

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

Angelica Ramos

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS TÓXICOS INDUZIDOS POR  
METIL E ETILMERCÚRIO EM *Saccharomyces cerevisiae***

Santa Maria, RS

2016

**Angelica Ramos**

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS TÓXICOS INDUZIDOS POR METIL E  
ETILMERCÚRIO EM *Saccharomyces cerevisiae***

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nilda B. V. Barbosa**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristiane L. Dalla Corte**

Santa Maria, RS  
2016

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

Ramos, Angelica  
ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS TÓXICOS INDUZIDOS POR  
METIL E ETILMERCÚRIO EM *Saccharomyces cerevisiae* /  
Angelica Ramos.- 2016.  
54 p.; 30 cm

Orientadora: Nilda B. V. Barbosa  
Coorientadora: Cristiane L. Dalla Corte  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2016

1. Metilmercúrio 2. Etilmercúrio 3. *Saccharomyces cerevisiae* 4. Estresse oxidativo I. Barbosa, Nilda B. V. II. Dalla Corte, Cristiane L. III. Título.

Angelica Ramos

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS TÓXICOS INDUZIDOS POR METIL E  
ETILMERCÚRIO EM *Saccharomyces cerevisiae***

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

**Aprovada em 02 de Setembro de 2016:**



---

**Nilda B. V. Barbosa (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)



---

**Jeferson L. Franco (UNIPAMPA)**



---

**Vanderlei Folmer (UNIPAMPA)**

**Santa Maria, RS**  
**2016**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Nelson e Cleci e à minha irmã Tais pelo apoio, paciência, amor e carinho incondicionais, sem os quais não seria possível concluir este trabalho. O apoio de vocês foi fundamental.

Agradeço à minha orientadora Nilda pelos conhecimentos dados, paciência e por ter me acolhido em seu laboratório como aluna e amiga. À minha co-orientadora e amiga, Cristiane, por ter me aceitado como sua IC (lá em 2011), por ter confiado a mim seus experimentos, pela paciência, pelas longas conversas sobre todos os assuntos, e por fim, por ter aceitado a me co-orientar e dividir comigo seus conhecimentos, muito obrigada.

Aos colegas de laboratório, obrigada pela confiança, paciência, amizade e por tornar estes anos todos mais fáceis. Obrigada por estarem ao meu lado nos momentos difíceis que passamos e também por estarem nos momentos mais alegres, vocês são minha segunda família! Ao grande amigo-irmão, Matheus, obrigada por sempre estar junto, pelas caronas, pelas cervejas, festas, conselhos, experimentos e por compartilhar seus conhecimentos. Saiba que sentirei muito a tua falta, obrigada por tudo! À Lilian e ao Diones, que mesmo longe, estão sempre perto; obrigada por todas as conversas (reais e virtuais), cervejadas, festas, trocas de (ainda pouco) conhecimento e pelos sábios conselhos pessoais e profissionais. Aos meus primeiros ICs, Gabriel, Vanise e Renne, obrigada pela oportunidade de passar a vocês o pouquinho que sei e juntos desenvolver este trabalho.

Aos amigos do Laboratório do prof<sup>o</sup> João, obrigada pelas tantas trocas de conhecimento e parceria. Ao prof<sup>o</sup> João, obrigada por ter me acolhido e pelos seus ensinamentos. Aos amigos do Laboratório do prof<sup>o</sup> Félix, obrigada pelo companheirismo de todos estes anos. E ao prof<sup>o</sup>. Felix, obrigada pelo incentivo e amizade. Às amigas que seguiram com a profissão e não estão mais no Lab: Romaiana, Jéssie e Sandra, obrigada por tantas conversas, troca de conhecimentos e amizade de longa data. Aos amigos que não estão mais aqui, Francielli e Rafael, obrigada por permitirem fazer parte da vida de vocês e por me ensinarem tanta coisa que jamais esquecerei, vocês estarão pra sempre na minha memória e coração.

