihiperlipidêmica, antiteratogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiúlcera, antidepressiva e ansiolítica (Glaser et al., 2013; Nogueira et al., 2004; Rosa et al., 2007b; Rosa et al., 2007d), sendo, inclusive, vários desses efeitos superiores para o (PhSe)<sub>2</sub> do que para o composto ebselen (Nogueira et al., 2004). As propriedades antioxidantes do (PhSe)<sub>2</sub> podem estar relacionadas à sua capacidade de mimetizar a atividade da enzima GPx (Nogueira et al., 2004).

Baixas concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> protegeram contra a citotoxicidade induzida por metilmetanosulfonato, radiação UVC e peróxido de hidrogênio e reduziram os danos no DNA e as quebras cromossômicas em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79) por meio do aumento da atividade da glutathione peroxidase (Rosa et al., 2007b). O (PhSe)<sub>2</sub> foi eficaz em atenuar danos oxidativos agudos induzidos por cádmio em testículos de ratos (Santos et al., 2005a), bem como manter em valores similares ao controle os níveis de TBARS causados por exposição subcrônica a cádmio no fígado e cérebro de ratos (Santos et al., 2005b). Alguns estudos realizados em roedores também já apontaram o efeito protetor do (PhSe)<sub>2</sub> ao reduzir a toxicidade sistêmica induzida pela exposição ao MeHg (Freitas et al.,

2009; Dalla-Corte et al., 2012; Glaser et al., 2013). Freitas et al. (2009) assumem que um intermediário do  $(\text{PhSe})_2$ , o fenil selenol (fenil selenolato) interage com MeHg, originando um complexo estável que é excretado. Esta ideia é baseada no fato de que, ao contrário dos selenóis, os disselenetos não possuem nucleofilicidade significativa.

Os efeitos tóxicos do MeHg são possivelmente causados pelo estresse oxidativo, e o composto  $(\text{PhSe})_2$  pode atenuar essa toxicidade por meio de dois mecanismos: através da formação com o complexo com o MeHg e através da modulação do estresse oxidativo (Freitas et al., 2009). Um dos objetivos do presente estudo foi buscar uma maior compreensão sobre os mecanismos associados à capacidade do  $(\text{PhSe})_2$  em atenuar a toxicidade induzida por MeHg.

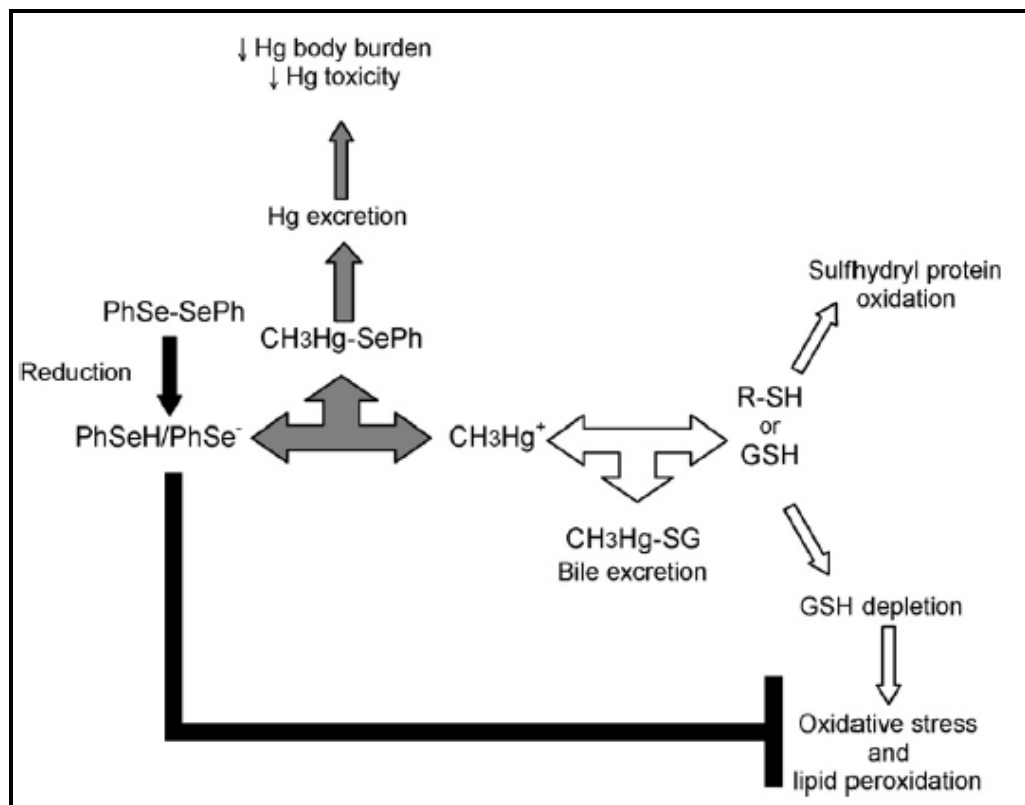


Figura 5 – Disseleneto de difenila reduz a toxicidade do MeHg através de sua redução a fenil selenolato.

Fonte: Freitas et al. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res Bull* 2009; 79:77-84



As propriedades de alguns disselenetos sintéticos sugerem que a clivagem e a redução de sua ligação disseleneto produz o grupo selenol, e, portanto, os disselenetos são bem-sucedidos em mimetizar a atividade da enzima GPx (Mugesh et al., 2001).

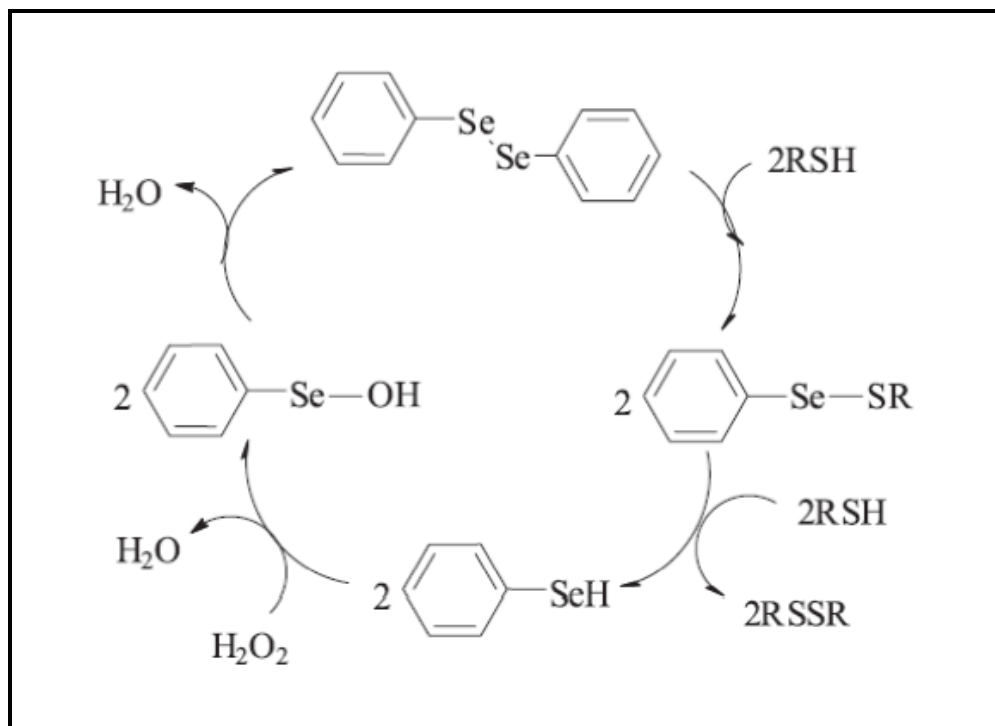


Figura 6 – Mecanismo catalítico para a ação antioxidante do disseleneto de difenila.

Fonte: Nogueira & Rocha. Diphenyl diselenide: a janus-faced molecule. *J Braz Chem Soc* 2010; 21: 2055-2071.

O estudo de Moreira et al. (2005) demonstra que embora o  $(\text{PhSe})_2$  não resulte em efeitos citotóxicos em células de leveduras, ele pode também agir como um pró-oxidante, sendo a GSH um possível e provável alvo molecular desse composto. Altas doses de  $(\text{PhSe})_2$  ocasionaram danos no cérebro, fígado e rins de ratos (Rosa et al., 2007a), efeitos teratogênicos (Favero et al., 2005) e redução da viabilidade em células V79, de modo dose- e tempo-dependente (Rosa et al., 2007c). Também causou inibição da atividade da enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase em eritrócitos humanos (Nogueira et al., 2003) e em vários tecidos e órgãos, e a exposição crônica de cérebros de ratos a doses elevadas do  $(\text{PhSe})_2$  afetou o sistema nervoso, provocando convulsões, perturbações da transmissão glutamatérgica e excitotoxicidade (Nogueira et al., 2004). Ele foi altamente citotóxico em células V79, uma vez que ele depleta GSH e conseqüentemente induz danos à molécula de DNA (Rosa et al.,

2007a). Mutações *frameshift* foram observadas em bactérias *Salmonella typhimurium* e em cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, bem como o aumento da incidência de permuta gênica e conversão gênica em *Saccharomyces cerevisiae* (Rosa et al., 2004).

Foi proposto que a toxicidade do  $(\text{PhSe})_2$  em altas concentrações pode estar relacionada com a sua oxidação ao composto extremamente reativo ácido selenínico após a reação com peróxidos endógenos, levando à oxidação de tióis (Nogueira et al., 2004; Farina et al., 2002).

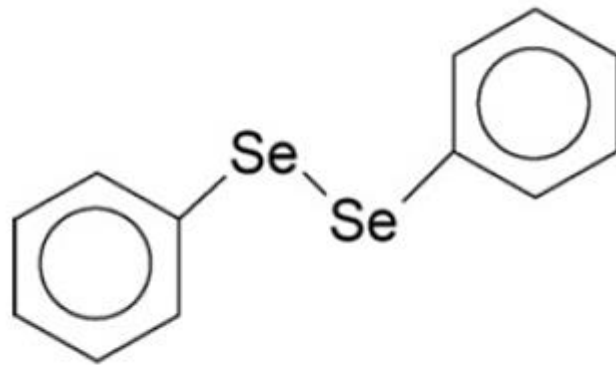


Figura 7 – Estrutura planar do Disseleneto de Difenila

Fonte: Machado et al. 3'3-Ditri-fluoromethyldiphenyl diselenide: A new organoselenium compound with interesting antigenotoxic and antimutagenic activities. *Mut Res* 2009; 673: 133-140

## 2.6 *Saccharomyces cerevisiae*

O entendimento dos mecanismos de resposta a estresse químico ou induzido por drogas tem sido cada vez mais customizado por meio de estudos de genômica funcional em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Dos Santos et al., 2012), que já chegaram a ser chamadas de ‘mamífero honorário’ (Resnick & Cox, 2000). Elas são anaeróbias facultativas, o que significa que fermentam açúcares como a glicose independentemente da concentração de oxigênio, sendo a glicose a sua principal fonte de carbono (Gancedo, 1998).

Vários fatores tornam as leveduras modelos ideais para a realização de estudos de natureza toxicológica, a fim de avaliar potenciais mecanismos celulares e moleculares de toxicidade. As leveduras são micro-organismos eucarióticos, pertencentes ao reino dos fungos (Kurtzman e Fell, 2006), sendo também os primeiros organismos eucarióticos a terem o seu

genoma completamente sequenciado, em 1996 (Goffeau et al., 1996). A sequência completa de nucleotídeos da célula de levedura contém aproximadamente 6300 genes, mas apenas 4733 leveduras mutantes para genes não-essenciais podem ser examinadas, visto que as deleções nos demais genes são letais (Zhou et al., 2009). Elas têm sido amplamente utilizadas como organismos modelo para estudos sobre genética e biologia celular, sendo úteis para o estudo de potenciais citotóxicos, citostáticos e genotóxicos de drogas (Fortney et al., 2013), aditivos alimentares (Jabeen et al., 2013) e contaminantes ambientais (Sanfilippo et al., 2010).

Estudos conduzidos com essa levedura têm aumentado o conhecimento de processos metabólicos e celulares fundamentais na espécie humana, incluindo a base molecular de doenças neurodegenerativas, como a esclerose lateral amiotrófica (Bastow et al., 2011). O uso das leveduras é aconselhável também no estudo da apoptose em células de mamíferos e para descobrir-se novas moléculas-alvo para o controle da apoptose (Forsburg, 2001). Leveduras também têm sido utilizadas como modelos de estudo do envelhecimento, e pesquisas têm aumentado a compreensão sobre o processo do envelhecimento que é conservado das leveduras aos humanos, e procurado estratégias para o seu retardo (Fontana et al., 2010).

Centenas de genes homólogos na espécie humana têm sido identificadas para um grande número de genes em leveduras, ocorrendo conservação de genes ligados a inúmeras doenças (Wood et al., 2002). Um longo histórico de manipulação genética em leveduras permite direcionar o estudo e examinar genes e vias conservados ao longo de seus genomas, facilitando análises funcionais (Gaután & Vulpe, 2014). A capacidade de monitorar a atividade de transcrição de todo o seu genoma em um único experimento, combinados com procedimentos relativamente simples, faz de *Saccharomyces cerevisiae* um excelente modelo para o estudo da resposta da expressão de genes associada ao estresse (Begley & Samson, 2004). Muitos dados obtidos a partir de análises em leveduras foram posteriormente confirmados em organismos mais complexos, como o peixe-zebra e linhagens de células humanas (Gaután & Vulpe, 2014).

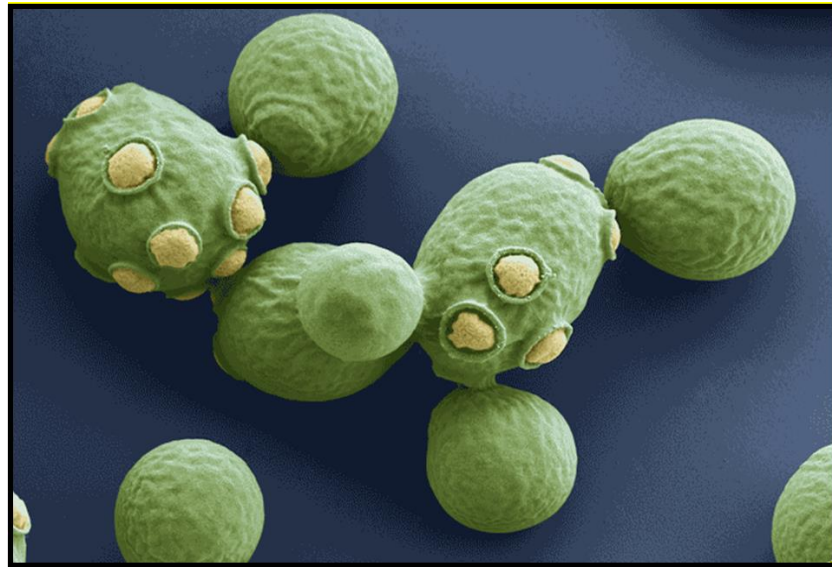


Figura 8 – Leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte: [www.microbiologyonline.org.uk](http://www.microbiologyonline.org.uk)

## 2.7 Os sistemas de defesa das leveduras

Células de leveduras geram EROs da mesma forma que células de organismos mamíferos e expressam muitas das mesmas defesas antioxidantes (Jamieson, 1998), apresentando sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos. Essas defesas são descritas em várias isoformas e em distintas localizações intracelulares. Em geral, a resistência ao ataque de EROs é resultado de uma combinação de vários fatores, e a deleção de algum deles não conduz a célula à inviabilidade, apenas, em alguns casos, a um fenótipo levemente mais sensível. Assim, por exemplo, a deleção do gene *SOD1* conduz à auxotrofia para vários aminoácidos, e a deleção de *GSH1* leva a um encurtamento do tempo de vida a um aumento da apoptose (Perrone et al., 2008).

A regulação da expressão gênica pelo estresse oxidativo em leveduras parece ser mais complexa do que em células procarióticas, e também há uma considerável sobreposição entre os mecanismos de resposta ao estresse oxidativo e respostas a outros tipos de estresse, como choque osmótico, choque térmico e resistência a metais pesados como o cádmio (Jamieson, 1998). A utilização de linhagens celulares de *S. cerevisiae* com defeitos nas defesas antioxidantes torna-se importante para a realização de estudos sobre vários produtos químicos

(Zyracka et al., 2005). A seguir, são descritas as atividades de algumas proteínas e enzimas ligadas aos sistemas de defesa das leveduras.

### **2.7.1 O fator de transcrição YAP1**

O fator de transcrição YAP1 é uma das proteínas-chave envolvidas na regulação do processo de resposta ao estresse oxidativo induzido em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno e Cd<sup>+</sup> (Schenell & Entian, 1991; Wu et al., 1993). Contudo, a mutante para esse fator de transcrição ainda reteve uma resposta adaptativa ao estresse induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que implica na participação de outros fatores nessa resposta (Stephen et al., 1995). Além de sua grande importância na resposta ao estresse oxidativo, ele também confere à célula a habilidade de responder a oxidantes como t-butil hidroperóxido, diamida, e dietilmaleato (Delaunay et al., 2002), metanossulfato de metila, menadiona, mercúrio, benomyl, selenato, N-etilmaleimida, metilglioxal e radiação ionizante (Herrero et al., 2008).

Sob condições de não-estresse, Yap1 localiza-se no citoplasma (Yan et al., 1998). Vias regulatórias mediadas por Yap1 que controlam a resposta adaptativa ao estresse oxidativo são ativadas por mecanismos sensoriais redox que detectam alterações no equilíbrio redox intracelular causadas por EROs e tióis oxidados. Esses mecanismos envolvem resíduos de cisteína redox-sensíveis que detectam rapidamente e transduzem os sinais de estresse para ativar proteínas regulatórias (Herrero et al., 2008). Ele acumula-se no núcleo da célula quando é ativado pelo estresse oxidativo (Kuge et al., 1997), interagindo com genes alvo. Essa retenção ocorre devido à oxidação de resíduos de cisteína de YAP1 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que modifica a sua conformação (Delaunay et al., 2002). O fator de transcrição YAP1 está envolvido na ativação da transcrição de GSH1 (Wu & Moye-Rowley, 1994), bem como aumenta a expressão dos genes SOD1 e CAT1, após a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhang et al., 2003).

Yap1 se liga especificamente a *Elementos de Reconhecimento Yap1* (Yap1 Recognition Elements – YRE), localizados em promotores de genes (Kuge & Jones, 1994). Porém, foram identificados alvos de Yap1 que não contém YRE, o que aponta para a existência de locais adicionais de reconhecimento (Lee et al., 1999).

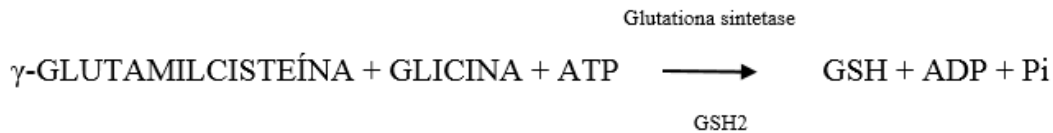
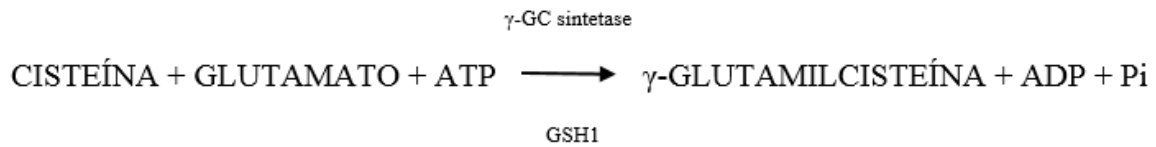
### **2.7.2 YBP1 (Proteína de Ligação a Yap1)**

Ybp1 é uma proteína envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo. Ela é requerida para a oxidação de resíduos específicos de cisteína do fator de transcrição Yap1, resultando em uma localização nuclear de Yap1 em resposta ao estresse (Veal et al., 2003; Byrne & Wolfe, 2005).  $H_2O_2$  induz a formação de um complexo entre Yap1 e Ybp1, interagindo especificamente com sua parte C-terminal (Veal et al., 2003). Algumas linhagens genéticas contêm uma forma não-funcional de Ybp1, devido a uma mutação, acarretando uma incapacidade de se formar o complexo Yap1-Ybp1. Nesses casos, a tiorredoxina peroxidase Tsa1 é necessária para a ativação de Yap1 (Okazaki et al., 2005).

### **2.7.3 GC sintetase e Glutationa sintetase (GSH1 e GSH2)**

A glutationa ( $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina; sigla GSH) é o mais abundante tripeptídeo tiol não-proteico presente em todos os organismos vivos, especialmente nas células eucarióticas (Meister, 1981; Meister & Anderson, 1983), contribuindo para vários processos celulares, como o controle do potencial redox, a proteção contra EROs, a desintoxicação de compostos eletrofílicos, o dobramento de proteínas, o sequestro de metais tóxicos e o transporte de enxofre orgânico (May et al., 1998; Toledano et al., 2003). A glutationa possui uma função essencial na mitocôndria sob condições fisiológicas normais em animais, e sua deficiência está relacionada a várias doenças por danos na mitocôndria (Jain et al., 1991). Na espécie humana, alterações na homeostase de GSH estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças como câncer, fibrose cística, desordens neurodegenerativas e patologias associadas ao envelhecimento (Ballatori et al., 2009).

A glutationa é sintetizada em dois passos enzimáticos, no citosol. A primeira reação é catalisada por  $\gamma$ -glutamilcisteína (GC) sintetase, codificada por GSH1; e a segunda, pela glutationa sintetase, codificada por GSH2 (Suzuki et al., 2011). As respectivas reações estão representadas a seguir.



$\gamma$ -GC sintetase, um produto de GSH1, é inibida *in vitro* por altos níveis de GSH (Richman & Meister, 1975). As mutantes para GSH1 induzem apoptose (Madeo et al., 1999) e mesmo em meio suplementado com GSH, apresentam alta tendência para a perda da função mitocondrial (Schmitt & Mcentee, 1996). Além disso, essas mutantes não apresentaram respostas adaptativas ao estresse induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante a fase exponencial, em crescimento em meio YPD (Izawa et al., 1995)

Mutantes para GSH1 e GSH2 ainda são viáveis, embora cresçam de forma mais lenta. A deleção de GSH1 também incapacita o crescimento em fontes não-fermentáveis de carbono, como o glicerol (Ohtake et al., 1990). As mutantes apresentam defeitos na esporulação (Suizu et al., 1994).

#### 2.7.4 Glutathiona S-transferases (GSTs)

Glutathiona S-transferases (GSTs) são enzimas encontradas em todos os organismos aeróbicos. Elas conjugam GSH a compostos eletrofílicos endógenos e exógenos, incluindo xenobióticos ambientais, fármacos anti-câncer, metais pesados e produtos do estresse oxidativo, o que resulta na eliminação e desintoxicação das respectivas moléculas conjugadas (Hayes et al., 2005), embora a conjugação com GSH possa ocorrer também de forma espontânea (Raí et al., 2003; Vredenburg et al., 2013).

Nas células de mamíferos, essas enzimas estão amplamente distribuídas, e têm sido classificadas como citosólicas, mitocondriais e associadas à membrana. Dependendo de suas sequências e substrato específico a que se ligam, elas têm sido divididas em várias classes (Hayes et al., 2005). Em contraste com mamíferos, plantas e até mesmo bactérias,

comparativamente pouco é conhecido sobre as GSTs de leveduras e fungos em geral, e os seus lugares dentro do sistema de classificação não é claro (McGoldrick et al., 2005).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* apresentam duas GST padrões (codificadas por GTT1 e GTT2) (Collinson & Grant, 2002). A dupla mutante para GTT1 e GTT2 não exibiu nenhuma atividade detectável de GST, sugerindo que não há outros genes que codificam para alguma proteína com atividade GST (Choi et al., 1998). GTT3 é uma proteína de função e localização desconhecidas, que pode estar envolvida no metabolismo de GSH. (Samanta & Liang, 2003; Huh et al., 2003).

O vacúolo celular é o destino final para várias substâncias tóxicas. Uma vez dentro do vacúolo, GSH pode ser decomposta por outras enzimas, restaurando glutamato, cisteína e glicina ao citoplasma, podendo serem utilizados para uma nova síntese de GSH por meio das enzimas Gsh1 e Gsh2 (Adamis et al., 2007; Adamis et al., 2008).

A glutationa transferase Gtt1 também apresenta atividade GPx contra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e/ou hidroperóxidos orgânicos em ensaios *in vitro* (Garcerá et al., 2006). Estudos demonstraram que Gtt2 está envolvida na formação do complexo GSH-Cd, cuja acumulação no citoplasma inibe a captação de Cd pelas células de *S. cerevisiae* (Gomes et al., 2002; Adamis et al., 2004). Fauchon et al. (2002) observaram que em células de leveduras expostas ao Cd, a expressão do gene GTT2 aumentou mais de 25 vezes, indicando fortemente o seu papel na detoxificação de Cd. Gtt2 também demonstrou-se responsável pela catálise da formação do conjugado GSH-menadiona bem como pela eliminação de produtos tóxicos gerados pelo estresse induzido pela menadiona (Castro et al., 2007).

### **2.7.5 Superóxido Dismutases (SODs)**

Superóxido dismutases são uma classe de metaloenzimas que catalisam a dismutação de superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oxigênio. Nos eucariotos, ela se apresenta sob duas formas: uma forma contendo cobre e zinco (Cu,Zn-SOD), codificada por SOD1 nas leveduras e de localização citosólica e no espaço intermembranar mitocondrial; e uma forma contendo manganês (Mn-SOD), codificada por SOD2 nas leveduras, de localização na matriz mitocondrial (Herrero et al., 2008; Liu et al., 2010).

A Cu,Zn-SOD é a maior enzima envolvida na remoção dos ânions superóxido do citoplasma, atuando também possivelmente no peroxissomo (Gralla & Kosman, 1992) e no tamponamento da concentração de cobre intracelular (Culotta et al., 1995), embora essa



função pareça não estar relacionada à atividade de proteção contra o estresse oxidativo. Leveduras com deleção para SOD1 apresentam fragilidade ao estresse oxidativo e são hipersensíveis a drogas geradoras de superóxidos. Nas leveduras, essa enzima está também associada a outros processos celulares, como respostas hiperosmótica ao estresse, apoptose e tempo de vida (Garay-Arroyo et al., 2003). SOD1 está envolvida na homeostase da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Sua deleção acarreta um aumento significativo de quitina, um dos componentes estruturais das paredes celulares das leveduras, causando também um aumento na sensibilidade a agentes perturbadores da parede celular (Liu et al., 2010).

Os defeitos na SOD citosólica conduzem a um aumento da oxidação intracelular após um choque térmico (Pereira et al., 2003) e morte rápida na fase estacionária (Longo et al., 1996). A deleção de SOD1 provoca uma variedade de fenótipos, incluindo fraco crescimento sob condições respiratórias, perda da viabilidade na fase estacionária e hipersensibilidade contra oxidantes externamente adicionados, como o paraquat e a menadiona (Herrero et al., 2008). Parece que, em alguma medida, a SOD citosólica é capaz de compensar a ausência da SOD mitocondrial, apesar de sua diferença na localização celular, e poderia ser mais importante do que a outra SOD para o crescimento em meio contendo glicerol (Lushchak et al., 2005).

SOD2, juntamente com a fração mitocondrial de SOD1, participa na dismutação de superóxidos gerados na matriz mitocondrial, enquanto a fração citosólica de SOD1 parece proteger as leveduras de superóxidos gerados de outras reações metabólicas e xenobióticos (Furukawa & O'Halloran, 2006). Demonstrou-se que a atividade de SOD2 é responsável por 5 a 15% da atividade total de SOD na célula (Chang et al., 1991).

Sob baixas condições de aeração, a deleção de Mn-SOD foi muito mais deletéria para a viabilidade da célula do que a ausência de Cu,Zn-SOD (Longo et al., 1996). Além disso, leveduras com Mn-SOD ausente são hipersensíveis a 100% de oxigênio e crescem pobremente em fontes não-fermentativas de carbono (van Loon et al., 1986). Porém, SOD2 parece não desempenhar um papel importante na defesa contra oxidantes externamente adicionados (Herrero et al., 2008)

### **2.7.6 Catalases (CAT e CTT)**

As catalases são enzimas que possuem um centro metálico (grupo heme) e decompõem o  $H_2O_2$  em água e oxigênio. Nas leveduras podem ter localização citosólica (catalase T, codificada por CTT1) ou peroxissomal (catalase A, codificada por CAT1) (Chelikani et al., 2004). As leveduras mutantes para CTT1 ou CAT1 são bastante sensíveis ao  $H_2O_2$  na fase estacionária (Izawa et al., 1995).

O principal papel fisiológico da catalase A parece ser a remoção de  $H_2O_2$  produzido pela  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (Hiltunen et al., 2003). A mutante com deleção de CAT1 ainda é capaz de crescer em condições em que os ácidos graxos são a única fonte de carbono, o que demonstra que a atividade da catalase peroxissomal não é indispensável (Hiltunen et al., 2003).

O papel fisiológico da catalase T parece menos claro; sua expressão genética é controlada pelo estresse oxidativo e osmótico (Ruis & Hamilton, 1992). A transcrição de CTT1 também foi elevada após ocorrência de choque térmico (Wieser et al., 1991). A mutante com deleção de CTT1 não foi mais sensível ao  $H_2O_2$  do que o tipo selvagem, embora a dupla mutante (para CAT1 e CTT1) tenha sido hipersensível, o que aponta para um papel cooperativo de ambas as catalases (Izawa et al., 1996).

### **2.7.7 Glutathione peroxidases (GPx)**

A atividade das enzimas chamadas de peroxidases requer doadores de elétrons para tióis (Brihelius-Flohe, 2006). A função bioquímica de GPx é reduzir hidroperóxidos lipídicos a seus correspondentes e reduzir  $H_2O_2$  livre a água (Berg et al., 2004). O peróxido de hidrogênio é convertido a oxigênio por meio de reações acopladas, com a conversão de glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG) catalisada por enzimas chamadas glutathione peroxidases (GPx) (Arthur, 2000). A forma reduzida da glutathione (GSH) é doadora de elétrons para a reação de GPx, e sua forma oxidada (GSSG) é reduzida a GSH por outra enzima (glutathione reductase) (Izawa et al., 1995).

Estudos descreveram a presença de três GPx em leveduras, que vieram a ser chamadas de GPx1, GPx2 e GPx3 (Inoue et al., 1999). Porém, estudos posteriores demonstraram que essas três GPx são proteínas do tipo PHGPx – hidroperóxido de fosfolípido GPx (Avery & Avery, 2001). PHGPx são moléculas monoméricas (ao contrário das clássicas GPx, que são multiméricas) e associadas à membrana, reduzindo hidroperóxidos lipídicos em membranas, sendo então as principais enzimas na reparação da peroxidação lipídica em membranas

(Avery & Avery, 2001). Ainda não houve estudos detalhados relatando a localização exata das três enzimas em *Saccharomyces cerevisiae*, porém, análise proteômica aponta a localização citosólica para GPx2 e GPx3 (Huh et al., 2003).

Há dados na literatura sugerindo que a atividade das enzimas GPx é normalmente aumentada após a exposição a  $Hg^{2+}$  (Agarwal et al., 2010; Monteiro et al., 2010). Além da regulação em resposta ao estresse oxidativo, demonstrou-se que GPx2 responde também a elevadas concentrações de  $Ca^{2+}$  (Tsuzi et al., 2004).

### 2.7.8 Tiorredoxinas (TRx)

Tiorredoxinas (TRx) são pequenas proteínas ricas em grupos sulfidríla e evolutivamente conservadas que estão envolvidas na defesa antioxidante e na manutenção celular da homeostase redox (Árner & Holmgren, 2000). Em um nível mais geral, elas participam da modulação do estado redox das proteínas celulares, e conseqüentemente, no dobramento proteico (Rietsch & Beckwith, 1998). Sua estrutura tridimensional envolve quatro ou cinco folhas- $\beta$ , flanqueadas por três ou mais  $\alpha$ -hélices, em ambos os lados da folha- $\beta$  (Martin, 1995).

Na espécie humana, ela se apresenta sob duas isoformas: Trx1 (de localização citosólica) e Trx2 (de localização mitocondrial) (Lee et al., 2013). As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* apresentam duas tiorredoxinas citosólicas (Trx1 e Trx2), mais uma de localização mitocondrial (Trx3) (Muller, 1991; Pedrajas et al., 1999). De forma paralela, as leveduras também possuem uma Trx redutase citosólica (Trr1) e uma mitocondrial, (Trr2), perfazendo-se dois sistemas que agem separadamente (um citosólico e um mitocondrial) (Pedrajas et al., 1999). A tiorredoxina redutase é uma flavoproteína homodimérica que na presença de NADPH reduz a tiorredoxina oxidada (Zhong et al., 2000).

O sistema tiorredoxina mitocondrial (Trx3 e Trr2) está envolvido na defesa contra o estresse oxidativo gerado durante o metabolismo respiratório (Pedrajas et al., 1999). Além disso, também foi proposto que o sistema tiorredoxina citosólico desempenha papel na biossíntese de purinas e pirimidinas como requeridas para a síntese de DNA, o dobramento de proteínas e o metabolismo do enxofre (Holmgren, 1989).

Acredita-se que as duas tiorredoxinas citoplasmáticas (TRx1 e TRx2) forneçam equivalentes redutores para as enzimas ribonucleotídeo redutase e 3'-fosfoadenosina 5'-fosfossulfato redutase (Gonzalez-Porque et al., 1970). A deleção de um ou outro dos genes

(TRX1 e TRX2) não acarreta efeito sobre o crescimento celular ou a morfologia, mas a deleção de ambos os genes resulta em um prolongamento da fase S do ciclo celular e um acentuado aumento no nível de glutathiona oxidada (Muller, 1991). A deleção do gene TRX2 resulta em sensibilidade extrema ao  $H_2O_2$  e, assim, acredita-se que ele esteja envolvido na resposta contra o  $H_2O_2$ . A expressão de TRX2 e TRR1 em resposta ao  $H_2O_2$  é regulada pelos fatores de transcrição YAP1 e SKN7 (Kuge & Jones, 1994).

O sistema citosólico TRX é necessário para a defesa contra hidroperóxidos externamente adicionados. Estudos utilizando mutantes individuais e mutantes duplos têm demonstrado que TRX2 apresenta um papel mais importante que TRX1 a esse respeito, o que indica que ambas não apresentam exatamente funções sobrepostas (Ócon-Garrido & Grant, 2002).

A Trx redutase citosólica (Trr1) é uma enzima chave na regulação do estado redox do sistema tiorredoxina, atuando como um sistema de dissulfeto redutase e protegendo as células contra o estresse oxidativo e redutivo (Machado et al., 1997; Trotter & Grant, 2002; Trotter & Grant, 2003). A Trx redutase mitocondrial (Trr2) está envolvida na proteção contra o estresse oxidativo, sendo requerida juntamente com Glr1 para manter o estado redox de Trx3 (Machado et al., 1997; Pedrajas et al., 1999). A deleção de TRR2 torna a célula hipersensível a hidroperóxidos (Pedrajas et al., 1999).

Tabela 1 – Descrição das cepas de leveduras knockout utilizadas

<b>Enzima</b>	<b>Gene</b>	<b>Localização</b>	<b>Papel</b>
Fator de transcrição Yap1	YAP1	Citosol/Núcleo	Resposta adaptativa a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exógeno, xenobióticos e cádmio
Proteína Ybp1	YBP1	Citosol	Proteína envolvida no transporte de Yap1p oxidado do citoplasma para o núcleo
GC sintetase	GSH1	Citosol	Síntese de GSH
Glutationa sintetase	GSH2	Citosol	
Glutationa S-transferases	GTT1	Citosol	Enzimas de desintoxicação, desempenham papel na resistência às drogas
	GTT2	Citosol	
	GTT3	Desconhecido	
Superóxido dismutases	SOD1	Citosol, Mitocôndria	Dismutação de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + O <sub>2</sub>
	SOD2	Mitocôndria	
Catalases	CTT1	Citosol	Degradação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub>
	CAT1	Peroxissomo	
Glutationa peroxidases	GPX1	Citosol/Membrana	Redução de hidroperóxidos lipídicos oxidados
	GPX2	Citosol/Membrana	
Tiorredoxinas	TRX1	Citosol	Síntese de nucleotídeos, assimilação de sulfato, co-fator para algumas peroxidases, controle redox
	TRX2	Citosol	
	TRX3	Mitocôndria	
Tiorredoxina redutase	TRR2	Mitocôndria	Defesa antioxidante contra EROs geradas na mitocôndria

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi investigar os mecanismos envolvidos na proteção do (PhSe)<sub>2</sub> sobre a toxicidade induzida por MeHg utilizando cepas selvagem e *knockout*, para diferentes enzimas e proteínas ligadas ao sistema de defesa antioxidante, de *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse trabalho compreendem:

- Avaliar a inibição do crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em resposta a diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> e/ou MeHg, em cepas selvagens e *knockout* apresentando deleções para genes que codificam proteínas envolvidas na defesa antioxidante;
- Quantificar a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) em cepas de levedura selvagens e *knockout* expostas a diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> e/ou MeHg;
- Avaliar a permeabilidade das membranas celulares em cepas de levedura selvagens e *knockout* expostas a diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> e/ou MeHg;
- Quantificar o conteúdo celular de GSH em leveduras selvagens expostas a diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> e/ou MeHg.

## 4 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico '**Study of mechanisms of protection of diphenyl diselenide against methylmercury's toxicity using *Saccharomyces cerevisiae* knockout strains**' apresentado a seguir será submetido à revista *Toxicology and Applied Pharmacology*.

**Study of mechanisms of protection of diphenyl diselenide against methylmercury's toxicity using *Saccharomyces cerevisiae* knockout strains**

Fabricio Luís Lovato<sup>1</sup>, João Batista Teixeira da Rocha<sup>1</sup>, Cristiane Lenz Dalla Corte<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Cep 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

<sup>2</sup>*Universidade Federal do Pampa, Campus Caçapava do Sul, Cep 96570-000. Caçapava do Sul, RS, Brazil.*

\* *Corresponding author:*

Cristiane L. Dalla Corte

*UNIPAMPA – Campus Caçapava do Sul*

*Cep 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.*

*Tel: #55-55-3220-8140*

*Fax: #55-55-3220-8978*

E-mail: [crisbioq@yahoo.com.br](mailto:crisbioq@yahoo.com.br)



**Abstract**

Methylmercury (MeHg) is an ubiquitous environmental pollutant which induces serious neurotoxic effects. Diphenyl diselenide [(PhSe)<sub>2</sub>], a organoseleno-compound, was demonstrated to exert protective effects against MeHg toxicity, although the exact mechanism involved in its protection is not fully understood. The aim of this study was to investigate mechanisms involved in the protective effect of (PhSe)<sub>2</sub> on the toxicity induced by MeHg, using wild and knockout strains of *Saccharomyces cerevisiae* for enzymes and proteins of the antioxidant defense system ( $\Delta yap1$ ,  $\Delta ybp1$ ,  $\Delta ctt1$ ,  $\Delta cat1$ ,  $\Delta sod1$ ,  $\Delta sod2$ ,  $\Delta gsh1$ ,  $\Delta gsh2$ ,  $\Delta gtt1$ ,  $\Delta gtt2$ ,  $\Delta gtt3$ ,  $\Delta gpx1$ ,  $\Delta gpx2$ ,  $\Delta trx1$ ,  $\Delta trx2$ ,  $\Delta trx3$  and  $\Delta trr2$ ). In the wild type strain (PhSe)<sub>2</sub> protected against the growth inhibition, ROS production, increase in thiol levels and decrease in membrane integrity induced by MeHg. Single deletions in  $\Delta yap1$ ,  $\Delta sod1$ ,  $\Delta sod2$ ,  $\Delta gsh1$ ,  $\Delta gsh2$ ,  $\Delta gpx1$ ,  $\Delta gpx2$ ,  $\Delta trx1$ ,  $\Delta trx2$  and  $\Delta trx3$  decreased the capacity of (PhSe)<sub>2</sub> in prevent MeHg toxicity in yeasts. Together these results indicate a role of (PhSe)<sub>2</sub> in modulate gene expression of antioxidant enzymes through the activation of the transcription factor YAP1 preventing the oxidant damage caused by MeHg in *S. cerevisiae*.

**Keywords:** Methylmercury; Selenium; Yeast; Oxidative stress; Antioxidant defenses.

## 1. Introduction

Mercury is an element of global importance and large quantities of Hg have been released into environment by natural processes or anthropogenic activities (Counter & Buchanan, 2004). Consequently, humans can be exposed to Hg by different ways, including air, water and food (Syversen & Kaur, 2012).

Humans can be exposed to organic forms of mercury, particularly to the organometallic cation methylmercury ( $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$ , MeHg) by eating fish and seafood, since all forms of fish contain MeHg at different levels (Ralston et al., 2008). MeHg has a strong affinity for -SH groups (Hughes, 1957; Rabenstein, 1973), which contributes to uniform distribution of the compound in body after a long term exposure (Syversen & Kaur 2012).

Neurotoxic effects of MeHg are widely known (Newland et al., 2006). Individuals intoxicated with MeHg present sensory disorders in the hands and feet, hearing and visual impairment, weakness, and, in extreme cases, paralysis and death (Fukuda et al., 1999). Although exact mechanisms underlying toxicity of MeHg are not yet completely understood, there are points of evidence indicating a central role of oxidative stress in this process, which is related to high affinity of MeHg for endogenous thiol and selenol groups (Farina et al., 2011; Mori et al., 2007). Inhibitory effects of antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase (TrxR) by MeHg have been indicated as a key mechanism for ROS overproduction caused by MeHg (Farina et al., 2011; ; Wagner et al., 2010; Dalla Corte et al., 2013).

Efficacy of different agents and nutrients for preventing or reversing MeHg toxicity has been investigated. Among those are compounds containing selenium. The element selenium (Se) is an essential nutrient for humans and animals (Zheng & Ouyang, 2001). In humans, Se is present in the composition of 25 selenoproteins, which play important role as antioxidant and in redox metabolic processes (Kryukov et al., 2003). Se activates antineoplastic factors, prevents heart disease, presents antiproliferative and anti-inflammatory properties, stimulates immune system and exerts antagonistic action against heavy metals (Alaejos et al., 2000). Se can also protect against some neurological consequences of exposure to Hg (Ralston et al., 2008). Protection is due to binding of Hg by Se (Heath et al., 2010). In accordance, affinity of Hg for Se is a million times higher than its affinity for sulfur (Dyrssen & Wedborg, 1991).

Diphenyl diselenide  $[(\text{PhSe})_2]$ , an organic compound containing Se, is a simple electrophilic intermediate used in synthesis of various organic compounds of pharmaceutical interest (Moreira et al., 2005). Of particular pharmacological significance,  $(\text{PhSe})_2$  has anti-

nociceptive, anti-inflammatory, anti-hyperglycemic, anti-teratogenic, hepatoprotective, neuroprotective, gastroprotective, anti-depressant and anxiolytic properties (Glaser et al., 2013; Nogueira et al., 2004; Nogueira & Rocha, 2010; Nogueira & Rocha, 2011; Hassan et al. 2016; Rosa et al., 2007). Some studies in rodents have pointed out the protective effect of  $(\text{PhSe})_2$  against systemic toxicity of MeHg (Freitas et al., 2009; Dalla Corte et al., 2012; Glaser et al., 2013). Freitas et al. (2009) suggested the intermediate of  $(\text{PhSe})_2$ , phenyl selenol (phenyl selenolate) could interact with MeHg, yielding a stable complex that enhance the excretion of MeHg from mice body (Freitas et al., 2009).

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has emerged as a suitable model for functional genomics studies, expanding our understanding of the response mechanisms to chemical stress (Dos Santos et al., 2012). Several factors make yeasts ideal models to perform toxicological studies for identifying cellular and molecular mechanisms of toxicity. Accordingly, use of mutants of *S. cerevisiae* with defects in antioxidant defenses can be important for elucidating molecular targets of various chemicals (Zyracka et al., 2005). This study aimed to investigate genes and pathways involved in the protective effect of  $(\text{PhSe})_2$  on MeHg toxicity, using *S. cerevisiae* wild type and knockout strains for different enzymes and proteins related to the antioxidant defense system.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Chemicals

Methylmercury, diphenyl diselenide, dimethyl sulfoxide (DMSO), YPD broth, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). CellTracker™ Green CMFDA Dye was purchased from Invitrogen (San Diego, CA, USA). Methylmercury was dissolved in distilled water, and diphenyl diselenide in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final volume of DMSO in incubation medium was 0.5%.

### 2.2 Strains and storage

Experiments were performed in *S. cerevisiae* wild type strain BY4741 and knockout strains having deletions in genes encoding enzymes related to antioxidant defenses. The strains were

kindly provided by Professors Dr. Monica Lomeli and Dr. Claudio Akio Masuda, from the Leopoldo de Meis Institute of Medical Biochemistry at the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). The wild type yeasts were maintained in 2 mL cryogenic tubes and the mutants in 96 well plates, both stored at -80 °C in a solution containing YPD medium and glycerol. For all experiments described below, the YPD medium (or YEED - Yeast Extract Peptone Dextrose), was used, which is a complete medium for yeast growth. It contains yeast extract (1%), peptone (2%), distilled water and glucose or dextrose (2%).

The following mutant strains were used in this study:  $\Delta yap1$ ,  $\Delta ybp1$ ,  $\Delta ctt1$ ,  $\Delta cat1$ ,  $\Delta sod1$ ,  $\Delta sod2$ ,  $\Delta gsh1$ ,  $\Delta gsh2$ ,  $\Delta gtt1$ ,  $\Delta gtt2$ ,  $\Delta gtt3$ ,  $\Delta gpx1$ ,  $\Delta gpx2$ ,  $\Delta trx1$ ,  $\Delta trx2$ ,  $\Delta trx3$  and  $\Delta trr2$ .

### 2.3 *Growth in liquid medium*

Wild type and knockout strains cells were grown overnight (30 °C) in YPD medium with ampicillin (100 µg/mL) with shaking (250 rpm). The overnight culture was used to inoculate fresh YPD in order to re-induce exponential growth phase during the drug treatment. Concentrations curves of methylmercury (1, 2.5, 5, 10, 20 µM) and diphenyl diselenide (0.8, 1.6, 3.1, 6.25, 12.5, 25 µM) were performed using wild type strain in order to establish the concentrations for subsequent experiments. Concentrations of 1.6 and 3.1 µM of (PhSe)<sub>2</sub> and 5 and 10 µM of MeHg were chosen for the experiments with knockout strains. Compounds were added to a suspension of  $1 \times 10^5$  cells in YPD medium and incubated at 30 °C and 250 rpm during 24 hours. After, samples were diluted in water and cell density was measured in a UV-visible spectrophotometer Shimadzu UV-1650PC, in a wavelength of 600 nm, in order to evaluate inhibition of yeast growth. Data were collected through software UVProbe 2.42.

### 2.4 *Quantification of reactive oxygen species (ROS) production*

ROS production was examined by a method based on intracellular deacetylation and oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) to the fluorescent compound 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). DCFH-DA is membrane-permeable and is trapped intracellularly following deacetylation. Concentrations curves of methylmercury (1, 2.5, 5, 10, 20 µM) and diphenyl diselenide (0.8, 1.6, 3.1, 6.25, 12.5, 25 µM) were performed using the wild type strain, at different incubation times (0.5, 1.5, 3, 6 and 24 hours) at 30° C with shaking. For all strains,  $1 \times 10^6$  cells were treated with the same concentrations of (PhSe)<sub>2</sub> and MeHg used in the yeast growth inhibition test and incubated for 24 hours. After

incubation, cells suspensions were centrifuged at 3,000 rpm for 6 minutes, washed three times with PBS (pH 7.4) and re-suspend in 1 mL of PBS. Cells were labeled with 40  $\mu\text{M}$  of DCFH-DA, incubated in the dark for 60 minutes and analyzed in a flow cytometer (Machida et al., 1999). Fluorescence of cell suspension in PBS was quantified using a BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences, California, USA). Hundred thousand events were acquired for each sample. Data were collected using BD Accuri C6 Software.

### 2.5 *Cell membrane permeability*

Cell membrane integrity was estimated by staining with the vital dye propidium iodide (PI). Together with the protocol for evaluating ROS production, concentration curves at different incubation times were performed for cell membrane permeability. PI 15  $\mu\text{M}$  stock solution in PBS were added to 1 ml cell suspension ( $1 \times 10^6$ ) and cells were incubated in the dark for 15 minutes prior to analysis (Mannazzu et al., 2008). Experiments with knockout strain were performed with same concentrations of  $(\text{PhSe})_2$  (1.6 and 3.1  $\mu\text{M}$ ) and MeHg (5 and 10  $\mu\text{M}$ ) and incubation period (24 h) chosen for yeast growth inhibition and production of ROS experiments (sections 2.3 and 2.4).

### 2.6 *Labeling of cellular thiol with 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA)*

Thiol content in cells was determined using the fluorescent probe CellTracker™ Green CMFDA Dye (Nishiuchi et al., 2012). Stock solution of CMFDA was prepared in DMSO and diluted in PBS. As in previous experiments, concentrations curves were performed at different incubation times. Wild type strain was exposed to chosen concentrations of  $(\text{PhSe})_2$  (1.6 and 3.1  $\mu\text{M}$ ) and MeHg (5 and 10  $\mu\text{M}$ ) at different incubation times (0.5, 1.5, 3, 6 and 24 hours) at 30° C with shaking. Cells were washed 3 times with PBS and stained with 1  $\mu\text{M}$  CMFDA (CellTracker™ Green CMFDA) following the manufacturer's instructions. Samples were incubated with the probe for 30 minutes before analysis in the cytometer. Hundred thousand events were acquired for each sample. The data were collected using BD Accuri C6 Software.