Às amigas-irmãs Livia e Lariana, obrigada pelo carinho, amizade, segurança, almoços, cervejas, festas, desabafos, choros, enfim, todos os momentos únicos que passei com vocês, vocês foram fundamentais para tornar esse mestrado mais tranquilo. Aos amigos Tiarles, Eduardo, Geovani, Marcelo e George, obrigada por tantas e tantas conversas (reais e virtuais), confidências, desabafos, risos... Obrigada por essa amizade linda que temos. Aos amigos da família lxs putchxs, obrigada, mesmo que por pouco tempo, por me acolherem tão bem. Obrigada pelas longas conversas que me fizeram ver as pessoas de uma maneira totalmente diferente, sem preconceitos, sem cores e sem gênero.

Obrigada ao professor Claudio Masuda por ter gentilmente cedido as cepas de levedura utilizadas neste estudo.

Obrigada à comunidade da UFSM, que durante todos estes anos fez sentir-me em casa. E por fim, agradeço a agência de fomento FAPERGS/CAPES, cuja bolsa pude concretizar esta dissertação.

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.*

(Isaac Newton)

## RESUMO

### ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS TÓXICOS INDUZIDOS POR METIL E ETILMERCÚRIO EM *Saccharomyces cerevisiae*

AUTORA: Angelica Ramos  
ORIENTADORA: Nilda B. V. Barbosa  
CO-ORIENTADORA: Cristiane Lenz Dalla Corte

O mercúrio é um metal de alta toxicidade, sendo encontrado no ambiente principalmente devido a processos industriais e antropológicos. O metilmercúrio (MeHg) origina-se da metilação do mercúrio inorgânico no ambiente aquático e acumula-se em peixes através da cadeia alimentar. O consumo de peixes contaminados é uma das principais formas de intoxicação por MeHg. O etilmercúrio (EtHg), o qual compõe o timerosal, é usado como conservante de medicamentos e vacinas. Estudos sobre a toxicologia do EtHg nos sistemas biológicos são escassos quando comparado ao MeHg. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo usada amplamente em pesquisas toxicológicas como modelo alternativo para estudar os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos de agentes tóxicos, incluindo metais pesados.

Utilizando *S. cerevisiae* como organismo modelo, este estudo teve como objetivo investigar e comparar as toxicidades de MeHg e EtHg, enfatizando a participação do estresse oxidativo nas alterações celulares. Cepas selvagem e com genes deletados para as defesas antioxidantes: *y*-glutamilcisteína sintetase ( $\Delta Gsh1$ ), glutationa peroxidase ( $\Delta Gpx1$ ), catalase T ( $\Delta Ctt1$ ), superóxido dismutase ( $\Delta Sod1$ ), peroxiredoxin mitocondrial ( $\Delta Prx1$ ), tiorredoxina citoplasmática ( $\Delta Trx1$ ) e o fator de transcrição ( $\Delta Yap1$ ) foram usadas para identificar os eventos e as proteínas alvo ligadas a citotoxicidade do MeHg e EtHg. Além disso, avaliamos a oxidação da DHR123 e a permeabilidade da membrana por meio da citometria de fluxo. Nossos dados demonstraram um aumento na formação de EROs e na permeabilidade da membrana nas cepas selvagem expostas ao MeHg e EtHg. Além disso, houve uma inibição de crescimento celular nas cepas mutantes e selvagem após o tratamento com os compostos.

De forma geral, os dados obtidos contribuem para o entendimento da toxicologia de compostos de mercúrio usando um modelo alternativo, o qual apresenta grandes vantagens em termos de custeio, manutenção, reprodutibilidade e tempo experimental.

**Palavras-chave:** Metilmercúrio. Etilmercúrio. *Saccharomyces cerevisiae*. Estresse Oxidativo.



## ABSTRACT

### COMPARATIVE STUDY OF TOXIC EFFECTS INDUCED BY METHYL and ethylmercury IN *Saccharomyces cerevisiae*

AUTHOR: Angelica Ramos  
ADVISOR: Nilda B. V. Barbosa  
CO ADVISOR: Cristiane Lenz Dalla Corte

Mercury is a highly toxic metal found in environment mostly due to anthropological and industrial processes. Methylmercury (MeHg) originates from the methylation of inorganic mercury in aquatic environment and accumulates in fish through the food chain. Consumption of contaminated fish is a major form of MeHg poisoning. Ethylmercury (EtHg), which comprises thimerosal is used as a preservative for drugs and vaccines. Studies on the toxicology of EtHg in biological systems are scarce when compared to MeHg. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been widely used in toxicological research as an alternative model to study the molecular mechanisms involved in the toxic agents effects, including heavy metals.