### 2.7 *Statistics*

Experiments were repeated at least three times. For each individual experiment values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of duplicate determinations. Data were analyzed

by one-way or two-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. The results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA).

### 3. Results

#### 3.1 Growth in liquid medium

Results shown in Fig. 1A indicate that the compound  $(\text{PhSe})_2$  possesses a clear concentration range in which toxic effects were not observed (0.8-3.1  $\mu\text{M}$ ). Within this concentration range,  $(\text{PhSe})_2$  did not cause cell growth inhibition in wild type strain. Concentrations of 1.6 and 3.1  $\mu\text{M}$  were chosen to be tested in subsequent experiments.

All MeHg concentrations used (1-20  $\mu\text{M}$ ) inhibited cell growth of wild type strain when compared to control group. Concentrations of 5-20  $\mu\text{M}$  caused marked toxicity (Fig. 1B). Concentrations of 5 and 10  $\mu\text{M}$  were selected for further experiments to investigate potential protective effect of  $(\text{PhSe})_2$ .

Co-incubation of 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  with 5  $\mu\text{M}$  or 10  $\mu\text{M}$  MeHg abolished the MeHg-induced growth inhibition effect (Table 1). In the same way, co-incubation of 1.6  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  with 5  $\mu\text{M}$  prevented cell growth inhibition. On the other hand, co-incubation of 1.6  $\mu\text{M}$  of  $(\text{PhSe})_2$  with 10  $\mu\text{M}$  of MeHg could not reverse the MeHg-induced growth inhibition at a value comparable to the control group.

MeHg (5 and 10  $\mu\text{M}$ ) treatment also caused cell growth inhibition to all knockout strains tested. Co-incubation of  $(\text{PhSe})_2$  and MeHg (1.6  $\mu\text{M}$  with 5  $\mu\text{M}$ ; and 3.1 with 5 or 10  $\mu\text{M}$ ) was effective to protect from MeHg-induced growth inhibition to the knockout strains  $\Delta\text{ybp1}$ ,  $\Delta\text{ctt1}$  and  $\Delta\text{cat1}$ ,  $\Delta\text{gtt1}$ ,  $\Delta\text{gtt2}$  and  $\Delta\text{gtt3}$  and  $\Delta\text{trr2}$  (Table 1).

In knockout strain for transcription factor Yap1, concentration of 1.6  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  caused a limited protection of growth inhibition caused by 5  $\mu\text{M}$  MeHg. At 3.1  $\mu\text{M}$ ,  $(\text{PhSe})_2$  have reversed the inhibition induced by both concentrations of MeHg (5 and 10  $\mu\text{M}$ ), although, these values were not comparable to wild type strain.

In knockout strains  $\Delta\text{sod1}$  and  $\Delta\text{sod2}$ , even 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  alone caused a small inhibition in cell growth.  $(\text{PhSe})_2$  1.6  $\mu\text{M}$  could not reverse the toxicity of 5  $\mu\text{M}$  MeHg; 3  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  was able to reverse toxicity of 5  $\mu\text{M}$  MeHg, but was not effective against 10  $\mu\text{M}$  MeHg.

Both knockout strains  $\Delta\text{gsh1}$  and  $\Delta\text{gsh2}$  presented similar results as for  $\Delta\text{sod1}$  and  $\Delta\text{sod2}$ , which means that 1.6  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  was not able to prevent MeHg-induced cell growth

inhibition. In addition, co-incubation of 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  with 5  $\mu\text{M}$  MeHg prevented MeHg toxicity, but was not effective against 10  $\mu\text{M}$  MeHg.

In  $\Delta\text{gpx1}$  knockout strain, co-incubation of 1.6  $\mu\text{M}$  or 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  with 5  $\mu\text{M}$  MeHg reversed growth inhibition to control levels. On the other hand, neither 1.6  $\mu\text{M}$  nor 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  were able to protect against growth inhibition induced by 10  $\mu\text{M}$  MeHg. For  $\Delta\text{gpx2}$  knockout strain, results were similar to those obtained with  $\Delta\text{gpx1}$ , except that 1.6  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  only partially protected from growth inhibition caused by 5  $\mu\text{M}$  MeHg.

In  $\Delta\text{trx1}$ ,  $\Delta\text{trx2}$  and  $\Delta\text{trx3}$  strains, 1.6  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  could not reverse the growth inhibition induced by 5  $\mu\text{M}$  or 10  $\mu\text{M}$  MeHg, although 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  completely reversed the growth inhibition caused by both concentrations of MeHg (5  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$ ).

It is important to call attention to the fact that 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  caused a slight decrease in cell growth when compared to control for some knockout strains such as  $\Delta\text{yap1}$ ,  $\Delta\text{sod1}$ ,  $\Delta\text{sod2}$ ,  $\Delta\text{gsh2}$ ,  $\Delta\text{gpx2}$ ,  $\Delta\text{trx1}$ ,  $\Delta\text{trx2}$  and  $\Delta\text{trx3}$ .

### 3.2 *Production of reactive oxygen species*

$(\text{PhSe})_2$  caused a significant increase in ROS production when compared to control at 1.5 h, 3 h, 6 h and 24 h in concentrations of 6.25, 12.5 and 25  $\mu\text{M}$  (Fig. 2A). MeHg significantly increased ROS production when compared to control group at all incubation times tested (0.5-24 h) (Fig. 2B). At 0.5 h, only concentrations of 10 and 20  $\mu\text{M}$  MeHg significantly increased ROS production. From 1.5 h to 24h the concentrations of 5, 10 and 20  $\mu\text{M}$  MeHg significantly increased ROS production. Based on this results the incubation time of 24 h was used to study the protection of  $(\text{PhSe})_2$  against MeHg-induced ROS production and the concentrations of  $(\text{PhSe})_2$  and MeHg used in the growth inhibition experiments were maintained.

In wild type strain, co-incubation with 1.6  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  completely reversed increase in ROS production caused by 5  $\mu\text{M}$  MeHg, but only partially recovery from ROS production caused by 10  $\mu\text{M}$  MeHg. At 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  completely reversed the increase in ROS production induced by both concentrations of MeHg (5 and 10  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 3).

In  $\Delta\text{yap1}$  strain, co-incubation of 1.6  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  completely reversed 5  $\mu\text{M}$  MeHg-induced ROS production, although only partially reversed 10  $\mu\text{M}$  MeHg-induced ROS production. Co-incubation of 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  with 5 and 10  $\mu\text{M}$  MeHg partially reversed the increase in ROS production caused by the metal (Fig. 3A).

In  $\Delta\text{sod1}$  strain, co-incubation of 1.6  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  could not reverse ROS production induced by both concentrations of MeHg (5 and 10  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 3B). At 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  protected cells

from 5  $\mu\text{M}$  MeHg-induced ROS production, but only partially protected from ROS production induced by 10  $\mu\text{M}$  MeHg. For  $\Delta\text{sod2}$  strain (Fig. 3C), 1.6  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  completely protected against 5  $\mu\text{M}$  MeHg-induced ROS production, but only partially protected from 10  $\mu\text{M}$  MeHg. Similarly, 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  protected the cells against 5  $\mu\text{M}$  MeHg, but only partially protected against 10  $\mu\text{M}$  MeHg.

In  $\Delta\text{gsh1}$  (Fig. 3D) and  $\Delta\text{gsh2}$  strain (Fig. 3E), co-incubation of 1.6 and 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  with 5 and 10  $\mu\text{M}$  MeHg could not protect against MeHg-induced ROS production. Deletion of these genes induced a higher ROS production in both strains.

In  $\Delta\text{gpx1}$  (Fig. 3F) and  $\Delta\text{gpx2}$  strains (Fig. 3G), co-incubation of 1.6 or 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  with 5  $\mu\text{M}$  MeHg fully protected against MeHg-induced ROS production. However, co-incubation of 1.6  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  with 10  $\mu\text{M}$  MeHg did not protect against ROS production induced by the metal, and 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  with 10  $\mu\text{M}$  MeHg partially reversed the increase in ROS production.

In  $\Delta\text{trx1}$  (Fig. 3H),  $\Delta\text{trx2}$  (Fig. 3I) and  $\Delta\text{trx3}$  strains (Fig. 3J), co-incubations of 1.6 or 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  with 5 or 10  $\mu\text{M}$  MeHg partially protected from MeHg-induced ROS production but was not able to reverse the effect to control levels.

### 3.3 Cell membrane permeability

In order to evaluate cell membrane permeability, along with the DCFH-DA oxidation, the effect of  $(\text{PhSe})_2$  (Fig. 4A) and MeHg (Fig. 4B) on PI fluorescence was carried out. At 0.5 h, only 25  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  showed a significant increase in PI fluorescence when compared to control in wild type strain. At 1.5 h, none of  $(\text{PhSe})_2$  concentrations induced alterations in PI fluorescence (Fig. 5B). At 3 h and 6 h, significant increase in PI fluorescence was observed from 6.25  $\mu\text{M}$  to 25  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$ . At 24 hours, 12.5 and 25  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  produced a significant increase in PI fluorescence when compared to control group.

From 0.5 h to 6 h of incubation, MeHg concentrations ranging from 2.5 to 20  $\mu\text{M}$  induced a significant increase in PI fluorescence in wild type strain. At 24 h, MeHg concentrations ranging from 5 to 20  $\mu\text{M}$  caused a significant increase in PI fluorescence in wild type cells. To evaluate the protective effect of  $(\text{PhSe})_2$  on membrane damage induced by MeHg, the compounds concentrations and incubation time of 24 h were maintained the same as for DCFH-DA oxidation assay and growth inhibition experiment.

In wild type strain, co-incubation of 1.6 or 3.1  $\mu\text{M}$   $(\text{PhSe})_2$  with 5 or 10  $\mu\text{M}$  MeHg completely reversed the increase in membrane permeability caused by MeHg (Fig. 5). In the



same way, in  $\Delta sod1$  (Fig. 5B),  $\Delta gsh1$  (Fig. 5D),  $\Delta gpx2$  (Fig. 5G) and  $\Delta trx3$  (Fig. 5J) strains,  $(PhSe)_2$  (1.6 and 3.1  $\mu M$ ) also protected from increase in membrane permeability induced by MeHg (5 and 10  $\mu M$ ). Deletion of SOD1 (Fig. 5B) and GSH1 (Fig. 5D) genes increased PI fluorescence several folds when compared to wild type and other knockout strains.

In  $\Delta yap1$  (Fig. 5A),  $\Delta sod2$  (Fig. 5C),  $\Delta gsh2$  (Fig. 5E) and  $\Delta gpx1$  (Fig. 5F) strains, co-incubation of 1.6  $\mu M$   $(PhSe)_2$  with 10  $\mu M$  MeHg only partially reversed MeHg-induced increase in membrane permeability, while completely protected from 5  $\mu M$  MeHg-induced increase in PI fluorescence. At 3.1  $\mu M$   $(PhSe)_2$  fully protected against 5 or 10  $\mu M$  MeHg-induced increase in PI fluorescence.

### 3.4 Cellular thiol content

Cellular content of thiol was evaluated using the probe CMFDA. At 0.5 h incubation,  $(PhSe)_2$  caused a slight increase in thiol content only at 25  $\mu M$ . At 1.5 h and 6 h of incubation  $(PhSe)_2$  from 6.25  $\mu M$  to 20  $\mu M$  caused a significant increase in the levels in yeast. At 3 h and 24 h of incubation, 12.5 and 25  $\mu M$   $(PhSe)_2$  significantly increased thiol content (Fig. 6A). MeHg also caused a significant increase in thiol content at all concentrations tested and in all incubation periods (Fig. 6B). Co-incubation of wild type strain to 1.6  $\mu M$   $(PhSe)_2$  with 5 or 10  $\mu M$  MeHg was able to return thiol content to control levels at 0.5 h (Fig. 7A), 1.5 h (Fig. 7B) and 3 h (Fig. 7C). At 6 h (Fig. 7D) and 24 h (Fig. 7E), co-incubation of 1.6  $\mu M$   $(PhSe)_2$  with 5 or 10  $\mu M$  MeHg only partially prevented thiol increase by MeHg. Co-exposure of wild type strain to 3.1  $\mu M$   $(PhSe)_2$  with 5 or 10  $\mu M$  MeHg was able to return thiol content to the levels of control at all incubation times.

## 4. Discussion

The present study aimed to investigate mechanisms involved with protective effect of  $(PhSe)_2$  on MeHg-induced toxicity in *S. cerevisiae*. Results demonstrated  $(PhSe)_2$  was able to prevent MeHg-induced growth inhibition in *S. cerevisiae* wild type strain at 1.6 or 3.1  $\mu M$   $(PhSe)_2$  with 5  $\mu M$  MeHg or 3.1  $\mu M$   $(PhSe)_2$  with 10  $\mu M$  MeHg. However, co-exposure of 1.6  $\mu M$   $(PhSe)_2$  with 10  $\mu M$  MeHg could not prevent MeHg-induced growth inhibition. Mechanisms involved in MeHg toxicity reduction by Se are the sequestering of Hg, antioxidant effect, GSH synthesis, increased glutathione peroxidase activity, selenoproteins levels and demethylation (Syversen & Kaur, 2012). In this study, we investigated if deletion of genes

that express proteins of the antioxidant system of *S. cerevisiae* could interfere in the capacity of (PhSe)<sub>2</sub> to reduce MeHg toxicity.

The absence of YAP1 gene product decreased (PhSe)<sub>2</sub> effectiveness in counteract MeHg-induced cell growth inhibition when compounds were in a proportion of 5:1 (Hg:Se) (Table 1), suggesting that at this proportion YAP1 activation is necessary to (PhSe)<sub>2</sub> action. Yap1 transcription factor is one of the key proteins involved in regulating the response to oxidative stress induced process in *Saccharomyces cerevisiae* by exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and metals (Schnell & Entian, 1991; Wu et al., 1993; Wysocki and Tamás, 2010). It accumulates in the nucleus when it is activated by oxidative stress (Kuge et al., 1997) interacting with target genes. This restraint occurs due to oxidation of cysteine residues of Yap1, which modifies its conformation (Delaunay et al., 2002). YAP1 transcription factor is involved in activation of transcription of GSH1 (Wu & Moye-Rowley, 1994) and increases the expression of SOD1 and CAT1 genes, after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhang et al., 2003). Both Se and Hg were previously demonstrated to activate YAP1 in *S. cerevisiae* cells (Azevedo et al., 2003; Westwater et al., 2002) which strengthens the idea that (PhSe)<sub>2</sub> could activate YAP1 and induce transcription of antioxidant proteins important to mitigate MeHg oxidative effect (Scheme 1). On the other hand, (PhSe)<sub>2</sub> was still able to prevent MeHg-induced ROS production and membrane permeability alteration (Fig. 3A and 5A). Indeed, the mutant for this transcription factor still retained an adaptive response to stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, implying the involvement of other factors in that response (Stephen et al., 1995).

Ybp1 is a protein involved in the cellular response to oxidative stress. It is required for oxidation of specific cysteine residues in transcription factor Yap1, resulting in a nuclear localization of Yap1 in response to stress (Veal et al. 2003; Byrne and Wolfe, 2005). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces the formation of a complex between Yap1 and Ybp1, interacting specifically with its C-terminal part (Veal et al., 2003). Strains with deletion of Ybp1 presents a decrease resistance to oxidative stress (Higgins et al. 2002). However, Ybp1p does not seem to be a target for (PhSe)<sub>2</sub> since its absence did not influenced cell growth (Table 1).

Single deletion of CTT1 and CAT1 genes that express the enzyme catalase did not interfere in (PhSe)<sub>2</sub> capacity to prevent MeHg toxic effects (Table 1). Catalase in yeast, may have cytosolic location (catalase T, encoded by CTT1) or peroxisome (catalase A, encoded by CAT1) (Chelikani et al., 2004). Hiltunen et al. (2003) demonstrated that CAT1 is not essential for yeast cells. In addition, CTT1 deletion mutants was no more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than wild type, although the double mutant (CAT1 and CTT1) was hypersensitive, which points to a cooperative role of both catalases (Izawa et al., 1996). In this way, our results could indicate

that catalase does not participate in (PhSe)<sub>2</sub> protective mechanism or, as previously observed, that one catalase can offset the absence of other.

Glutathione S-transferases (GST) are enzymes found in all aerobic organisms. They combine the GSH endogenous and exogenous electrophilic compounds including environmental xenobiotics, heavy metals and products of oxidative stress, resulting in detoxification and elimination of their conjugate molecules (Hayes et al., 2005), although the coupling with GSH can also occur spontaneously (Rai et al. 2003; Vredenburg et al., 2013.). The yeast *S. cerevisiae* have two standard GST (encoded by GTT1 and GTT2) (Collinson & Grant, 2002). GTT3 is a protein of unknown function and location, which may be involved in GSH metabolism. The deletion of any of these three genes did not differentiate the growth of yeast under treatment with MeHg and/or (PhSe)<sub>2</sub> from the wild type strain (Table 1) suggesting that at least individually they are not essential for (PhSe)<sub>2</sub> effect, which does not discard a cooperative role of these enzymes.

Although catalase and GST activities could protect from ROS generated into yeast cells due to intoxication with MeHg, redundancy between different detoxifying enzymes may exist. This explains the fact that the deletion of a single detoxification system does not interfere significantly in the survival and cell growth.

In eukaryotes SOD presents itself in two forms: a form containing copper and zinc (Cu,Zn-SOD) encoded by SOD1 in yeast and of cytosolic and the mitochondrial intermembrane space location; and a form containing manganese (Mn-SOD), encoded by SOD2 in yeast, and located in the mitochondrial matrix (Herrero et al, 2008; Liu et al., 2010). In the present study, SOD1 and SOD2 deletion lead to inefficacy of (PhSe)<sub>2</sub> in prevent MeHg-induced cell growth inhibition when Hg:Se ratio was 5:1 (Table 1) indicating the importance of this enzyme to (PhSe)<sub>2</sub> protective effects. SOD1 deletion was demonstrated to cause a variety of phenotypes, including slow growth in respiratory conditions, viability loss in stationary phase and hypersensitivity against externally added oxidants such as paraquat and menadione (Herrero et al., 2008). SOD1 is involved in the homeostasis of the cell wall of *S. cerevisiae*. Its deletion leads to a significant increase of chitin, a structural component of cell walls of yeasts, also causing an increase in sensitivity to cell wall disturbing agents (Liu et al., 2010). It is important to note that  $\Delta$ sod1 strain caused an increase in the basal PI fluorescence when compared to wild type (Fig. 5B) indicating increased membrane permeability in the mutant strain.

Glutathione ( $\gamma$ -L-glutamyl-cysteinylglycine; GSH) is the non-protein thiol tripeptide most abundant present in all living organisms, especially in eukaryotic cells (Meister, 1981;

Meister and Anderson, 1983), contributing to various cellular processes, such as the control of the redox potential, protection against ROS, detoxification of electrophilic compounds, protein folding, sequestering of toxic metals and organic sulfur transport (May et al., 1998; Toledano et al., 2003). Glutathione is synthesized in two enzymatic steps in the cytosol. The first reaction is catalyzed by  $\gamma$ -glutamylcysteine synthase, encoded by GSH1; and second, by glutathione synthetase, encoded by GSH2 (Suzuki et al., 2011).

Mutants for GSH1 and GSH2 are still viable, although grow more slowly. In yeasts, they have defects in sporulation (Suizu et al., 1994). The GSH1 mutants induce apoptosis (Madeo et al., 1999) and even in a medium supplemented with GSH, have a high tendency for loss of mitochondrial function (Schmitt & McEntee, 1996). This explains the high emission of PI fluorescence in  $\Delta$ gsh1 strain comparing to wild type, indicating great damage to membranes (Fig. 5D). Moreover, these mutants showed no adaptive responses to stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during the exponential phase of growth in YPD medium (Izawa et al., 1995). Here, absence of gsh1p and gsh2p abolished (PhSe)<sub>2</sub> capacity to prevent growth inhibition and ROS production induced by MeHg in the ratio 5:1 (Table 1). Besides acting as antioxidant and in metal sequestering, GSH is also important in the GPx-mimetic catalytic cycle of (PhSe)<sub>2</sub> (Nogueira et al., 2004) explaining GSH importance to (PhSe)<sub>2</sub> antioxidant activity.

Studies have described the presence of three GPx in yeast, which came to be called GPx1, GPx2 and GPx3 (Inoue et al., 1999). However, further studies demonstrated that these three proteins are GPx type PHGPx - phospholipid hydroperoxide GPx (Avery & Avery, 2001). PHGPx are monomeric molecules (unlike the classical GPx, which are multimeric) and membrane associated, reducing lipid hydroperoxides membranes then being the major enzymes in the repair of lipid peroxidation in membranes (Avery & Avery, 2001). There is evidence in the literature suggesting that the activity of GPx is usually increased after exposure to Hg<sup>2+</sup> (Agarwal et al., 2010). Additionally, (PhSe)<sub>2</sub> increase the expression of GPX4 in aortic endothelial cells (de Bem et al., 2013). In the present study, deletion of GPX1 and GPX2 avoided (PhSe)<sub>2</sub> protection against MeHg-induced cell growth inhibition at a ratio of 5:1 (Table 1) confirming GPx role in (PhSe)<sub>2</sub> antioxidant properties.

Thioredoxins (Trx) are small protein rich in sulfhydryl groups that are involved in the antioxidant defense and in the maintenance of cell redox homeostasis (Arner & Holmgren, 2000). On a more general level, they participate in the modulation of redox status of cellular proteins and consequently the protein folding (Rietsch & Beckwith, 1998). *S. cerevisiae* have two cytosolic thioredoxin (Trx1 and Trx2) plus one of mitochondrial localization (Trx3) (Muller, 1991; Pedrajas et al., 1999). The yeast also have a cytosolic Trx reductase (Trr1) and

a mitochondrial (Trr2), making up two systems that act separately (one cytosolic and mitochondrial) (Pedrajas et al., 1999). The thioredoxin reductase is a homodimeric flavoprotein that in presence of NADPH, reduces oxidized thioredoxin (Zhong et al., 2000).

Deletion of either genes (TRX1 and TRX2) does not affect cell growth or morphology, but the deletion of both genes result in a prolongation of the S phase of the cell cycle and a marked increase in the level of oxidized glutathione (Muller, 1991). Deletion of the TRX2 gene results in sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thus is believed to be involved in this response (Kuge and Jones, 1994). In the present study deletions in TRX1, TRX2, TRX3, but not TRR2, affected (PhSe)<sub>2</sub> capacity to prevent MeHg-induced cell growth inhibition at concentrations of 5 μM MeHg with 1.6 μM (PhSe)<sub>2</sub> (Fig. ). TrxR of mammals was demonstrated to reduce (PhSe)<sub>2</sub> to its selenol which contributes to antioxidant properties of the compound (Freitas et al., 2010). However, at the present study TRR2 does not seem to be necessary to (PhSe)<sub>2</sub> action. Alternatively, mammal Trx was demonstrated to increase ebselen reduction suggesting that a similar mechanism could be applied to (PhSe)<sub>2</sub> in yeast (Zhao et al., 2002).

In the current study, both MeHg and (PhSe)<sub>2</sub> caused an increase in thiol content in *S. cerevisiae* wild type strain. Jin et al. (2008) demonstrated that expression of genes in sulphate assimilation and GSH biosynthesis pathways is stimulated by Hg. An adaptive response of cell to oxidative stress could be one explanation for increased cellular thiol levels. Thus, reduction of such levels by co-exposure of (PhSe)<sub>2</sub> and MeHg is an additional evidence of protective role of this selenoorganic compound.

It is interesting to note that when yeast cells were exposed to 10 μM MeHg and 3.1 μM (PhSe)<sub>2</sub> which represents a ratio Hg:Se of 2.5:1, the effect of MeHg was always prevented even in the knockout strains tested, whereas 5 μM MeHg with 1.6 μM (PhSe)<sub>2</sub> which represents a ratio Hg:Se of 10:1 did not altered MeHg-induced cell growth inhibition. These results reinforce the hypothesis of Hg sequestering by the PhSe<sup>-</sup> with formation of a complex MeHgSePh. Notwithstanding, other mechanisms related to the uptake and excretion of such complex should be further investigated.

## 5. Conclusions

In conclusion, the present study sheds light on the mechanisms involved in (PhSe)<sub>2</sub> protection against MeHg toxicity indicating a role of (PhSe)<sub>2</sub> in activate the transcription factor YAP1 leading to the expression of important antioxidant defenses in *S. cerevisiae* (scheme 1). These data corroborate other studies in literature which suggests a role of (PhSe)<sub>2</sub> in modulate gene

expression of antioxidant enzymes (Dias et al., 2014). Genetic and functional similarity between yeast and mammalian cells suggests that elucidation of molecular pathways through which (PhSe)<sub>2</sub> protects from toxic metals in yeast will help to direct the research of mechanisms for humans.

### Acknowledgments

Supported by FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) #2251-2551/14-7 (SIAFEM), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (Universal) #461000/2014-8.

### References

- AGARWAL, R., RAISUDDIN, S., TEWARI, S., GOEL, S. K., RAIZADA, R. B., BEHARI, J. R., 2010. Evaluation of comparative effect of pre- and posttreatment of selenium on mercury-induced oxidative stress, histological alterations, and metallothionein mRNA expression in rats. **J Biochem Mol Toxic** 24, 123–135.
- ALAEJOS, M. S., DIAZ ROMERO, F. J., DIAZ ROMERO, C., 2000. Selenium and cancer: some nutritional aspects. **Nutrition** 16, 376–383.
- ARNER, E. S.; HOLMGREN, P., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Eur J Biochem** 267, 6102–6109.
- ARTHUR, J. R., 2000. The glutathione peroxidases. **Cell Mol Life Sci** 57, 1825–1835.
- ATTFIELD, P., BELL, P. J. L., KLETSAS, S., VAN ROOIJEN, R., VEAL, D. A., 2008. Use of flow cytometry to monitor cell damage and predict fermentation activity of dried yeasts. **J Appl Microbiol** 89, 207-214.
- AVERY, A. M., AVERY, S. V., 2001. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. **J Biol Chem** 276, 33730–33735.
- BYRNE, K. P., WOLFE, K. H., 2005. The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. **Genome Res** 15(10), 1456-1461.
- CHELIKANI, P., FITA, I., LOEWEN, P. C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. **Cell Mol Life Sci** 61, 192–208.

- COLLINSON, E. J., GRANT, C. M., 2003. Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. **J. Biol. Chem.** 278, 22492–22497.
- COUNTER, S. A., BUCHANAN, L. H., 2004. Mercury exposure in children: a review. **Toxicol Appl Pharm** 198, 209-230.
- DALLA-CORTE, C. L., SOARES, F. A. A., ASCHNER, M., ROCHA, J. B. T., 2012. Diphenyl diselenide prevents methylmercury-induced mitochondrial dysfunction in rat liver slices. **Tetrahedron** 68, 10437-10443.
- DALLA CORTE, C., WAGNER, C., SUDATI, J. H., COMPARSI, B., LEITE, G. O., BUSANELLO, A., SOARES, F. A. A., ASCHNER, M., ROCHA, J. B. T., 2013. Effects of Diphenyl Diselenide on Methylmercury Toxicity in Rats. **BioMed Res Int**, 1-12.
- DAVEY, H. M., 2002. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. **Methods in Cell Science** 24(7), 91-97.
- DE BEM, A. F., FIUZA, B., CALCERRADA, P., BRITO, P. M., PELUFFO, G., DINISA, T. C. P., TRUJILLO, M., ROCHA, J. B. T., RADI, R., ALMEIDA, L. M., 2010. Protective effect of diphenyl diselenide against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A comparison with ebselen. **Nitric Oxid** 31, 20-30.
- DEERE, D., SHEN, J., VESEY, G., BELL, P., BISSINGER, P., VEAL, D., 1998. Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. **Yeast** 14, 147–160.
- DELAUNAY, A., PFLIEGER, D., BARRAULT, M., VINH, J., TOLEDANO M. B., 2002. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox transducer in gene activation. **Cell** 111, 471–481.
- DIAS, G. R. M., GOLOMBIESKI, R. M., PORTELLA, R. L., AMARAL G. P., SOARES, F. A., ROCHA, J. B. T. NOGUEIRA, C. W., BARBOSA, N. V., 2014. Diphenyl diselenide modulates gene expression of antioxidant enzymes in the cerebral cortex, hippocampus and striatum of female hypothyroid rats. **Neuroendocrinology** 100(1), 45-59.
- DOS SANTOS, S. C., TEIXEIRA, M. C., CABRITO, T. R., SÁ-CORREIA, I., 2012. Yeast toxicogenomics: genomewide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology, and biotechnology. **Front Genet** 3(63), 1-17.
- DYRSSEN, D., WEDBORG, M., 1991. The sulfur–mercury(II) system in natural waters. **Water Air Soil Poll** 56, 507–519.
- FARINA, M., ASCHNER, M., ROCHA, J. B., 2011. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicol Appl Pharm** 256, 405–417.

- FARINA, M., ROCHA, J. B. T., 2003. Methylmercury Increases Glutamate Release from Brain Synaptosomes and Glutamate Uptake by Cortical Slices from Suckling Rat Pups: Modulatory Effect of Ebselen. **Toxicol Sci** 73(1), 135-140.
- FAUCHON, M., LAGNIEL, G., AUDE, J. C., LOMBARDIA, L., SOULARUE, P., PETAT, C., MARGUERIE, G., SENTENAC, A., WERNER, M., LABARRE, J., 2002. Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. **Mol Cell** 9, 713–723.
- FREITAS, A. S., FUNCK, V. R., ROTTA, M. S., BOHRER, D., MORSHBASCHER, V., PUNTEL, R. L., NOGUEIRA, C. W., FARINA, M., ASCHNER, M., ROCHA, J. B. T., 2009. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. **Brain Res Bull** 79, 77-84.
- FREITAS, A. S., PRESTES, A. S., WAGNER, C., SUDATI, J. H., ALVES, D., PORCIÚNCULA, L. O., KADE, I. J., ROCHA, J. B. T., Reduction of Diphenyl Diselenide and Analogs by Mammalian Thioredoxin Reductase Is Independent of Their Gluthathione Peroxidase-Like Activity: A Possible Novel Pathway for Their Antioxidant Activity. **Molecules** 15(11), 7699-7714.
- FUKUDA, Y., USHIJIMA, K., KITANO, T., SAKAMOTO, M., FUTATSUKA, M., 1999. An analysis of subjective complaints in a population living in a methylmercury-polluted area. **Environ Res** 81, 100-107.
- GLASER, V., MORITZ, B., SCHMITZ, A., DAFRÉ, A. L., NAZARI, E. M., MULLER, Y. M. R., FEKSA, L., STRALIOTTO, R., DE BEM, A. F., FARINA, M., ROCHA, J. B. T., LATINI, A., 2013. Protective effects of diphenyl diselenide in a mouse model of brain toxicity. **Chem-Biol Interact** 206, 18–26.
- HAYES, J. D., FLANAGAN, J. U., JOWSEY, I. R., 2005. Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol** 45, 51–88.
- HASSAN, W., SILVA, C. E. B., ROCHA, J. B. T., LANDEIRA-FERNANDEZ, J., 2015. Modulatory effect of diphenyl diselenide in Carioca High- and Low-conditioned Freezing rats. **Eur J Pharmacol** 761, 341-344.
- HERRERO, E., ROS, J., BELLÍ, G., CABISCOL, E., 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochim Biophys Acta** 1780, 1217–1235.
- HILTUNEN, J. K., MURSULA, A. M., ROTTENSTEINER, H., WIERENGA, R. K., KASTANIOTIS, A. J., GURVITZ, A., 2003. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Rev** 27, 35–64.



- HUGHES, W. L., 1957. A physicochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. **Ann N Y Acad of Sci** 65, 454–460.
- INOUE, Y., MATSUDA, T., SUGIYAMA, K. I., IZAWA, S., KIMURA, A., 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 274, 27002–27009.
- IZAWA, S., INOUE, Y., KIMURA, A., 1996. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem J** 32, 61-67.
- IZAWA, S., INOUE, Y., KIMURA, A., 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett** 368, 73-76.
- JIN, Y. H., DUNLAP, P. E., MCBRIDE, S. J., AL-REFAI, H., BUSHEL, P. R., FREEDMAN, J. H., 2008. Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. **PLoS Genet** 4(4).
- KRYUKOV, G. V., CASTELLANO, S., NOVOSELOV, S. V., LOBANOV, A. V., ZEHTAB, O., GUIGO, R., GLADYHEV, V. N., 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science** 300, 1439–1443.
- KUGE, S., JONES, N., NOMOTO, A., 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. **EMBO J** 16, 1710-1720.
- KUGE, S., JONES, N., 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. **EMBO J** 13(3), 665-664.
- LIU, X., ZHANG, X., ZHANG, Z., 2010. Cu,Zn-superoxide dismutase is required for cell wall structure and for tolerance to cell wall-perturbing agents in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett** 584(6), 1245–1250.
- MACHIDA, K., TANAKA, T., TANIGUCHI, M., 1999. Depletion of glutathione as a cause of the promotive effects of polygodial, a sesquiterpene on the production of reactive oxygen species in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biosci Bioeng** 88(5), 526-530.
- MADEO, F., FRÖLICH, E., LIGR, M., GREY, M., SIGRIST, S. J., WOLF, D. H., FRÖLICH, K. U., 1999. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. **J Cell Biol** 145, 757-767.
- MANNAZZU, I., ANGELOZZI, D., BELVISO, S., BUDRONI, M., FARRIS, G. A., GOFFRINI, P., LODI, T., MARZONA, M., BARDI, L., 2008. Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on

- synthetic medium: cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. **Int J Food Microbiol** 121, 84-91.
- MAY, M. J., VERNOUX, T., LEAVER, T., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D., 1998. Glutathione homeostasis in plants: implication for environmental sensing and plant development. **J Exp Bot** 49, 649–667.
- MEISTER, A, ANDERSON, M. E., 1983. Glutathione. **Annu Rev Biochem** 52, 711–760.
- MEISTER, A., 1981. Metabolism and function of glutathione. **TIBS** 6, 231-234.
- MOREIRA, R. R., DE OLIVEIRA, R. B., SAFFI, J., BRAGA, A. L., ROESLER, R., DAL-PIZZOL, F., FONSECA, J. C. M., BRENDEL, M., PÊGAS, J. A. H., 2005. Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. **Life Sci** 77(77), 2398-2411.
- MORI, N., YASUTAKE, A., HIRAYAMA, K., 2007. Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. **Arch Toxicol** 81, 769–776.
- MULLER, E. G. D., 1991. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. **J Biol Chem** 266, 9194–9202.
- NEWLAND, M. C., DONLIN, W. D., PALESTZ, E. M., BANNA, K. M., 2006. Developmental behavioral toxicity of methylmercury. In: LEVIN, E. D., BUCCAFUSCO, J. J., editors. **Animal models of cognitive impairment**. Boca Raton, FL: CRC Press; 101–146, 2006.
- NISHIUCHI, H., TABIRA, Y., YAMAGISHI, K., 2012. A combination of flow cytometry and traditional screening using chemicals to isolate high glutathione-producing yeast mutants. **Biosci Biotechnol Biochem** 76(6), 1085-1090.
- NOGUEIRA, C. W., ROCHA, J. B. T., 2010. Diphenyl diselenide: a janus-faced molecule. **J Braz Chem Soc** 21, 2055-2071.
- NOGUEIRA, C. W., ROCHA, J. B. T., 2011. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Arch Toxicol** 85, 1313–1359.
- NOGUEIRA, C. W., ZENI, G., ROCHA, J. B. T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem Rev** 104, 255–285.
- PEDRAJAS, J. R., KOSMIDOU, E., MIRANDA-VIZUETE, A., GUSTAFFSON, J. A., WRIGHT, A. P. H., SPYROU, G., 1999. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 274, 6566–6573.

- RABENSTEIN, D. L., 1973. Nuclear magnetic resonance studies of the acid-base chemistry of amino acids and peptides. I. Microscopic ionization constants of glutathione and methylmercury-complexed glutathione. **J Am Chem Soc** 95(9), 2797–2803.
- RAI, R., TATE, J. J., COOPER, T. G., 2003. Ure2, a prion precursor with homology to glutathione S-transferase, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from heavy metal ion and oxidant toxicity. **J Biol Chem** 278, 12826–12833.
- RALSTON, N. V., RALSTON, C. R., BLACKWELL, J. L. III, RAYMOND, L. J., 2008. Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity. **Neurotoxicology** 29, 802-811.
- RIETSCH, A., BECKWITH, J., 1998. The genetics of disulphide bond metabolism. **Annu Rev Genet** 32, 163–184.
- RODERER, G., 1983. Differential toxic effects of mercuric chloride and methylmercuric chloride on the freshwater alga *Poteroiochromonas malhamensis*. **Aquat Toxicol** 3, 23-34.
- ROSA, R. M., MOURA, D. J., ROMANO, E. S. A. C., SAFII, J., HENRIQUES, J. A. P., 2007. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. **Mutat Res** 631, 44–54.
- SCHNELL, N., ENTIAN, K. D., 1991. Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (PAR1) conferring resistance to iron chelators. **Eur J Biochem** 200(2), 487-493.
- SCHMITT, A. P., MCENTEE, K., 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **PNAS** 93, 5777-5782.
- STEPHEN, D. W. S., RIVERS, S. L., JAMIESON, D. J., 1995. The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol** 16, 415–423.
- SUIZU, T., TSUTSUMI, H., OHTAKE, Y., KAWADO, A., IMAYASU, S., KIMURA, A., MURATA, K., 1994. Absolute glutathione requirement for sporulation of a yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem Biophys Res Commun** 205, 1151–1155.
- SUZUKI, T., YOKOYAMA, A., TSUJI, T., IKESHIMA, E., NAKASHIMA, K., IKUSHIMA, S., KOBAYASHI, C., YOSHIDA, S., 2011. Identification and characterization of genes involved in glutathione production in yeast. **J Biosci Bioeng** 112(2), 107–113.
- SYVERSEN, T., KAUR, P., 2012. The toxicology of mercury and its compounds. **J Trace Elem Med Biol.** 26(4), 215-226.

- TOLEDANO, M., DELANEY, A., BITEAU, B., SPECTOR, D., AZEVEDO, D., 2003. Oxidative stress responses in yeast. **Top Curr Genet** 1, 241–303.
- VEAL, E. A., ROSS, S. J., MALAKASI, P., PEACOCK, E., MORGAN, B. A., 2003. Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. **J Biol Chem** 278(33), 30896-30904.
- VREDENBURG, G., VASSELL, K. P. T., COMMANDEUR, J. N. M., VERMEULEN, N. P. E., VOS, J. C., 2013. Reconstitution of the interplay between cytochrome P450 and human glutathione S-transferases in clozapine metabolism in yeast. **Toxicol Lett** 222, 247-256.
- WAGNER, C., SUDATI, J. H., NOGUEIRA, C. W., ROCHA, J. B., 2010. In vivo and in vitro inhibition of mice thioredoxin reductase by methylmercury. **Biometals** 23, 1171–1177.
- WU, A. L., MOYE-ROWLEY, W. S., 1994. GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. **Mol Cell Biol** 14, 5832-5839.
- WU, A., WEMMIE, J. A., EDGINGTON, N. P., GOEBL, M., GUEVARA, J. L., MOYE-ROWLEY, W. S., 1993. Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. **J Biol Chem** 268(25), 18850-18858.
- WYSOCKI, R., TAMÁS, M. J., 2010. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. **FEMS Microbiol Rev** 34(6), 925-951.
- ZHANG, L., ONDA, K., IMAI, R., FUKUDA, R., HORIUCHI, H., OHTA, A., 2003. Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem Bioph Res Co** 307, 308–314.
- ZHENG, W. J., OUYANG, Z., 2001. **Organic selenium compounds from plants: Their chemistry and applications in medicine**. Guangzhou: Jinan University Press.
- ZHONG, L., ARNÉR, E. S. J., HOLMGREN, A., 2000. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenothiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. **PNAS** 97, 5854-5859.
- ZYRACKA, E., ZADRAG, R., KOZIOL, S., KRZEPILKO, A., BARTOSZ, G., BILINSKI, T., 2005. Yeast as a biosensor for antioxidants: Simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase. **Acta Biochim Pol** 52(3), 679–684.

Scheme 1

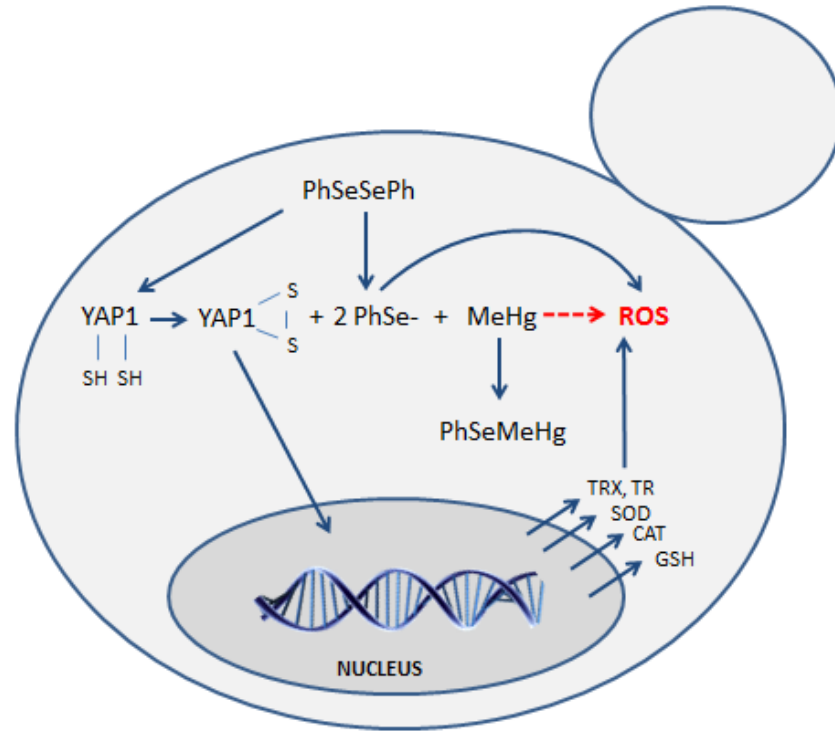
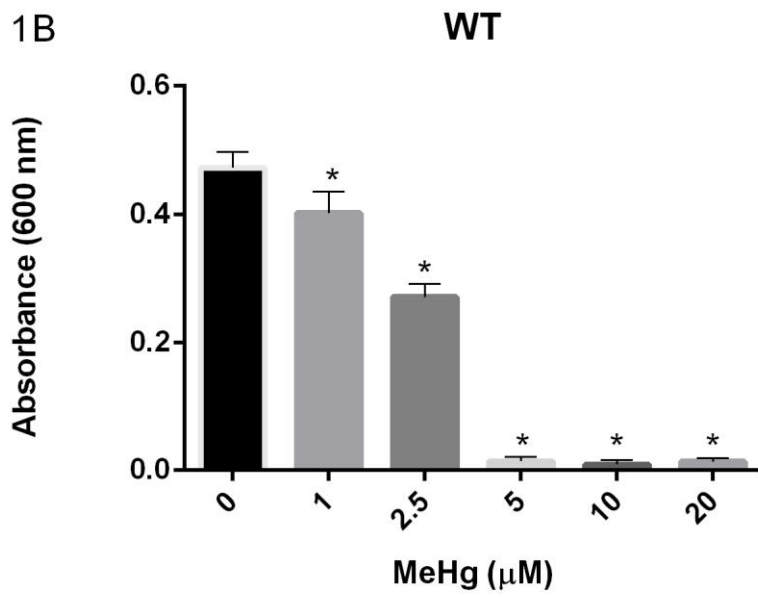
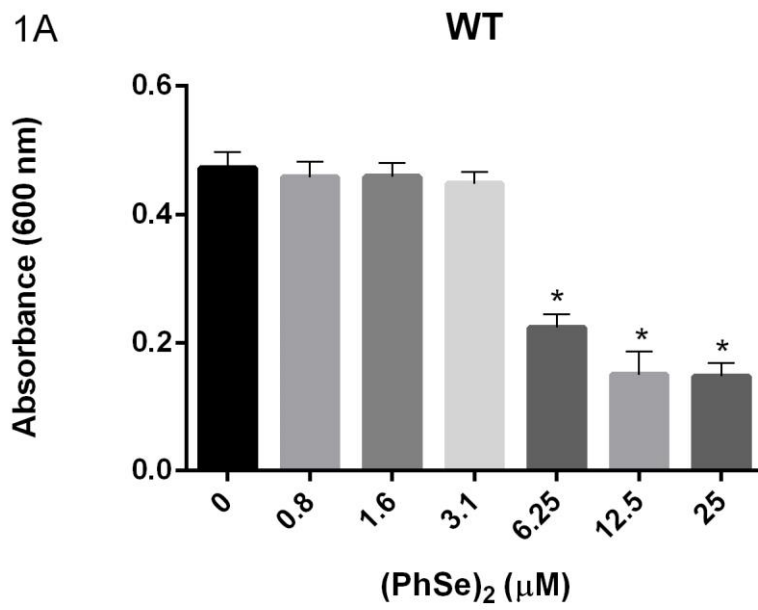


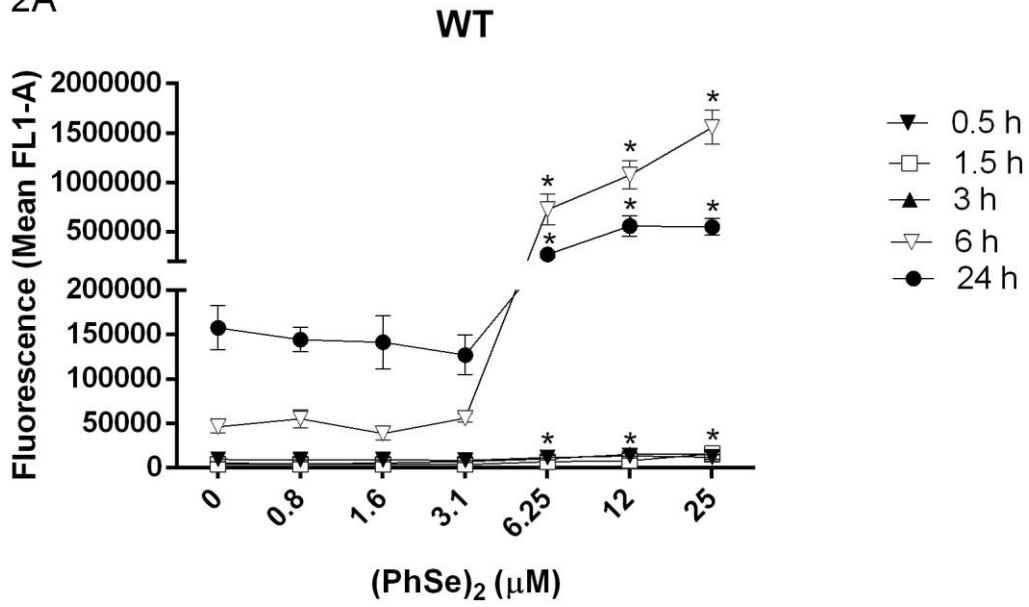
Table 1

	Control	(PhSe) <sub>2</sub> 1.6 μM	(PhSe) <sub>2</sub> 3.1 μM	MeHg 5 μM	MeHg 10 μM	MeHg 5 μM + (PhSe) <sub>2</sub> 1.6 μM	MeHg 10 μM + (PhSe) <sub>2</sub> 1.6 μM	MeHg 5 μM + (PhSe) <sub>2</sub> 3.1 μM	MeHg 10 μM + (PhSe) <sub>2</sub> 3.1 μM
<b>WT</b>	0.473±0.025	0.456±0.021	0.444±0.016	0.014±0.007*	0.008±0.007*	0.449±0.016 <sup>#</sup>	0.009±0.003*	0.481±0.023 <sup>#</sup>	0.447±0.030 <sup>#</sup>
<b>Δyap1</b>	0.526±0.029	0.488±0.030	0.388±0.014*	0.017±0.010*	0.019±0.013*	0.055±0.011* <sup>#</sup>	0.015±0.005*	0.481±0.030* <sup>#</sup>	0.305±0.052* <sup>#</sup>
<b>Δybp1</b>	0.540±0.023	0.521±0.025	0.526±0.031	0.019±0.011*	0.017±0.006*	0.500±0.038 <sup>#</sup>	0.027±0.022*	0.492±0.018 <sup>#</sup>	0.475±0.029 <sup>#</sup>
<b>Δcat1</b>	0.530±0.014	0.495±0.025	0.504±0.019	0.015±0.005*	0.014±0.002*	0.504±0.021 <sup>#</sup>	0.018±0.008*	0.480±0.012 <sup>#</sup>	0.501±0.041 <sup>#</sup>
<b>Δctt1</b>	0.504±0.037	0.492±0.035	0.496±0.034	0.015±0.006*	0.016±0.006*	0.501±0.040 <sup>#</sup>	0.017±0.007*	0.466±0.029 <sup>#</sup>	0.485±0.035 <sup>#</sup>
<b>Δsod1</b>	0.488±0.019	0.442±0.035	0.403±0.008	0.005±0.006*	0.004±0.005*	0.010±0.008*	0.003±0.004*	0.402±0.027* <sup>#</sup>	0.009±0.008*
<b>Δsod2</b>	0.475±0.027	0.474±0.035	0.423±0.016	0.007±0.011*	0.009±0.006*	0.012±0.007*	0.006±0.004*	0.432±0.018* <sup>#</sup>	0.014±0.010*
<b>Δgsh1</b>	0.489±0.047	0.476±0.030	0.415±0.052	0.011±0.004*	0.010±0.005*	0.010±0.004*	0.009±0.004*	0.450±0.032* <sup>#</sup>	0.014±0.007*
<b>Δgsh2</b>	0.502±0.044	0.470±0.043	0.382±0.037*	0.013±0.010*	0.010±0.006*	0.037±0.014*	0.010±0.005*	0.462±0.036 <sup>#</sup>	0.029±0.013*
<b>Δglt1</b>	0.535±0.020	0.500±0.058	0.508±0.037	0.018±0.005*	0.015±0.006*	0.532±0.025 <sup>#</sup>	0.022±0.005*	0.463±0.030 <sup>#</sup>	0.513±0.033 <sup>#</sup>
<b>Δglt2</b>	0.515±0.031	0.460±0.035	0.487±0.031	0.020±0.004*	0.016±0.002*	0.518±0.029 <sup>#</sup>	0.021±0.005*	0.464±0.040 <sup>#</sup>	0.518±0.015 <sup>#</sup>
<b>Δglt3</b>	0.535±0.025	0.514±0.029	0.533±0.028	0.023±0.007*	0.016±0.002*	0.520±0.038 <sup>#</sup>	0.020±0.005*	0.489±0.019 <sup>#</sup>	0.491±0.029 <sup>#</sup>
<b>Δgpx1</b>	0.456±0.026	0.460±0.031	0.433±0.031	0.013±0.011*	0.009±0.005*	0.449±0.022 <sup>#</sup>	0.011±0.008*	0.469±0.038 <sup>#</sup>	0.019±0.011*
<b>Δgpx2</b>	0.475±0.012	0.458±0.032	0.382±0.023*	0.020±0.023*	0.010±0.010*	0.231±0.025* <sup>#</sup>	0.012±0.012*	0.504±0.037 <sup>#</sup>	0.029±0.016*
<b>Δtrx1</b>	0.495±0.034	0.482±0.048	0.410±0.028*	0.015±0.006*	0.016±0.006*	0.025±0.011*	0.015±0.004*	0.487±0.040 <sup>#</sup>	0.479±0.028 <sup>#</sup>
<b>Δtrx2</b>	0.510±0.043	0.493±0.051	0.426±0.044*	0.020±0.006*	0.015±0.006*	0.022±0.007*	0.017±0.008*	0.476±0.048 <sup>#</sup>	0.458±0.036 <sup>#</sup>
<b>Δtrx3</b>	0.517±0.049	0.494±0.031	0.403±0.023*	0.023±0.009*	0.022±0.006*	0.024±0.006*	0.024±0.009*	0.479±0.036 <sup>#</sup>	0.480±0.047 <sup>#</sup>
<b>Δtrr2</b>	0.508±0.053	0.499±0.040	0.485±0.037	0.021±0.009*	0.017±0.005*	0.485±0.032 <sup>#</sup>	0.022±0.008*	0.471±0.046 <sup>#</sup>	0.498±0.029 <sup>#</sup>