This study aimed to investigate and compare the toxic effects mediated by MeHg and EtHg in wild type strains and mutants to genes related to oxidative stress in *S. cerevisiae*:  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\Delta Gsh1$ ), glutathione peroxidase ( $\Delta Gpx1$ ), catalase T ( $\Delta Ctt1$ ), superoxide dismutase ( $\Delta Sod1$ ), mitochondrial peroxiredoxin ( $\Delta Prx1$ ), cytoplasmic thioredoxin ( $\Delta Trx1$ ) and redox transcription factor ( $\Delta Yap1$ ). We evaluate the inhibition of cell growth, as well as the mutant strains tolerance to the compounds. Furthermore, we evaluated the oxidation of DHR123 and membrane permeability by flow cytometry. Our data showed an increase in the formation of ROS and membrane permeability in wild type strains exposed to MeHg and EtHg. Furthermore, there was an inhibition of cell growth in wild type and mutant strains after treatment with the compounds.

In general, the data obtained contribute to the understanding of the toxicology of mercury compounds using an alternative model, which has great advantages in terms of cost, maintenance, reproducibility and experimental time.

**Key words:** Methylmercury. Ethylmercury. *Saccharomyces cerevisiae*. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1 – Ciclo do mercúrio (metilação do Hg(II)) no ambiente aquático .....	15
Figura 2 – Figura representativa do mercúrio na história .....	16
Figura 3 – Dissociação do Timerosal em tiosalicilato e etilmecurio .....	22
Figura 4 – Diagrama simplificado da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24

### MANUSCRITO

Figure 1 – Effect of MeHg and EtHg on *Saccharomyces cerevisiae* growth. Wild type strains were treated with MeHg (A) and EtHg (B) for 12, 18 and 24h at 30°C under shaking. Cell density was determined by measuring the absorbance in spectrophotometer at 600 nm. Values are expressed as mean±SEM of four independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. \*p<0.05 compared to control.....39

Figure 2 – Effect of MeHg and EtHg on ROS levels in *Saccharomyces cerevisiae*  
ROS production induced by MeHg (A) and EtHg (B) was analyzed in Wild type strains by flow cytometer after 24h of exposure. Values are expressed as mean±SEM of four independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. \*p<0.05 compared to control.....40

Figure 3 – Effect of MeHg and EtHg on membrane permeability of *Saccharomyces cerevisiae*. Plasma membrane permeability was analyzed in Wild type strains by flow cytometer after 24h of exposure to MeHg (A) or EtHg (B). Values are expressed as mean±SEM of four independent experiments (n=4). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. \*p<0.05 compared to control.....41

Figure 4 – *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to MeHg and EtHg. Tolerance of wild type and mutant strains to MeHg and EtHg was determined by spot test. Cells were first grown in YPD media until OD=1. Four subsequent 1:10 dilutions were plated on YPD-agar containing 0.5, 1.5 and 2.5 µM MeHg or EtHg. Plates were then incubated for 48 hours. The picture represents the data of four independent experiments.....42

Figure 5 – Growth profile of mutant strains. Wild type and mutant strains were kept for 12, 18 and 24h at 30°C under shaking. After, cell density was determined by measuring the absorbance in spectrophotometer at 600 nm. Values are expressed as mean±SEM of four independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. ....43

Figure 6 – Effect of MeHg on growth of mutant strains. Cells were treated with MeHg in liquid medium for 24h at 30°C under shaking. Cell density was determined by measuring the absorbance in spectrophotometer at 600 nm. (A) $\Delta$ *Yap1* (B) $\Delta$ *Gsh1* (C) $\Delta$ *Gpx1* (D) $\Delta$ *Ctt1* (E) $\Delta$ *Sod1* (F) $\Delta$ *Prx1* (G) $\Delta$ *Trx1*. Values are expressed as mean $\pm$ SEM of four independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. \*p<0.05 compared to control.....44