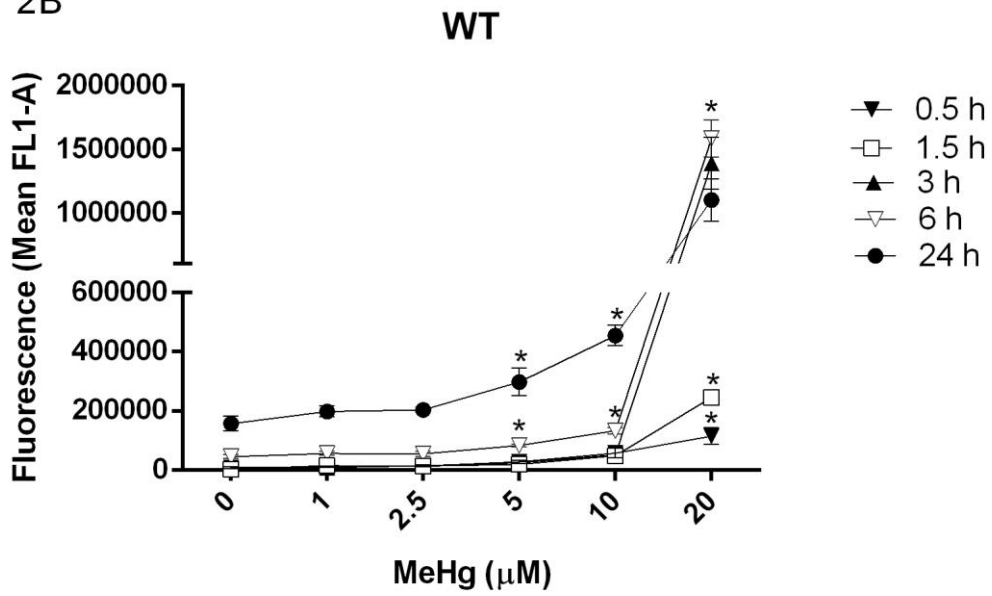
## Figures



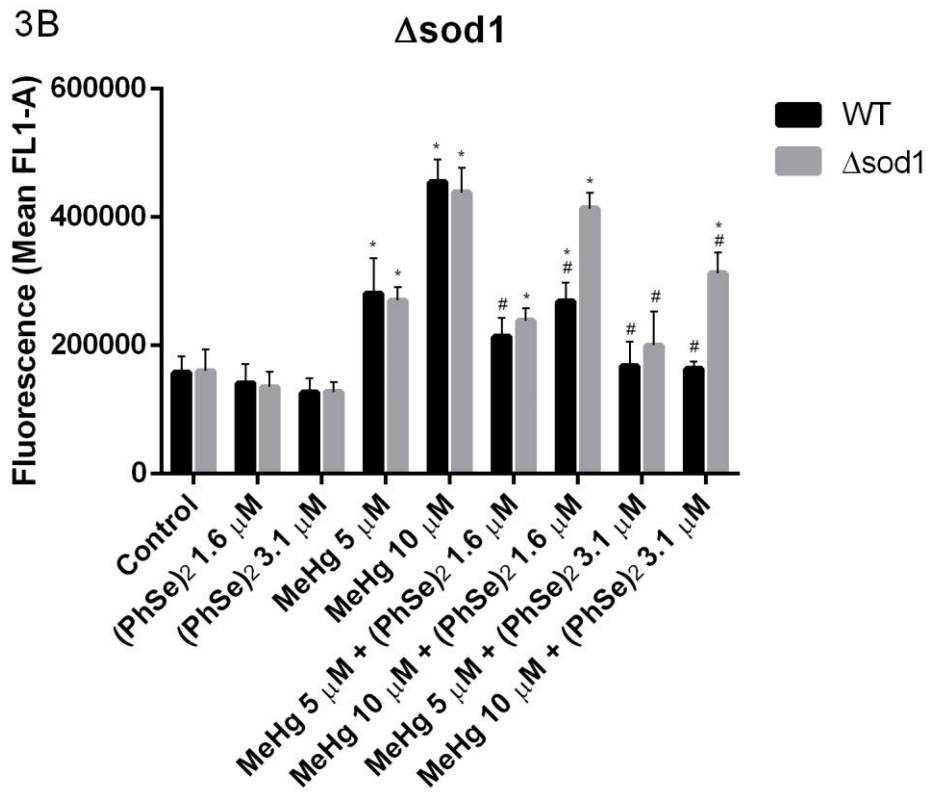
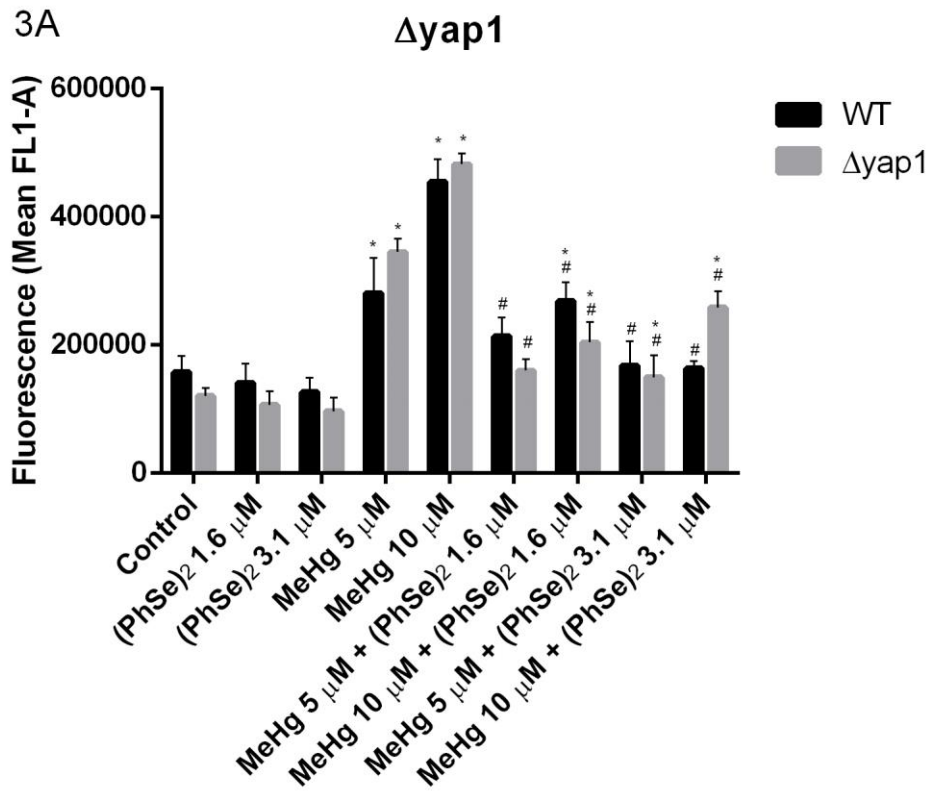
2A

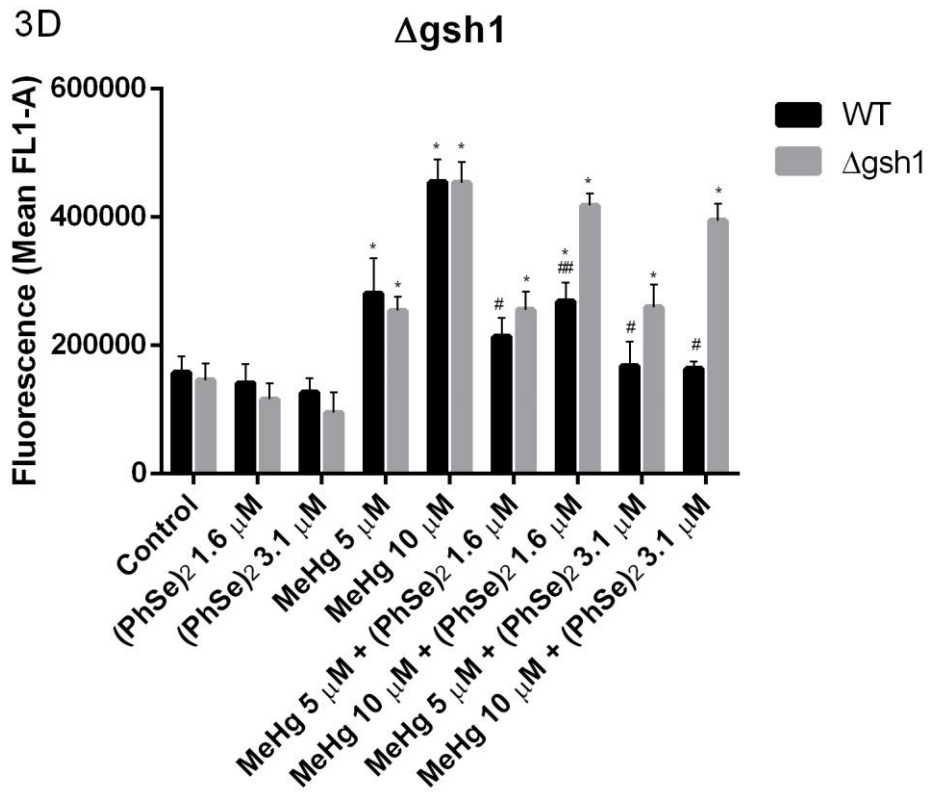
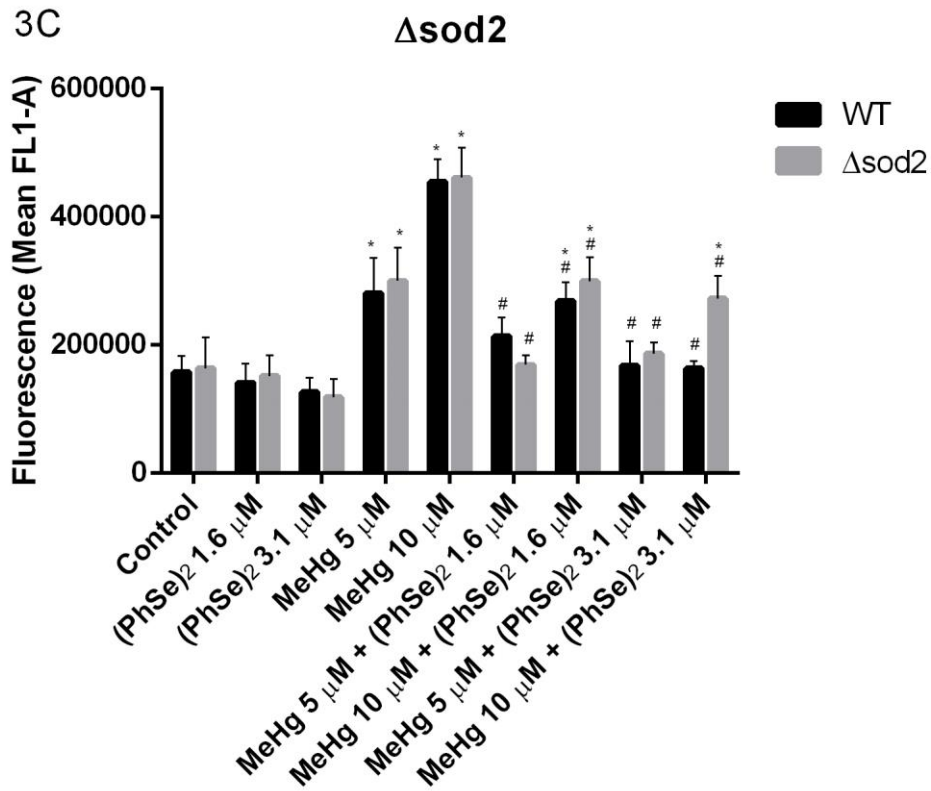


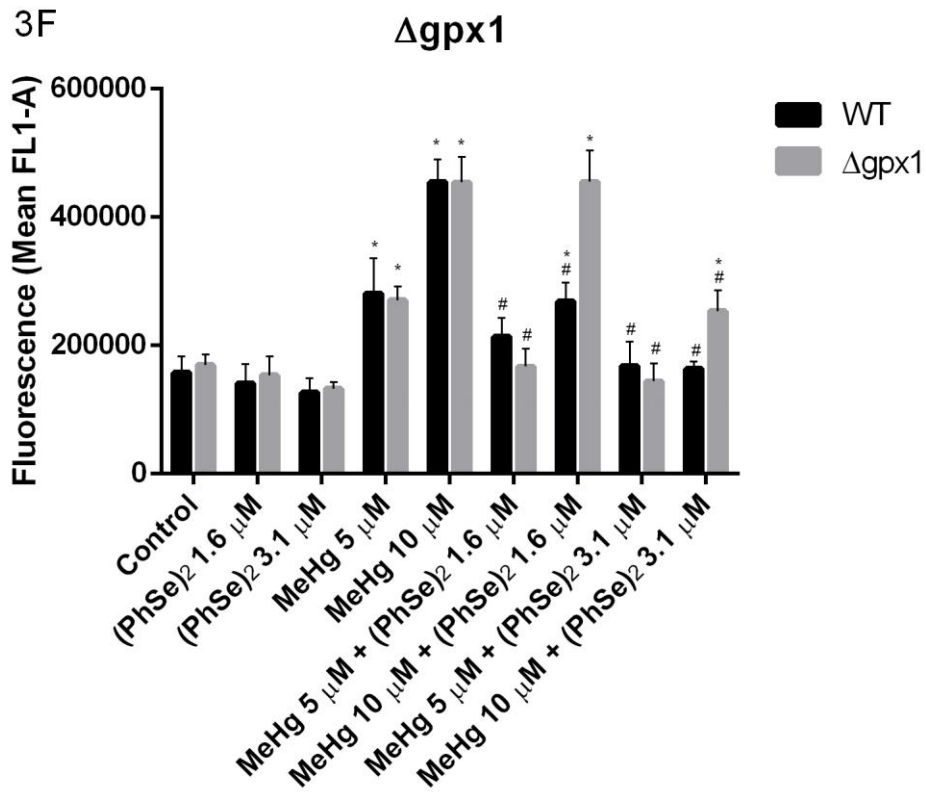
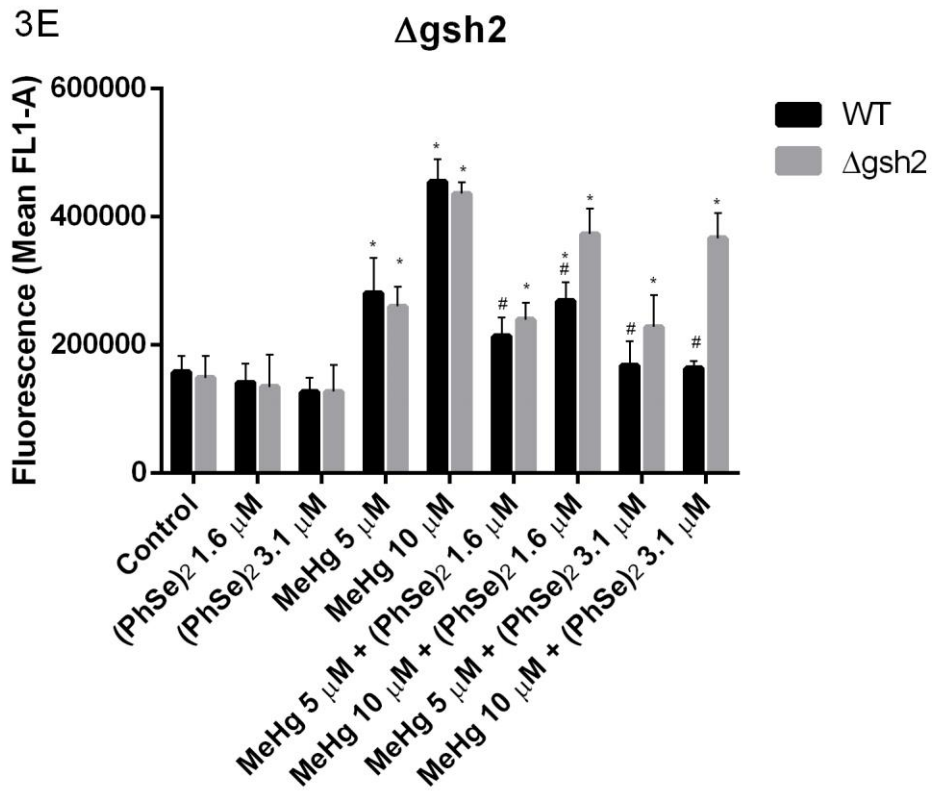
2B

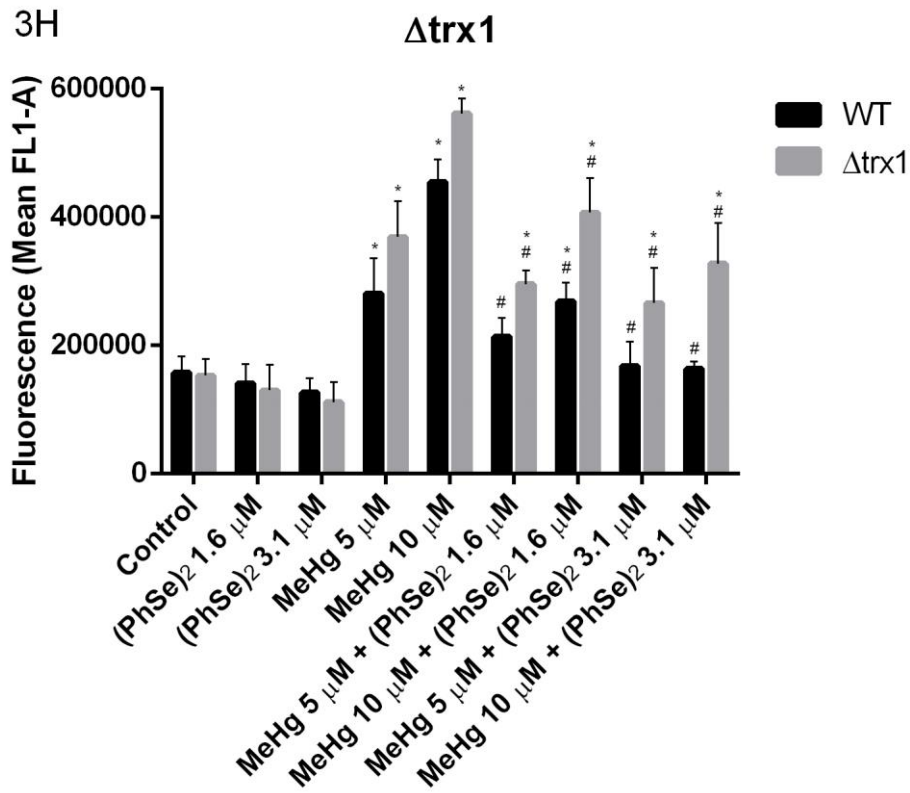
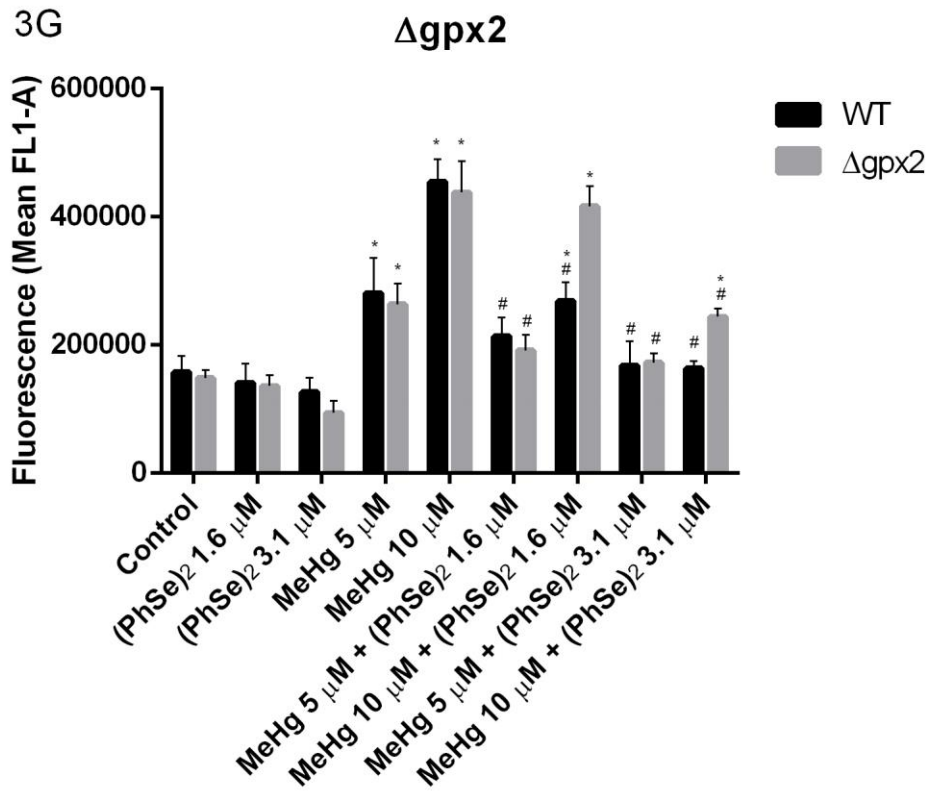


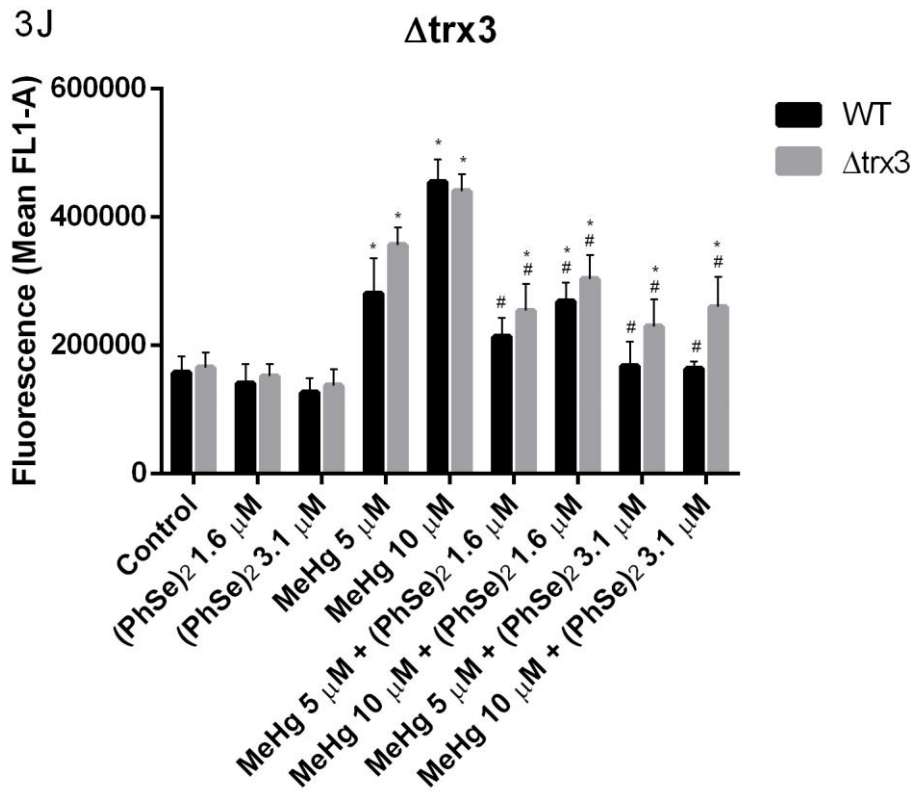
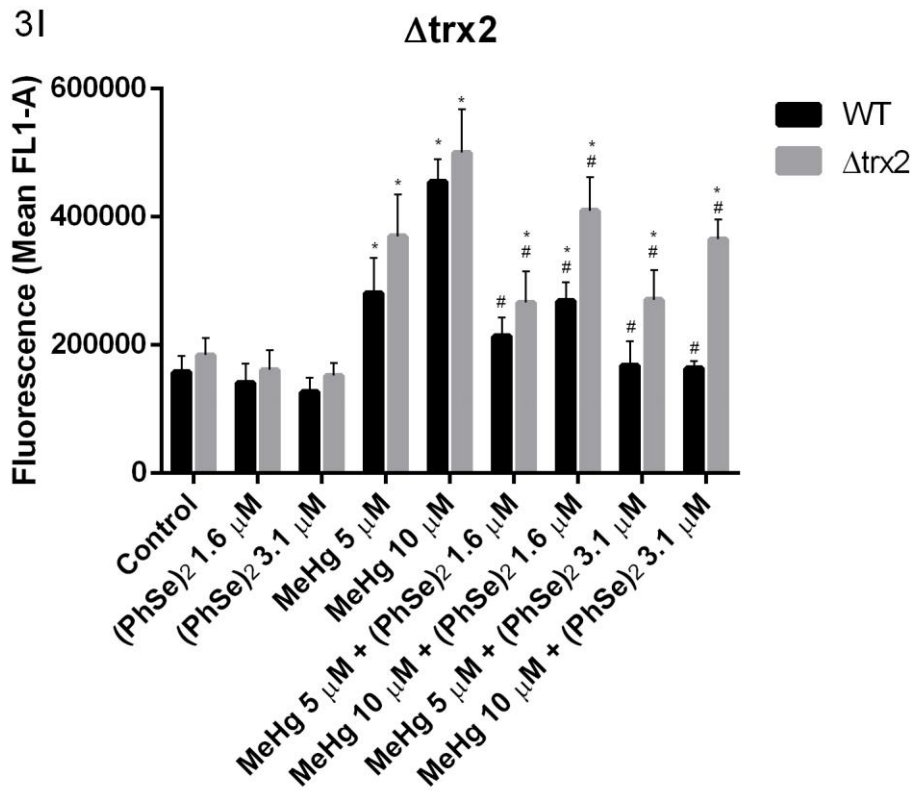






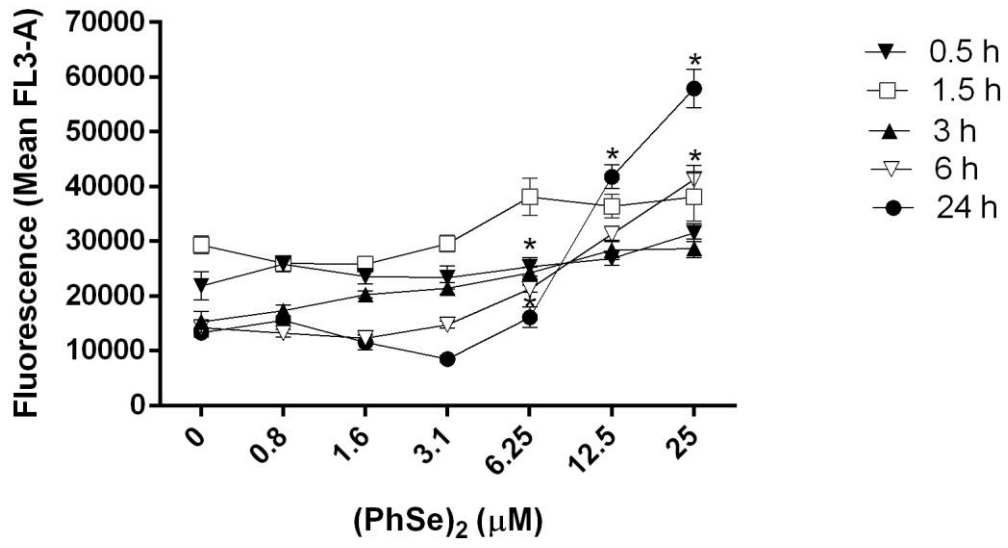






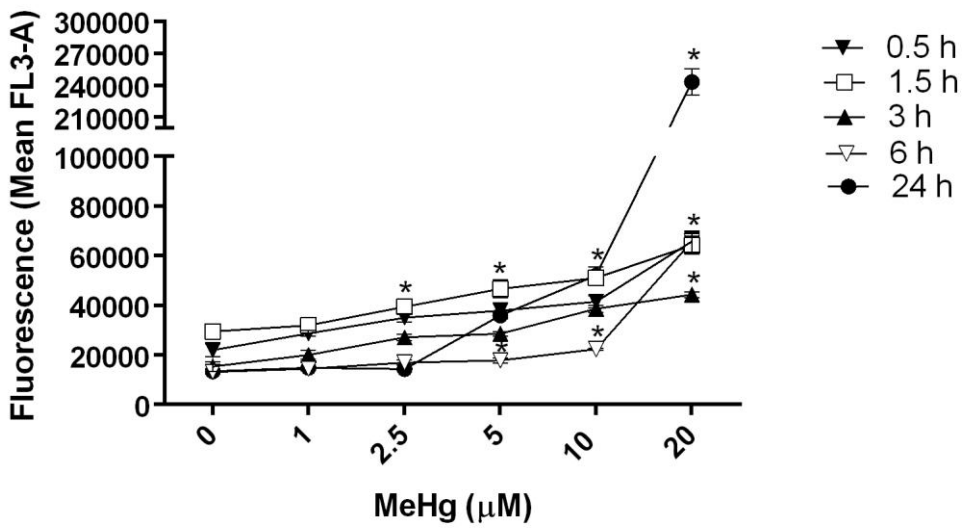
4A

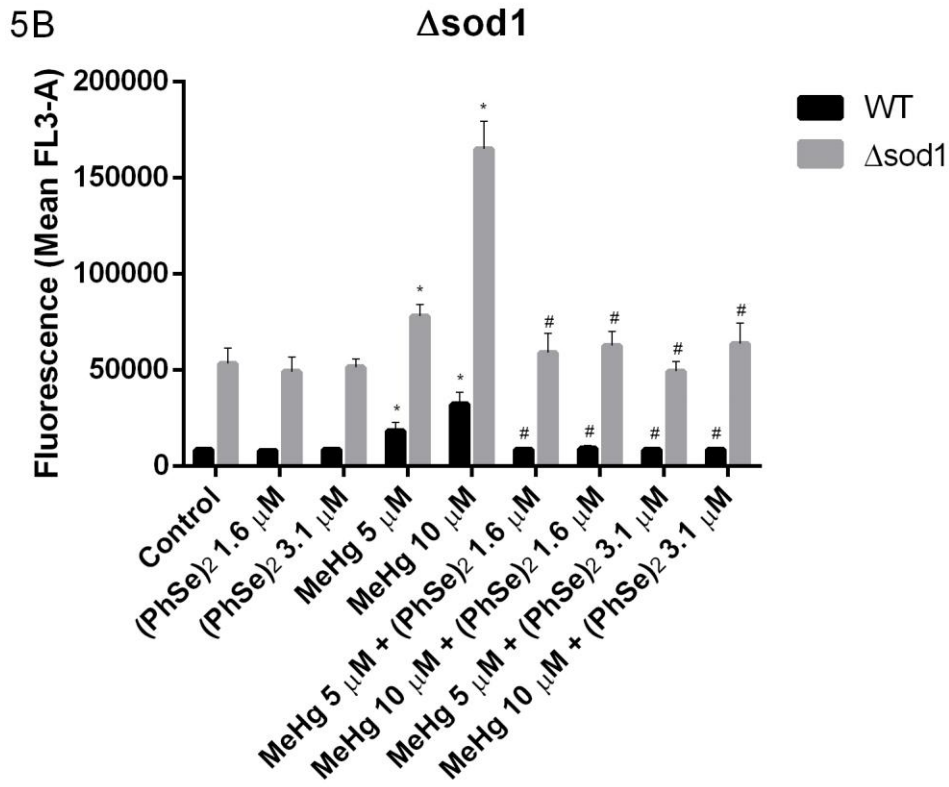
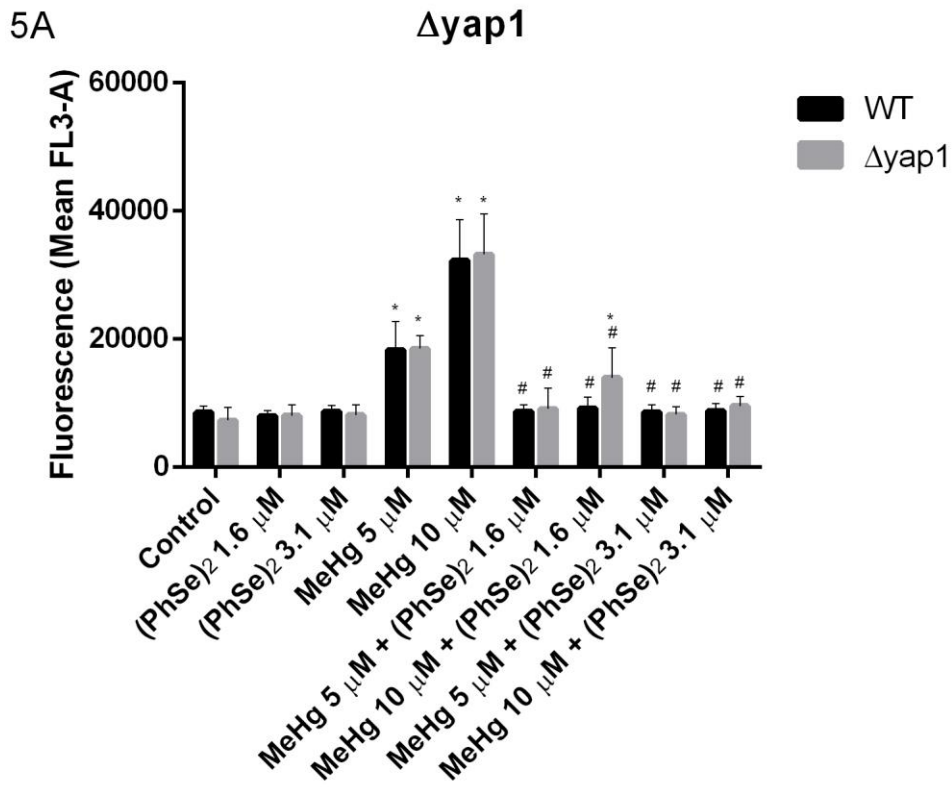
WT