Figure 7 – Effect of EtHg on growth of mutant strains. Cells were treated with EtHg in liquid medium for 24h at 30°C under shaking. Cell density was determined by measuring the absorbance in spectrophotometer at 600 nm. (A) $\Delta$ *Yap1* (B) $\Delta$ *Gsh1* (C) $\Delta$ *Gpx1* (D) $\Delta$ *Ctt1* (E) $\Delta$ *Sod1* (F) $\Delta$ *Prx1* (G) $\Delta$ *Trx1*. Values are expressed as mean $\pm$ SEM of four independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. \*p<0.05 compared to control. ....45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>S. cerevisiae</i> strains used in this study.....	46
Tabela 2 – IC <sub>50</sub> values for MeHg and EtHg on cell growth in WT and deletion mutants strains.....	46

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CAT – Catalase

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

EtHg – etilmercúrio

EUA – Estados Unidos da América

GPx – Glutathione Peroxidase

GR – Glutathione Redutase

GSH – Glutathione Reduzida

GSSG – Glutathione Oxidada

LAT – L-aminoácido transportador

MeHg – metilmercúrio

MMA – Ministério do Meio Ambiente

Prx – Peroxirredoxinas

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

Trx – Tiorredoxinas

TrxR – Tiorredoxina Redutase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Mercúrio.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.1 Metilmercúrio.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.2 Etilmercúrio.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Estresse Oxidativo e Antioxidantes.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo.....</b>	<b>22</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>26</b>
<b>4. MANUSCRITO.....</b>	<b>27</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>50</b>
<b>7. RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>

## APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrito uma revisão bibliográfica sucinta sobre os temas abordados nesta dissertação. No final deste item estão apresentados a **justificativa** do trabalho e os **objetivos geral e específicos**.

O **DESENVOLVIMENTO** esta disposto na forma de um manuscrito, o qual se encontra no item **MANUSCRITO**. As seções Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

No item **CONCLUSÕES** são apresentadas as conclusões gerais do presente trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** apresentadas no final da dissertação referem-se somente as citações que aparecem ao item **INTRODUÇÃO**.

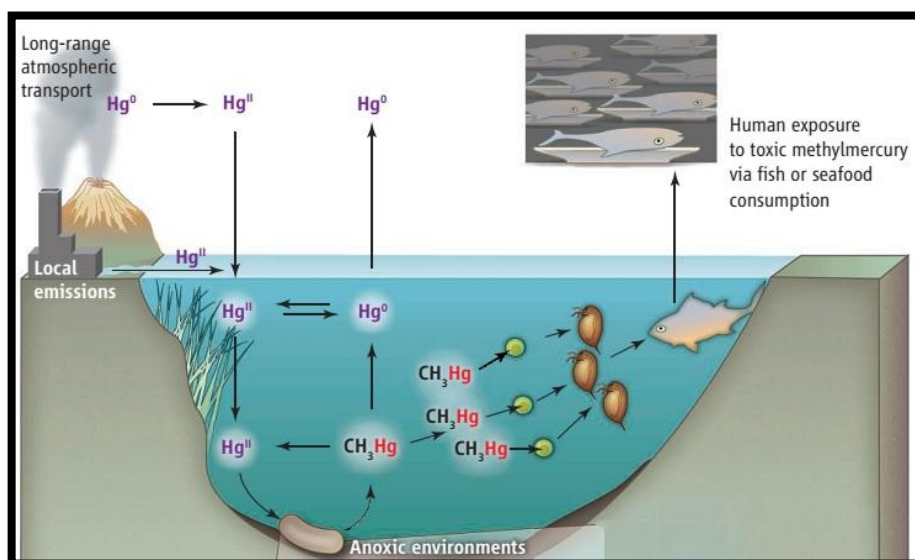
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. MERCÚRIO

Na natureza, o mercúrio é encontrado sob as formas inorgânica e orgânica. Na forma inorgânica podemos incluir o mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ), o cátion mercurioso ( $\text{Hg}_2^{2+}$ ) e o cátion mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ). O mercúrio inorgânico é encontrado sob o estado líquido em temperatura ambiente, é considerado bom condutor elétrico e pode formar ligas metálicas (CLARKSON, et al 2002)

O mercúrio inorgânico pode ser produzido de maneira natural, por meio de vulcões e/ou intemperismo das rochas, bem como de maneira antrópica pelas indústrias. Assim, ao entrar em contato com ambientes aquáticos pode, naturalmente, iniciar seu ciclo biogeoquímico. Uma vez que entra em contato com o sedimento anóxico, o mercúrio inorgânico é metilado por bactérias redutoras de sulfato e ferro formando o metilmercúrio ( $\text{MeHg}$ ). Este pode desmetilar-se, retornando ao estado inorgânico e assim à atmosfera. Pode também voltar ao solo por meio da chuva e regressar novamente aos ambientes aquáticos. Além disso, pode bioacumular-se nos organismos aquáticos fazendo com que sua concentração aumente a cada nível trófico da cadeia alimentar (biomagnificação), causando toxicidade aos animais e aos humanos que mantêm uma dieta rica em peixes (Figura 1) (HINTELMANN, 2010).