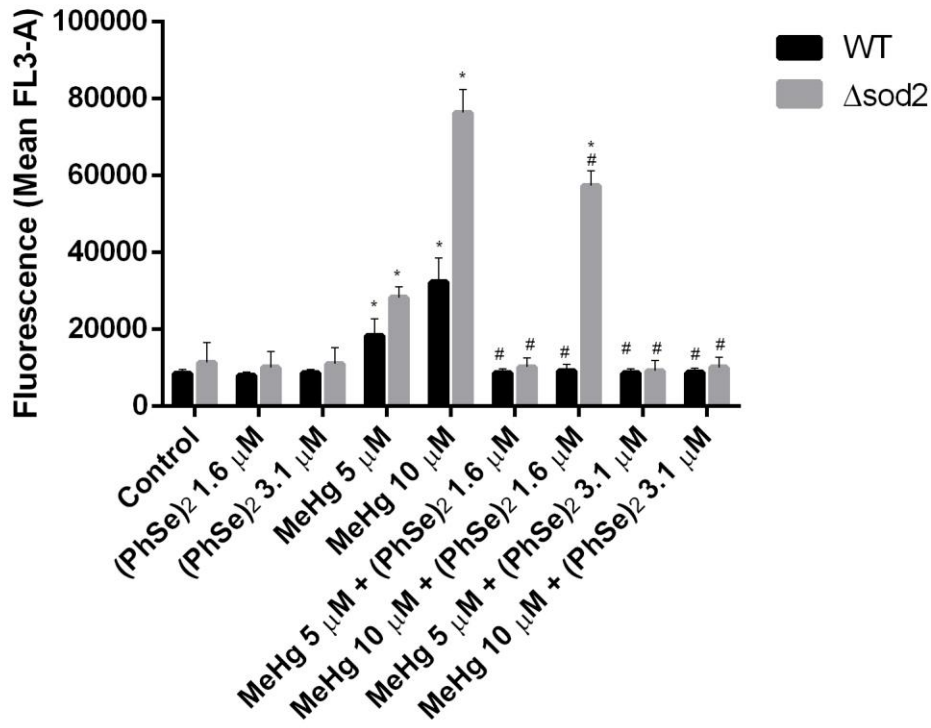
4B

WT

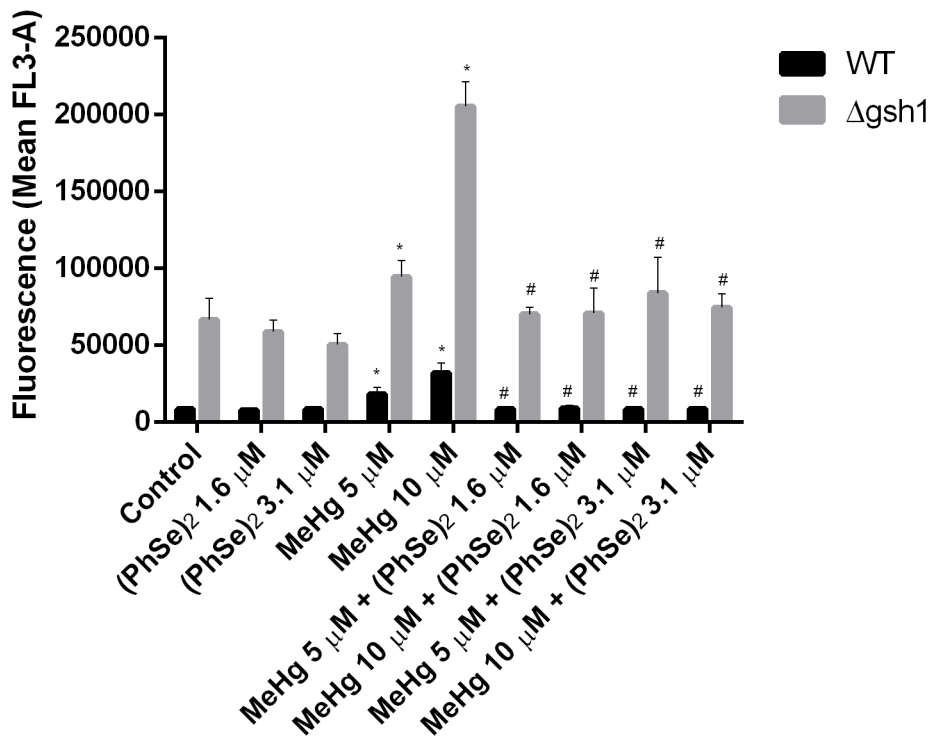




5C

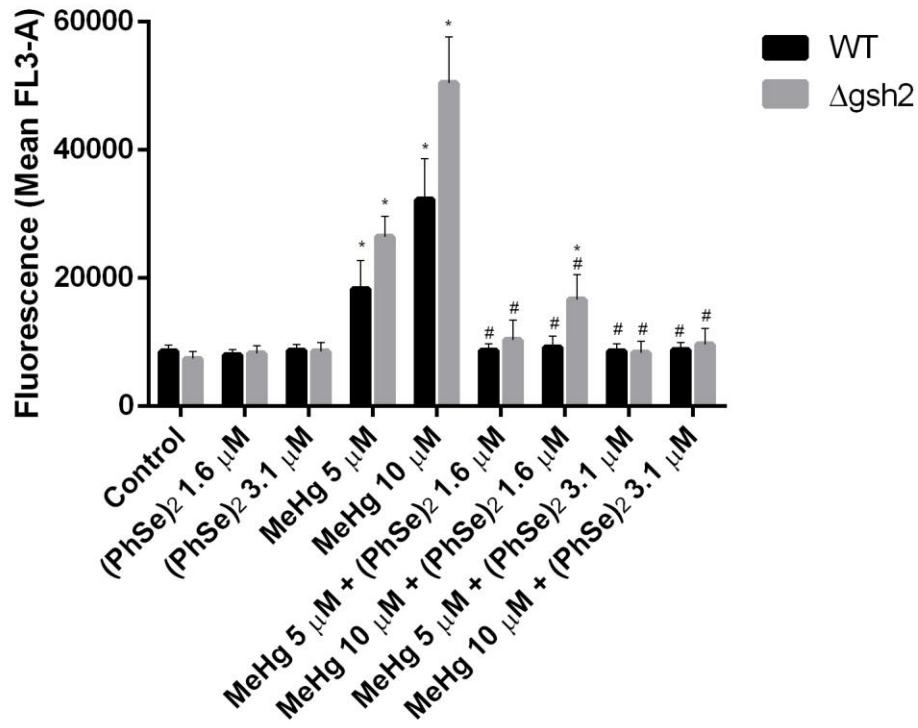
 $\Delta$ sod2

5D

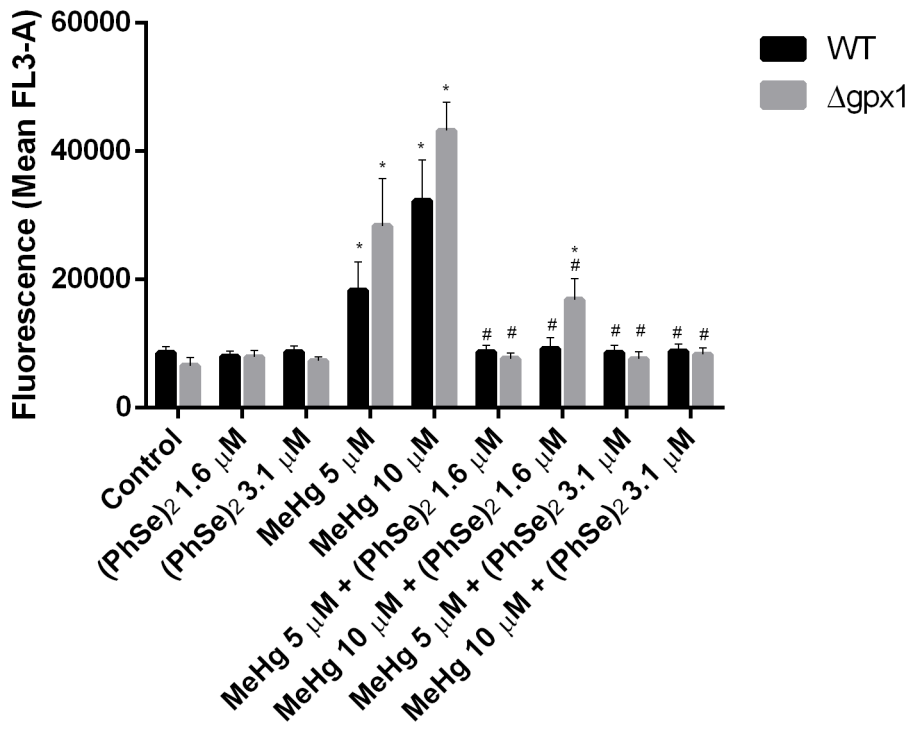
 $\Delta$ gsh1



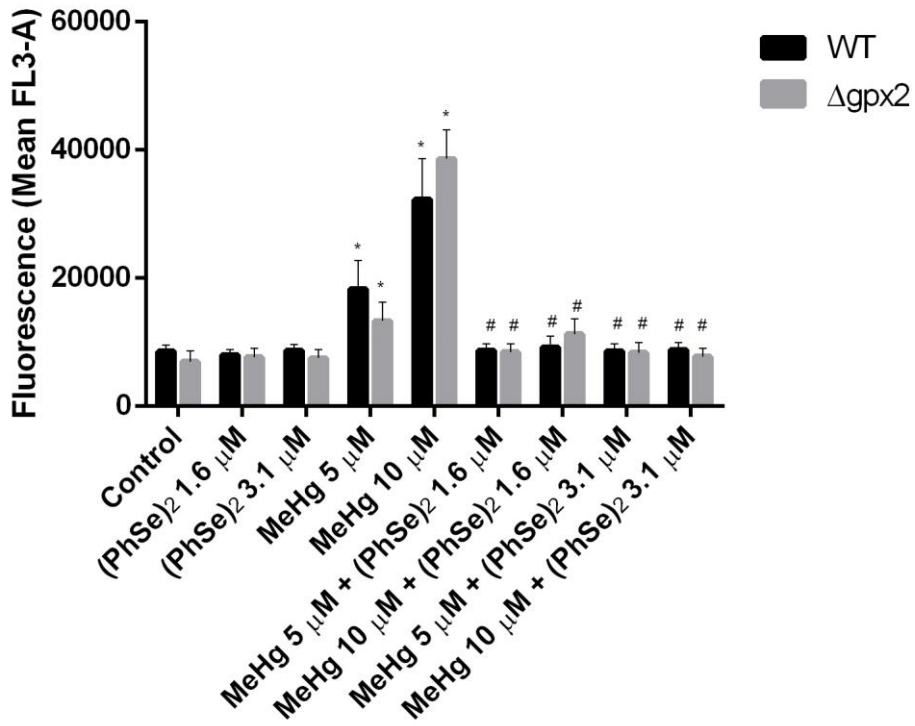
5E

 $\Delta$ gsh2

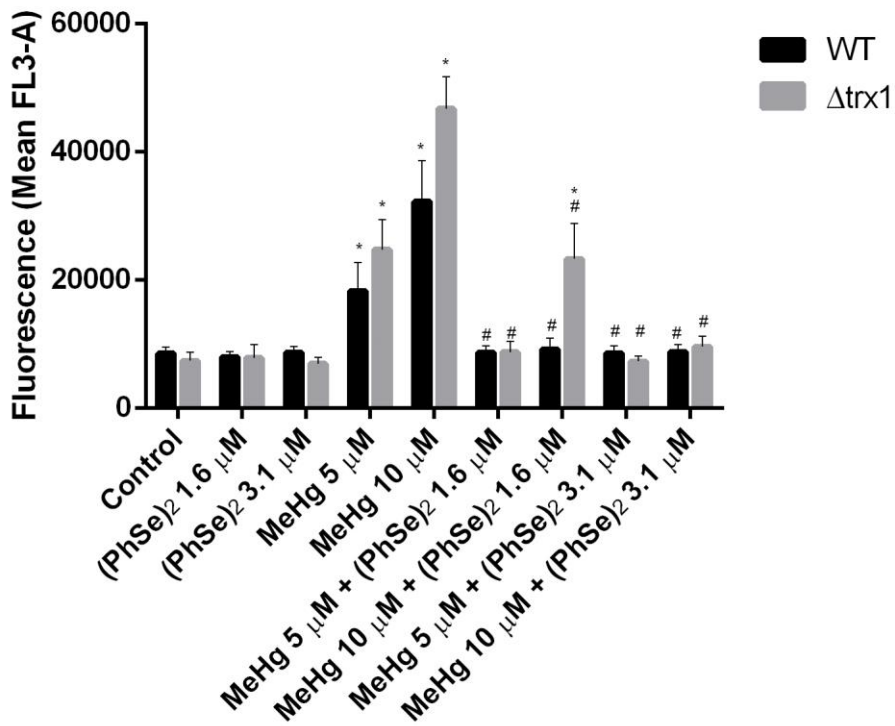
5F

 $\Delta$ gpx1

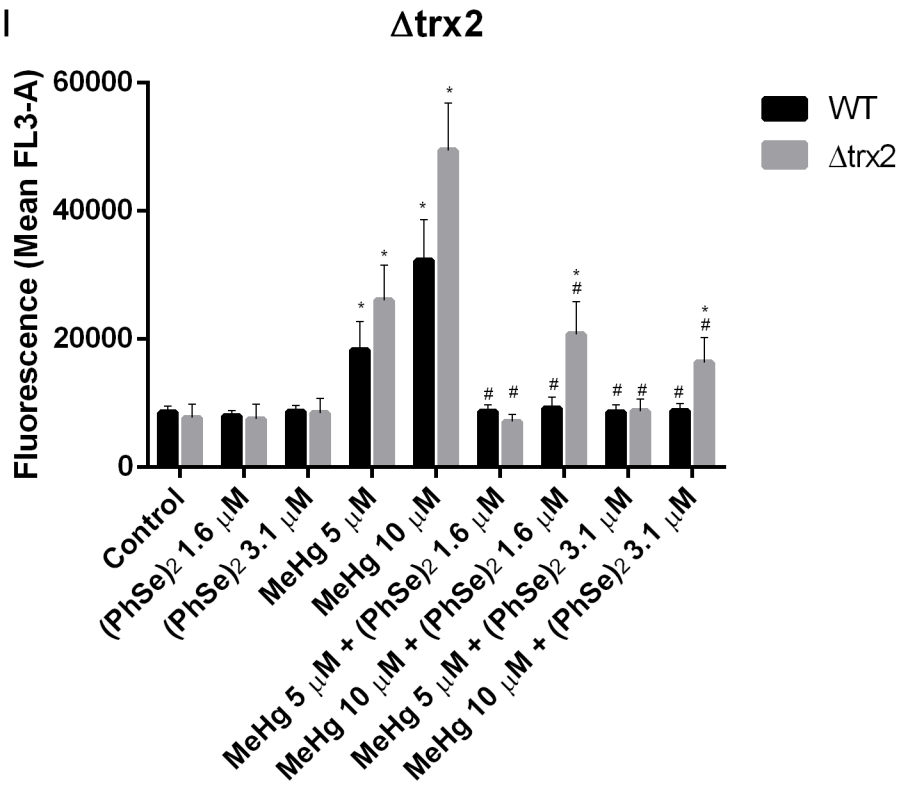
5G

 $\Delta gpx2$ 

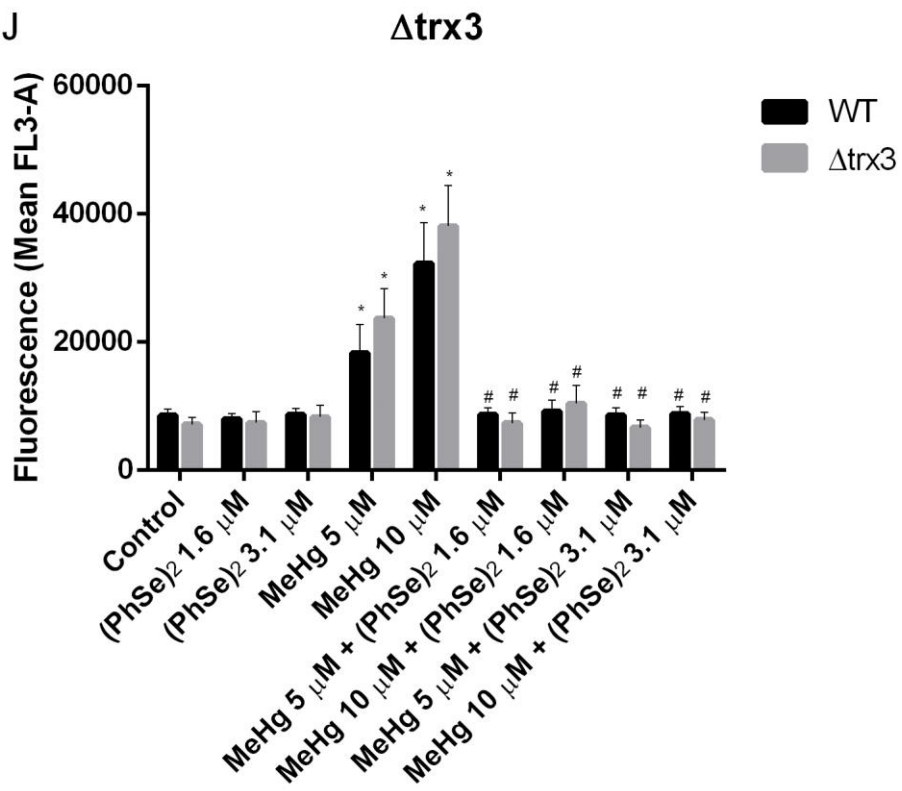
5H

 $\Delta trx1$ 

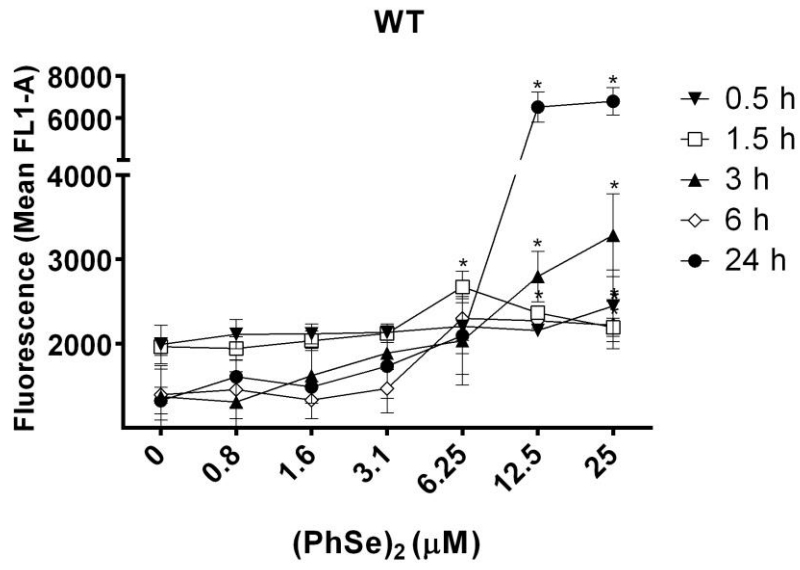
5I



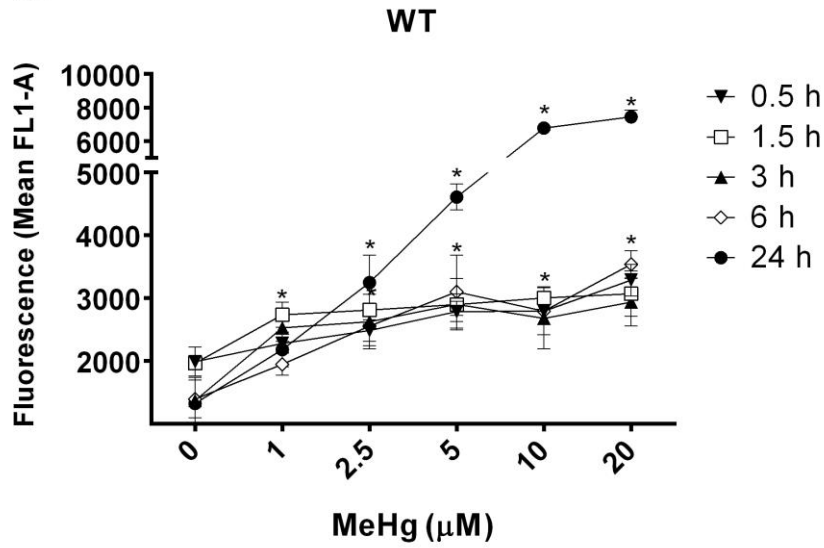
5J

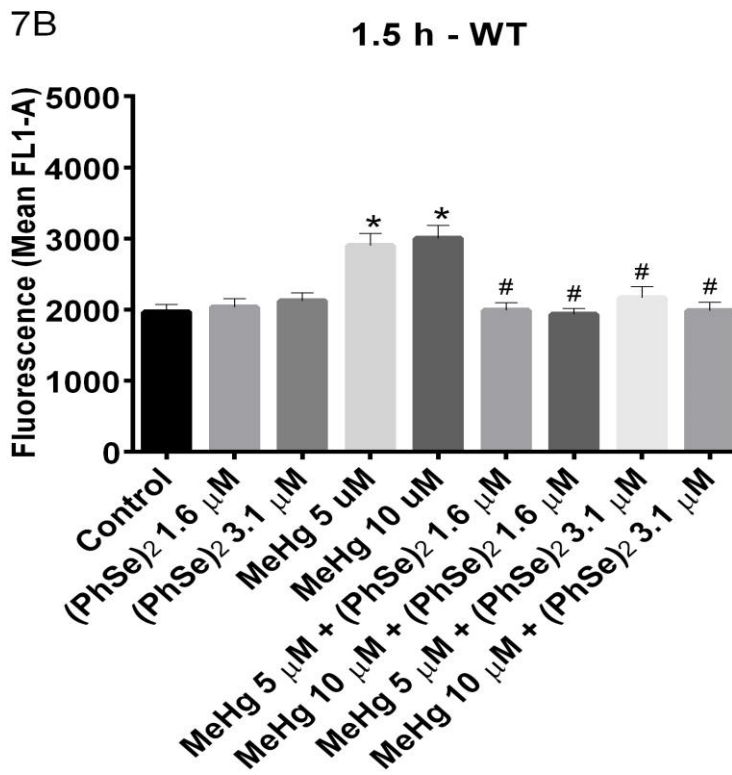
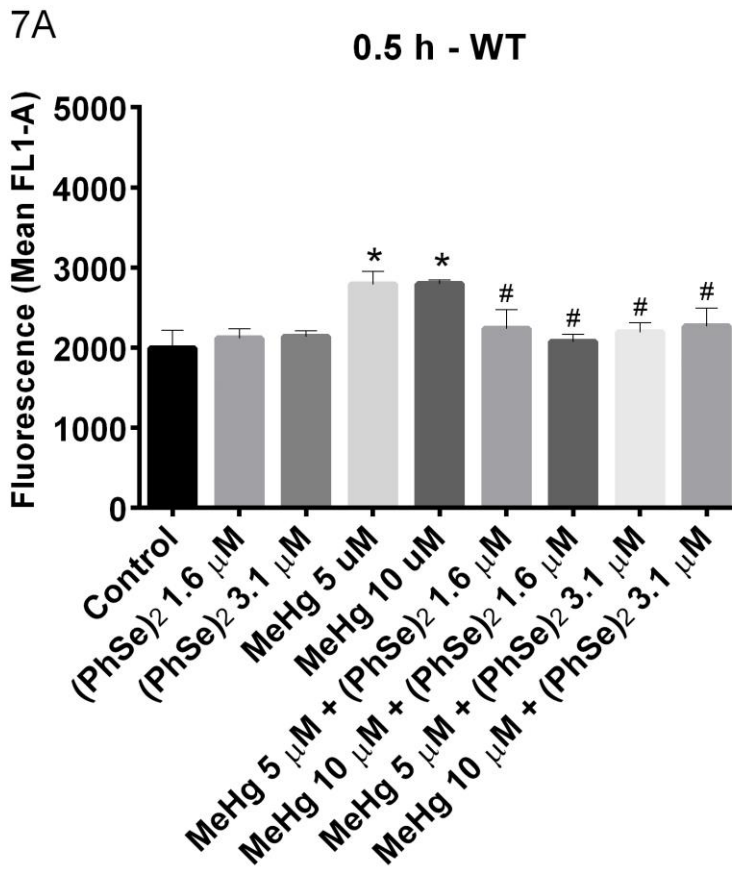


6A



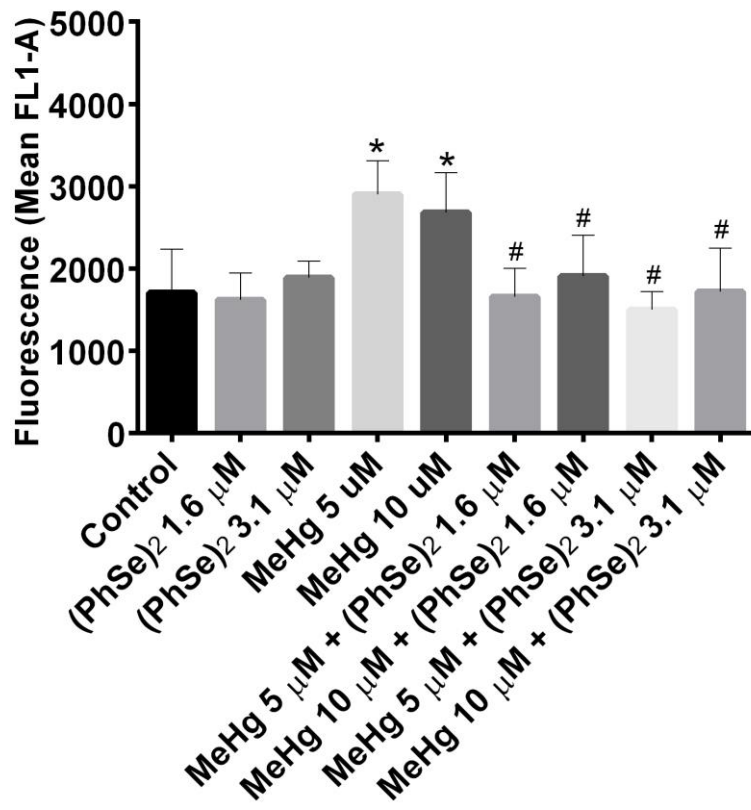
6B





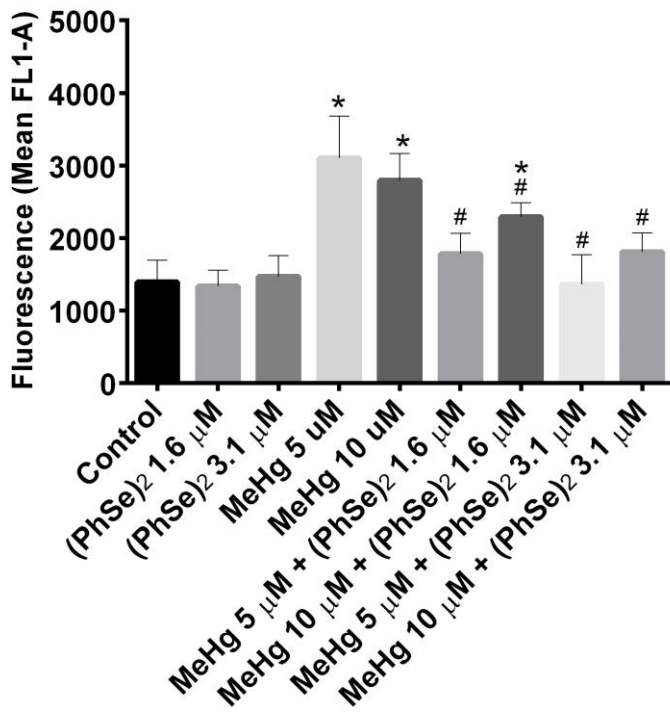
7C

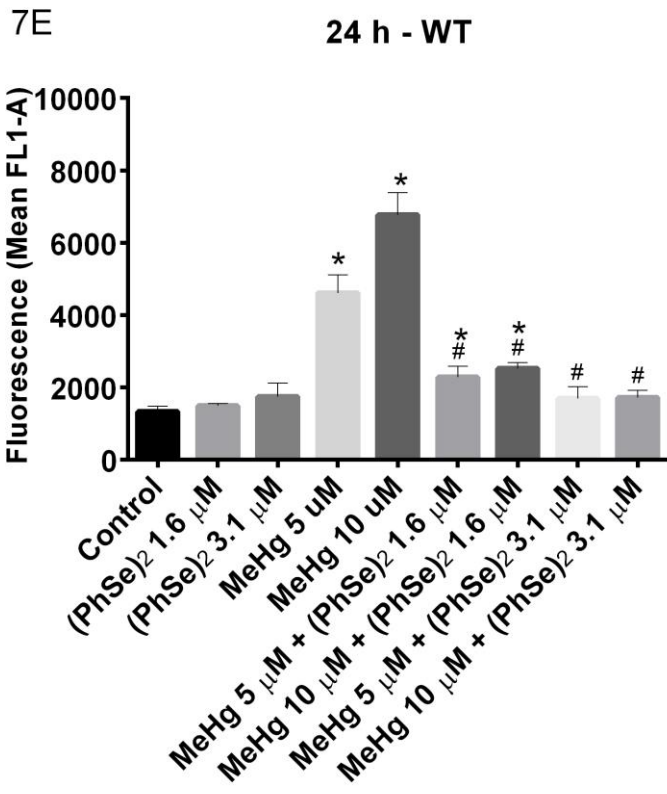
3 h - WT



7D

6 h - WT





**Legend of scheme:**

**Scheme 1:** Diphenyl diselenide (PhSeSePh) can be reduced to phenyl selenol (PhSe<sup>-</sup>), which can form a stable inert complex with MeHg (PhSeMeHg). In addition, diphenyl diselenide can activate the antioxidant defense system of the cell by activating the transcription factor Yap1. Diphenyl diselenide can oxidize the sulfide groups in Yap1 activating it, while diphenyl diselenide (PhSeSePh) is reduced to phenyl selenol (PhSe<sup>-</sup>). Yap1 accumulates in the cell nucleus, where it is involved in transcription of antioxidant enzymes and other proteins from the antioxidant defense system (SOD, CAT, Trx, GSH). Additionally, the antioxidant properties of diphenyl diselenide could contribute to neutralize ROS production induced by MeHg.

**Legend of table:**

**Table 1:** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> and MeHg on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* (wild type and knockout strains), in 24-hour incubation. Data are reported as means ± SD of duplicate determinations on three independent experiments. The data were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey's test. The differences were considered to be significant when P < 0.05. \* compared with control group; # compared with MeHg group.



### Legend of figures:

**Figure 1:** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> and MeHg on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*, in 24-hour incubation. Data are reported as means ± SD of duplicate determinations on three independent experiments. The data were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey's test. The differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ . \* compared with control group.

**Figure 2:** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> and MeHg on production of reactive oxygen species in *Saccharomyces cerevisiae*, in the range of 0.5 to 24 hours. Data are reported as means ± SD of duplicate determinations on three independent experiments. The data were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey's test. The differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ . \* compared with control group.

**Figure 3:** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> and MeHg on production of reactive oxygen species in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison between WT and A)  $\Delta yap1$ , B)  $\Delta sod1$ , C)  $\Delta sod2$ , D)  $\Delta gsh1$ , E)  $\Delta gsh2$ , F)  $\Delta gpx1$ , G)  $\Delta gpx2$ , H)  $\Delta trx1$ , I)  $\Delta trx2$  and J)  $\Delta trx3$ , in 24-hour incubation. Data are reported as means ± SD of duplicate determinations on three independent experiments. The data were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey's test. The differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ . \* compared with control group; # compared with MeHg group.

**Figure 4:** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> and MeHg on cell membrane permeability in *Saccharomyces cerevisiae*, in the range of 0.5 to 24 hours. Data are reported as means ± SD of duplicate determinations on three independent experiments. The data were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey's test. The differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ . \* compared with control group.

**Figure 5:** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> and MeHg on cell membrane permeability in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison between WT and A)  $\Delta yap1$ , B)  $\Delta sod1$ , C)  $\Delta sod2$ , D)  $\Delta gsh1$ , E)  $\Delta gsh2$ , F)  $\Delta gpx1$ , G)  $\Delta gpx2$ , H)  $\Delta trx1$ , I)  $\Delta trx2$  and J)  $\Delta trx3$ , in 24-hour incubation. Data are reported as means ± SD of duplicate determinations on three independent experiments. The data were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey's test. The differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ . \* compared with control group; # compared with MeHg group.

**Figure 6:** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> and MeHg on total thiol in *Saccharomyces cerevisiae*, in the range of 0.5 to 24 hours. Data are reported as means ± SD of duplicate determinations on three independent experiments. The data were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey's test. The differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ . \* compared with control group.

**Figure 7:** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> versus MeHg on total thiol in *Saccharomyces cerevisiae* (wild type), in the range of 0.5 to 24 hours. Data are reported as means ± SD of duplicate determinations on three independent experiments. The data were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey's test. The differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ . \* compared with control group; # compared with MeHg group.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nessa dissertação, é possível concluir que:

- O composto disseleneto de difenila protege contra a toxicidade induzida pelo metilmercúrio, conforme observado na recuperação do crescimento e menores índices de espécies reativas de oxigênio, permeabilidade de membrana e restauração do conteúdo intracelular de GSH, em leveduras tratadas com ambos os compostos;
- O efeito protetor desencadeado pelo disseleneto de difenila parece estar relacionado ao fato de ele induzir a ativação de algumas enzimas do sistema antioxidante das leveduras.
- Nem todas as enzimas antioxidantes analisadas tiveram a mesma participação ou importância no mecanismo de proteção desempenhado pelo disseleneto de difenila. A deleção dos genes  $\Delta yap1$ ,  $\Delta sod1$ ,  $\Delta sod2$ ,  $\Delta gsh1$ ,  $\Delta gsh2$ ,  $\Delta gpx1$ ,  $\Delta gpx2$ ,  $\Delta trx1$ ,  $\Delta trx2$ , e  $\Delta trx3$  levou a uma menor eficácia na proteção em relação à linhagem selvagem (e diferenças de eficácia entre si também), o que não foi observado com a deleção dos genes  $\Delta ybp1$ ,  $\Delta ctt1$ ,  $\Delta cat1$ ,  $\Delta gtt1$ ,  $\Delta gtt2$ ,  $\Delta gtt3$  e  $\Delta trr2$ .
- Os resultados reforçam a hipótese do sequestro do MeHg pelo fenil selenol ( $PhSe^-$ ) do disseleneto de difenila, com a formação de um complexo estável  $MeHgSePh$  e menos tóxico.

## 6 PERSPECTIVAS

Considerando-se os resultados obtidos, as perspectivas do presente trabalho dizem respeito a:

- Investigação de outros mecanismos relacionados à absorção e excreção do complexo MeHgSePh;
- Investigação do envolvimento de outros genes e vias no mecanismo de proteção do (PhSe)<sub>2</sub> sobre a toxicidade do MeHg;
- Ampliação da investigação para outros modelos experimentais, além das leveduras.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJA, P. M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, v. 306, p. 1-17, 2001.

ADAMIS, P. D., GOMES, D. S.; PINTO, M. L.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. The role of glutathione transferases in cadmium stress. **Toxicology Letters**, v. 154, p. 81–88, 2004.

ADAMIS, P. D.; MANNARINO, S. C.; RIGER, C. J.; DUARTE, G.; CRUZ, A.; PEREIRA, M. D.; ELEUTHERIO, E. C. Lap4, a vacuolar aminopeptidase I, is involved in cadmium–glutathione metabolism. **Biometals**, v. 22, n. 2, p. 243-249, 2008.

ADAMIS, P. D.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. Vacuolar compartmentation of the cadmium–glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. **Toxicology Letters**, v. 173, p. 1–7, 2007.

AGARWAL, R.; RAISUDDIN, S.; TEWARI, S.; GOEL, S. K.; RAIZADA, R. B.; BEHARI, J. R. Evaluation of comparative effect of pre- and posttreatment of selenium on mercury-induced oxidative stress, histological alterations, and metallothionein mRNA expression in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 24, p. 123–135, 2010.

ALAEJOS, M. S.; DIAZ ROMERO, F. J.; DIAZ ROMERO, C. Selenium and cancer: some nutritional aspects. **Nutrition**, v.16, p. 376–383, 2000.

ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 6102–6109, 2000.

ARTHUR, J. R. The glutathione peroxidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 1825–1835, 2000.

ASCHNER, M.; SYVERSEN, T.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B.; FARINA, M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 285–291, 2007.

AVERY, A. M.; AVERY, S. V. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 33730–33735, 2001.

AZAD, G. K.; SINGH, V.; MANDAL, P.; SINGH, P.; GOLLA, U.; BARANWAL, S.; CHAUHAN, S.; TOMAR, R. S. Ebselen induces reactive oxygen species (ROS)-mediated cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae* with inhibition of glutamate dehydrogenase being a target. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 77–89, 2014.

BAKIR, F.; DAMLUJI S. F.; AMIN-ZAKI, L.; MURTADHA, M.; KHALIDI, A.; AL-RAWI, N. Y.; TIKRITI, S.; DAHAHIR, H. I.; CLARKSON, T. W.; SMITH, J. C.; DOHERTY, R. A. Methylmercury poisoning in Iraq. **Science**, v. 181, p. 230–241, 1973.

BALLATORI, N.; KRANCE, S. M.; NOTENBOOM, S.; SHI, S.; TIEU, K.; HAMMOND, C. L. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biological Chemistry**, v. 390, p. 191–214, 2009.

BASTOW, E. L.; GOURLAY, C. W.; TUIE, M. F. Using yeast models to probe the molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis. **Biochemical Society Transaction**, v. 39, p. 1482–1487, 2011.

BEGLEY, T. J.; SAMSON, L. D. Network responses to DNA damaging agents. **DNA Repair**, v. 3, p. 1123–1132, 2004.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. New York: Freeman, 2004.

BRANCO, V.; CANÁRIO, J.; LU, J.; HOLMGREN, A.; CARVALHO, C. Mercury and selenium interaction in vivo: Effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 781–793, 2012.

BRENNAN, R.J.; SCHIESTL, R. H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. **Mutation Research**, v. 356, p. 171–178, 1996.

BRIHELIUS-FLOHE, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. **Biological Chemistry**, v. 387, p. 1329–1335, 2006.

BYRNE, K. P.; WOLFE, K. H. The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. **Genome Research**, v. 15, n. 10, p. 1456–1461, 2005.

CASTRO, F. A. V.; HERDEIRO, R. S.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A.; PEREIRA, M. D. Menadione stress in *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in the glutathione transferases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1770, p. 213–220, 2007.

CHANG, E. C.; CRAWFORD, B. F.; HONG, Z.; BILINSKI, T.; KOSMAN, D. J. Genetic and biochemical characterization of Cu,Zn superoxide dismutase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 4417–4424, 1991.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 192–208, 2004.

CHOI, J. H.; LOU, W.; VANCURA, A. A novel membrane bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 29915–29922, 1998.

CLARK, L.C.; COMBS JR, G. F.; TURNBULL, B. W.; SLATE, E. H.; CHALKER D. K.; CHOW, J.; DAVIS , L. S.; GLOVER, R. A.; GRAHAM, G. F.; GROSS, E. G.; KRONGRAD, A.; LESHER JR., J. L.; PARK, H. K.; SANDERS JR., B. B.; SMITH, C. L.; TAYLOR, J. R. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. **JAMA**, v. 276 p. 1957–1963, 1996.

CLARKSON, T. W.; MAGOS; L.; MYERS; G. J. The toxicology of mercury – current exposures and clinical manifestations. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 1731–1737, 2003.

COLLINSON, E. J.; GRANT, C. M. Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 16712–16717, 2002.

COUNTER, S. A.; BUCHANAN, L. H. Mercury exposure in children: a review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 198, p. 209-230, 2004.

CULOTTA, V. C.; JOH, H. D.; LIN, S. J.; SLEKAR, K. H. A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. **Journal of Biology Chemistry**, v. 270, p. 29991-29997, 1995.

DALLA-CORTE, C. L.; SOARES, F. A. A.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide prevents methylmercury-induced mitochondrial dysfunction in rat liver slices. **Tetrahedron**, v. 68, p. 10437-10443, 2012.

DELAUNAY, A.; PFLIEGER, D.; BARRAULT, M.; VINH, J.; TOLEDANO M. B. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox transducer in gene activation. **Cell**, v. 111, p. 471–481, 2002.

DIWADKAR-NAVSARIWALA, V.; DIAMOND, A. M. The link between selenium and chemoprevention: a case for selenoproteins. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2899–2902, 2004.

DIWADKAR-NAVSARIWALA, V.; PRINS, G. S.; SWANSON, S. M.; BIRCH, L. A.; RAY, V. H.; HEDAYAT, S.; LANTVIT, D. L.; DIAMOND, A. M. Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model. **PNAS**, v. 103, p. 8179–8184, 2006.

DOLBEC, J.; MERGLER, D.; SOUSA PASSOS, C. J.; SOUSA DE MORAIS, S.; LEBEL, J. Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajos river, Brazilian Amazon. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 73, n. 3, p. 195-203, 2000.

DOS SANTOS, S. C.; TEIXEIRA, M. C.; CABRITO, T. R.; SÁ-CORREIA, I. Yeast toxicogenomics: genomewide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology, and biotechnology. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. 63, p. 1-17, 2012.

DYRSSEN, D.; WEDBORG, M. The sulfur–mercury(II) system in natural waters. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 56, p. 507–519, 1991.

EDWARDS, G. N. Two cases of poisoning by mercuric methide. **Saint Bartholomew's Hospital Reports**, v. 1, p. 141–50, 1865.

EKINO, S.; SUSU, M.; NINOMIYA, T.; IMAMURA, K.; KITAMURA, T. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 262, p. 131–44, 2007.

ELLIS, D. R.; SORS, T. G.; BRUNK, G. B.; ALBRECHT, C.; ORSER, C.; LAHNER, B.; WOOD, K. V.; HARRIS, H. H.; PICKERING, I. J.; SALT, D. E. Production of S-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. **BMC Plant Biology**, v. 4, n. 1, 28 jan. 2004.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 256, p. 405–417, 2011.

FARINA, M.; BARBOSA, N. B. V.; NOGUEIRA, C. W.; FOLMER, V.; ZENI, G.; ANDRADE, L. H.; BRAGA, A. L.; ROCHA, J. B. T. Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinatase from rat liver and



cucumber leaves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 623–631, 2002.

FAUCHON, M.; LAGNIEL, G.; AUDE, J. C.; LOMBARDIA, L.; SOULARUE, P.; PETAT, C.; MARGUERIE, G.; SENTENAC, A.; WERNER, M.; LABARRE, J. Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. **Molecular Cell**, v. 9, p. 713–723, 2002.

FAVERO, A. M.; WEIS, S. N.; STANGHERLIN, E. C.; ZENI, G.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v. 20, p. 561–568, 2005.

FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V. D. Extending healthy life span – from yeast to humans. **Science** v. 328, p. 321–326, 2010.

FORSBURG, S. L.; The art and design of genetic screens: yeast. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 659–668, 2001.

FORTNEY, K.; XIE, W.; KOTLYAR, M.; GRIESMAN, J.; KOTSERUBA, Y; JURISICA, I. NetwoRx: connecting drugs to networks and phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 41, D720-D727, 2013.

FREITAS, A. S.; FUNCK, V. R.; ROTTA, M. S.; BOHRER, D.; MORSHBASCHER, V.; PUNTEL, R. L.; NOGUEIRA, C. W.; FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. **Brain Research Bulletin**, v. 79, p. 77-84, 2009.

FUKUDA, Y.; USHIJIMA, K.; KITANO, T.; SAKAMOTO, M.; FUTATSUKA, M. An analysis of subjective complaints in a population living in a methylmercury-polluted area. **Environmental Research**, v. 81, p. 100-107, 1999.

FURUKAWA, Y.; O'HALLORAN, T. V. Posttranslational modifications in Cu,Zn superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 847–867, 2006.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 334-361, 1998.

GARAY-ARROYO, A.; LLEDÍAS, F.; HANSBERG, W.; COVARRUBIAS, A. A. Cu,Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to hyperosmosis. **FEBS Letters**, v. 539, p. 68–72, 2003.

GARCERÁ, A.; BARRETO, L.; PIEDRAFITA, L.; TAMARIT, J.; HERRERO, E. *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases active as 1-Cys thiol transferases. **Biochemical Journal**, v. 398, p. 187–196, 2006.

GAYTÁN, B. D.; VULPE, C. D. Functional toxicology: tools to advance the future of toxicity testing. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 110, p. 1-10, 2014.

GILBERT, S. G.; GRANT-WEBSTER, K. S. Neurobehavioral effects of developmental methylmercury exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 135-142, 1995.

GLASER, V.; MORITZ, B.; SCHMITZ, A.; DAFRÉ, A. L.; NAZARI, E. M.; MULLER, Y. M. R.; FEKSA, L.; STRALIOTTO, R.; DE BEM, A. F.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. T.; LATINI, A. Protective effects of diphenyl diselenide in a mouse model of brain toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, p. 18–26, 2013.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546–567, 1996.

GOMES, D. S.; FRAGOSO, L. C.; RIGER, C. J.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1573, p. 21–25, 2002.

GONZALEZ-PORQUÉ, P.; BALDESTEN, A.; REICHARD, P. Purification of a thioredoxin system from yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 9, p. 2363-70, 1970.

GRALLA, E. B.; KOSMAN, D. J. Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and fungi. **Advances Genetics**, v. 30, p. 251-319, 1992.

HADDAD, J. J. Pharmaco-redox regulation of cytokine-related pathways: from receptor signaling to pharmacogenomics. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 907–926, 2002.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 51–88, 2005.

HEATH, J. C.; BANNA, K. M.; REED, M. N.; PESEK, E. F. COLE, N.; LI, J.; NEWLAND, M. C. Dietary selenium protects against selected signs of aging and methylmercury exposure. **NeuroToxicology**, v. 31, p. 169–179, 2010.

HERRERO, E.; ROS, J.; BELLÍ, G.; CABISCOL, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 1217–1235, 2008.

HILTUNEN, J. K.; MURSULA, A. M. ROTTENSTEINER, H.; WIERENGA, R. K.; KASTANIOTIS, A. J.; GURVITZ, A. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 35–64, 2003.

HOLMGREN, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 24, p. 13963–13966, 1989.

HORVATH, S. E.; WAGNER, A.; STEYRER, E.; DAUM, G. Metabolic link between phosphatidylethanolamine and triacylglycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1811, p. 1030–1037, 2011.

HUGHES, W. L. A physicochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 65, p. 454–460, 1957.

HUH, W. K.; FALVO, J. V.; GERKE, L. C.; CARROLL, A. S.; HOWSON, R. W.; WEISSMAN, J. S.; O'SHEA, E. K. Global analysis of protein localization in budding Yeast. **Nature**, v. 425, n. 6959, p. 686–691, 2003.

HUNTER, D.; BOMFORD, R. R.; RUSSEL, D. S. Poisoning by methyl mercury compounds. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 9, p. 193–206, 1940.

INOUE, Y.; MATSUDA, T.; SUGIYAMA, K. I.; IZAWA, S.; KIMURA, A. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 27002–27009, 1999.

IP, C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1845–1854, 1998.

IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry Journal**, v. 320, p. 61–67, 1996.

IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 368, p. 73–76, 1995.

JABEEN, H. S.; UR RAHMAN, S.; MAHMOOD, S.; ANWER, S. Genotoxicity assessment of amaranth and allura red using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 22-26, 2013.

JAIN, A.; MARTENSSON, J.; STOLE, E.; AULD, P. A. M.; MEISTER, A. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 1913-1917, 1991.

JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, n. 16, p. 1511–1527, 1998.

KIM, Y. Y.; MAHAN, D. C. Biological aspects of selenium in farm animals. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 16, p. 435–444, 2003.

KIYONO, M.; SONE, Y.; MIYAHARAA, K.; OKA, Y.; NAKAMURA, M.; NAKAMURA, R.; SATO, M. H.; PAN-HOU, H.; SAKABED, K.; INOUE, K. Genetic expression of bacterial merC fused with plant SNARE in *Saccharomyces cerevisiae* increased mercury accumulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 3, p. 137–141, 2011.

KRYUKOV, G. V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S. V.; LOBANOV, A. V.; ZEHTAB, O.; GUIGO, R.; GLADYHEV, V. N. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science** v. 300, p. 1439–1443, 2003.

KUGE, S.; JONES, N.; NOMOTO, A. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. **The EMBO Journal**, v. 16, p. 1710-1720, 1997.

KUGE, S.; JONES, N. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 3, p. 665-664, 1 fev. 1994.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **Yeast systematic and phylogeny — implications of molecular identification methods for studies in ecology. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.** The Yeast Handbook, Springer, 2006.

LEE, J.; GODON, C.; LAGNIEL, G.; SPECTOR, D.; GARIN, J.; LABARRE, J.; TOLEDANO, M. B. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 16040–16046, 1999.

LEE, S.; KIM, S. M.; LEE, R. T. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p. 1165–1207, 2013.

LETAVAYOVÁ, L.; VLASÁKOVÁ, D.; SPALLHOLZ, J. E.; BROZMANOVÁ, J.; CHOVANEC, M. Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 638, n. 1–2, p. 1–10, 2008.

LETAVAYOVÁ, L.; VLCKOVA, V.; BROZMANOVA, J.. Selenium: from cancer prevention to DNA damage. **Toxicology**, v. 227, p. 1–14, 2006.

LIU, X; ZHANG, X.; ZHANG, Z. Cu,Zn-superoxide dismutase is required for cell wall structure and for tolerance to cell wall-perturbing agents in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 584, n. 6, p. 1245–1250, 19 mar. 2010.

LONGO, V. D.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 12275–12280, 1996.

LUSHCHAK, V.; SEMCHYSHYN, H.; MANDRYK, S.; LUSHCHAK, O. Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 441, p. 35–40, 2005.

MACHADO, A. K.; MORGAN, B. A.; MERRIL, G. F. Thioredoxin reductase-dependent inhibition of MCB cell cycle box activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 27, p. 17045-17054, 1997.

MACHADO, M. S.; VILLELA, I. V.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; SALVADOR, M.; LOPES, N. P.; BRAGA, A. L.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. <sup>33</sup>-Ditrifluoromethyldiphenyl diselenide: A new organoselenium compound with interesting antigenotoxic and antimutagenic activities. **Mutation Research**, v. 673, p. 133-140, 2009.

MADEO, F.; FRÖLICH, E.; LIGR, M.; GREY, M.; SIGRIST, S. J.; WOLF, D. H.; FRÖLICH, K. U. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. **Journal of Cell Biology**, v. 145, p. 757-767, 1999.

MARTIN, J. L. Thioredoxin - a fold for all reasons. **Structure**, v. 3, p. 245–250, 1995.

MAY, M. J.; VERNOUX, T.; LEAVER, T.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Glutathione homeostasis in plants: implication for environmental sensing and plant development. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 649–667, 1998.

MCGOLDRICK, S.; O’SULLIVAN, S. M.; SHEEHAN, D. Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. **FEMS Microbiology Letters**, v. 242, p. 1–12, 2005.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711–760, 1983.

MEISTER, A. Metabolism and function of glutathione. **TIBS** v. 6, p. 231-234, 1981.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish Matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). **Ecotoxicology**, v. 19, p. 105–123, 2010.

MOORE, C. W.; MCKOY, J.; DARDALHON, M.; DAVERMANN, D.; MARTINEZ, M.; AVERBECK, D. DNA damage-inducible and RAD52-independent repair of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 154, p 1085–1099, 2000.

MOREIRA, R. R.; DE OLIVEIRA, R. B.; SAFFI, J.; BRAGA, A. L.; ROESLER, R.; DALPIZZOL, F.; FONSECA, J. C. M.; BRENDEL, M.; PÊGAS; J. A. H. Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. **Life Sciences**, v. 77, n. 77, p. 2398-2411, 23 set. 2005.

MORI, N.; YASUTAKE, A.; HIRAYAMA, K. Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. **Archives of Toxicology**. v. 81, p. 769–776, 2007.

MUGESH, G.; DU MONT, W.; SIES, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chemical Reviews**, v. 101, p. 2125–2179, 2001.

MUGESH, G.; PANDA, A.; SINGH, H.; PUNEKAR, N.; BUTCHER, R. Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: a mechanistic study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 839–850, 2001.

MUKHOPADHYAY-SARDAR, S.; RANA, M. P.; CHATTERJEE, M. Antioxidant associated chemoprevention by seleno-methionine in murine tumor model. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 206, p. 17–25, 2000.

MULLER, E. G. D. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 9194–9202, 1991.

NEWLAND, M. C.; DONLIN, W. D.; PALESTZ, E. M.; BANNA, K. M. Developmental behavioral toxicity of methylmercury. In: LEVIN, E. D.; BUCCAFUSCO, J. J., editors. **Animal models of cognitive impairment**. Boca Raton, FL: CRC Press; p. 101–146, 2006.

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

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide: a janus-faced molecule. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 2055-2071, 2010.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 255–285, 2004.

OCÓN-GARRIDO, E.; GRANT, C. M. Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 993–1003, 2002.

OHTAKE, Y.; SATOU, A.; YABUUCHI, S. Isolation and characterization of glutathione biosynthesis-deficient mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 3145–3150, 1990.

OKAZAKI, S.; NAGANUMA, A.; KUGE, S. Peroxiredoxin-mediated redox regulation of the nuclear localization of Yap1, a transcription factor in budding yeast. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, p. 327–334, 2005.

PARNHAM, M. J.; GRAF, E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Progress in Drug Research**, v. 36, p. 10-47, 1991.

PEDRAJAS, J. R.; KOSMIDOU, E.; MIRANDA-VIZUETE, A.; GUSTAFFSON, J. A.; WRIGHT, A. P. H.; SPYROU, G. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 6566–6573, 1999.

PEREIRA, M. D.; HERDEIRO, R. S.; FERNANDES, P. N.; ELEUTHERIO, E. C. A.; PANEK, A. D. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1620, p. 245–251, 2003.

PERRONE, G. G.; TAN, S. X.; DAWES, I. W. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 1354–1368, 2008.

POULAIN, A. J.; BARKAY, T. Cracking the Mercury Methylation Code. **Science**, v. 339, n. 6125, p. 1280–81, 2013.

RABENSTEIN, D. L. Nuclear magnetic resonance studies of the acid-base chemistry of amino acids and peptides. I. Microscopic ionization constants of glutathione and methylmercury-complexed glutathione. **Journal of American Chemical Society**, v. 95, n. 9, p. 2797–2803, 1973.

RAÍ, R.; TATE, J. J.; COOPER, T. G. Ure2, a prion precursor with homology to glutathione S-transferase, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from heavy metal ion and oxidant toxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 12826–12833, 2003.

RALSTON, N. V.; RALSTON, C. R.; BLACKWELL, J. L. III; RAYMOND, L. J. Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 802–811, 2008.

RESNICK, M. A.; COX, B. S. Yeast as a honorary mammal. **Mutation Research**, v. 451, p. 1–11, 2000.

RICHMAN, P. G.; MEISTER, A. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 1422–1426, 1975.

RIETSCH, A.; BECKWITH, J. The genetics of disulphide bond metabolism. **Annual Review of Genetics**, v. 32, p. 163–184, 1998.

RODERER, G. Differential toxic effects of mercuric chloride and methylmercuric chloride on the freshwater alga *Potriochromonas malhamensis*. **Aquatic Toxicology**, v. 3, p. 23–34, 1983.



ROSA, R. M.; HOCH, N. C.; FURTADO, G. V.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. **Mutation Research**, v. 633, p. 35–45, 2007a.

ROSA, R. M.; MOURA, D. J.; ROMANO, E. S. A. C.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. **Mutation Research**, v. 631, p. 44–54, 2007b.

ROSA, R. M.; PICADA, J. N.; SAFFIA, J.; HENRIQUES, J. A. P. Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. **Mutation Research**, v. 628, p. 87–98, 2007c.

ROSA, R. M.; ROESLER, R.; BRAGA, A. L.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P. Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 1287–1304, 2007d.

ROSA, R. M.; SULZBACHER, K.; PICADA, J. N.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J. A. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. **Mutation Research**, v. 563, p. 107–115, 2004.

ROTRUCK, J. T.; POPE, A. L.; GANTHER, H. E.; SWANSON, A. B. HAFEMAN, D. G.; HOEKSTRA, W. G. Selenium: biological role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 179, p. 588-590, 1973.

RUIS, H.; HAMILTON, B. Regulation of yeast catalase genes. In: **Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems**. New York: CSH Press, Cold Spring Harbor, 1992. p. 153–172.

SAMANTA, M. P.; LIANG, S. Predicting protein functions from redundancies in large-scale protein interaction networks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 22, p. 12579-12583, 2003.

SANTOS, F. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T.; DO NASCIMENTO, P. C.; NOGUEIRA, C. W. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. **Toxicology**, v. 43, n. 12, p. 1723-1730, dez. 2005a.

SANTOS, F. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T.; WEIS, S. N.; FACHINETTO, J. M.; FAVERO, A. M.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. **Chemico-Biological Interactions**, v. 151, p. 159–165, 2005b.

SCHMITT, A. P.; MCENTEE, K. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 93, p. 5777-5782, 1996.

SCHNELL, N; ENTIAN, K. D. Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (PAR1) conferring resistance to iron chelators. **European Journal of Biochemistry**, v. 200, n. 2, p. 487-93, 1991.

SCHWARZ, K; BIERI, J. G.; BRIGGS, G. M.; SCOTT, M. L.. Prevention of exudative diathesis in chicks by factor 3 and selenium. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 95, p. 621–625, 1957.

SHIOBARA, Y.; YOSHIDA, T.; SUZUKI, K. T. Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood, and urine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 152, p. 309–314, 1998.

STEPHEN, D. W. S.; RIVERS, S. L.; JAMIESON, D. J. The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 16, p. 415–423, 1995.

SUADICANI, P.; HEIN, H. O.; GYNTELBERG, F. Serum selenium concentration and risk of ischaemic heart disease in a prospective cohort study of 3000 males. **Atherosclerosis**, v. 96, p. 33–42, 1992.

SUIZU, T.; TSUTSUMI, H.; OHTAKE, Y.; KAWADO, A.; IMAYASU, S.; KIMURA, A.; MURATA, K. Absolute glutathione requirement for sporulation of a yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 205, p. 1151–1155, 1994.

SUZUKI, T.; YOKOYAMA, A.; TSUJI, T.; IKESHIMA, E.; NAKASHIMA, K.; IKUSHIMA, S.; KOBAYASHI, C.; YOSHIDA, S. Identification and characterization of genes involved in glutathione production in yeast. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 107–113, 2011.

SYVERSEN, T.; KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, n. 4, p. 215-226, 2012.

SZASZ, T.; THAKALI, K.; FINK, G. D.; WATTS, S. W. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 27-37, 2007.

TAKEUCHI, T.; ETO, K. **The pathology of Minamata disease. A tragic story of water pollution.** Fukuoka: Kyushu University Press; 1999.

TAMURA, T.; STADTMAN, T. C. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties and thioredoxin reductase activity. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 93, p. 1006–1111, 1996.

TROTTER, E. W.; GRANT, C. M. Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. **EMBO Reports**, v. 4, n. 2, p. 184-188, 2003.

TROTTER, E. W.; GRANT, C. M. Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 869-878, 2002.

TSUZI, D.; MAETA, K.; TAKATSUME, Y.; IZAWA, S.; INOUE, Y. Distinct regulatory mechanism of yeast GPX2 encoding phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase by oxidative stress and a calcineurin/Crz1-mediated Ca<sup>2+</sup> signalling pathway. **FEBS Letters**, v. 569, p. 301–306, 2004.

VALDIGLESIAS, V.; PASARO, E.; MENDEZ J.; LAFFON, B. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 337–351, 2010.

VAN LOON, A. P.; PESOLD-HURT, B.; SCHATZ, G. A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. **PNAS**, v. 83, p. 3820–3824, 1986.

VEAL, E. A.; ROSS, S. J.; MALAKASI, P.; PEACOCK, E.; MORGAN, B. A. Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 30896-904, 2003.

VREDENBURG, G.; VASSELL, K. P. T.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E.; VOS, J. C. Reconstitution of the interplay between cytochrome P450 and human glutathione S-transferases in clozapine metabolism in yeast. **Toxicology Letters**, v. 222, p. 247-256, 2013.

WAGNER, C.; SUDATI, J. H.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. In vivo and in vitro inhibition of mice thioredoxin reductase by methylmercury. **Biometals**, v. 23, p. 1171–1177, 2010.

WIESER, R.; ADAM, G.; WAGNER, A.; SCHÜLLER, C.; MARCHLER, G.; RUIS, H., KRAWIEC, Z.; BILINSKI, T. Heat shock factor-independent heat control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 12406–12411, 1991.

WOOD, V.; GWILLIAM, R.; RAJANDREAM, M. A.; LYNE, M.; LYNE, R. STEWART, A.; et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. **Nature**, v. 415, p. 871–880, 2002.

WU, A. L.; MOYE-ROWLEY, W. S. GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. **Molecular Cell Biology**, v. 14, p. 5832-5839, 1994.

WU, A.; WEMMIE, J. A.; EDGINGTON, N. P.; GOEBL, M.; GUEVARA, J. L.; MOYE-ROWLEY, W. S. Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 25, p. 18850-18858, 5 set. 1993.

YAN, C.; LEE, L. H.; DAVIS, L. I. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 7416–7429, 1998.

ZEMOLIN, A. P. P.; MEINERS, D. F.; PAULA, M. T.; MARIANO, D. O. C.; ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, A. B.; POSSER, T.; FRANCO, J. L. Evidences for a role of glutathione peroxidase 4 (GPx4) in methylmercury induced neurotoxicity in vivo. **Toxicology**, v. 302, p. 60–67, 2012.

ZHANG, L.; ONDA, K. IMAI, R.; FUKUDA, R.; HORIUCHI, H.; OHTA, A. Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 308–314, 2003.

ZHENG, W. J.; OUYANG, Z. **Organic selenium compounds from plants: Their chemistry and applications in medicine**. Guangzhou: Jinan University Press, 2001.

ZHONG, L.; ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenothiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. **PNAS**, v. 97, p. 5854-5859, 2000.

ZHOU, X.; ARITA, A.; ELLEN, T. P.; LIU, X.; BAI, J.; ROONEY, J. P.; KURTZ, A. D.; KLEIN, C. B.; DAI, W.; BEGLEY, T. J.; COSTA, M. A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals pathways affected by arsenic toxicity. **Genomics**, v. 94, p. 294–307, 2009.

ZYRACKA, E.; ZADRAG, R.; KOZIOL, S.; KRZEPILKO, A.; BARTOSZ, G.; BILINSKI, T. Yeast as a biosensor for antioxidants: Simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 3, p. 679–684, 2005.