Figura 1. Ciclo do mercúrio (metilação do  $\text{Hg(II)}$ ) no ambiente aquático (PAULAIN, 2013).

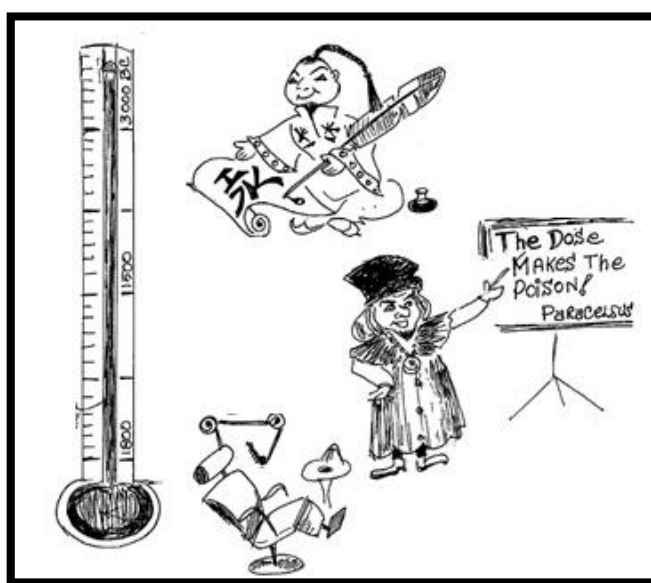




Ao longo da história, há diversos relatos da utilização do mercúrio para diferentes fins. há cerca de 3000 anos, os chineses usavam-o como cinabre, uma tinta vermelha utilizada para as escrituras. Na Europa, utilizava-se o metal como antisséptico, preservativo, bem como para o tratamento da sífilis. Porém, Paracelsus, um famoso médico da época, constatou que em altas doses o mercúrio poderia ser mortal, proferindo a famosa frase “a dose faz o veneno”, que hoje continua a ser o princípio fundamental na ciência da toxicologia. Além disso, para fazer chapéus de alta qualidade, chapeleiros faziam uso do nitrato de mercúrio e se envenenavam com o vapor, o qual causava distúrbios psicomotores. Ainda, na França, há cerca de 150 anos foi introduzido o uso de amalgamas de mercúrio e prata para fins odontológicos, o que se mantém até os dias atuais apesar dos possíveis efeitos tóxicos (Figura 2). Outro emprego do mercúrio que se mantém até hoje é o uso em termômetros, podendo gerar resíduos e contaminar o ambiente (CLARKSON, 2006; 2007; GOLDWATER, 1972).

O Brasil é um grande gerador de resíduos de mercúrio por meio da indústria, principalmente na fabricação de eletrônicos, baterias e lâmpadas fluorescentes. O setor químico emite esse metal em concentrações elevadas para a atmosfera, bem como as usinas termoelétricas o liberam associado com as cinzas. Aliás, a mineração é considerada a maior fonte de exposição direta e de contaminação de ambientes aquáticos e terrestres, assim como de emissão de vapor de mercúrio para a atmosfera (MMA, 2013).

Figura 2. O mercúrio na história. (modificado de GOLDWATER, 1972).



### 1.1.1 Metilmercúrio

O metilmercúrio (MeHg) é considerado um dos mais tóxicos poluentes ambientais sendo tal toxicidade responsável por diversos danos à saúde e ao meio ambiente. Incidentes com este composto nas décadas de 1950 e 1970 causaram danos irreparáveis às vítimas. Na baía de Minamata no Japão, o lançamento de mercúrio de uma fábrica para o rio foi responsável por um dos maiores casos de envenenamento por MeHg na história da humanidade. Sintomas como falta de coordenação motora, distúrbios neuronais, dormência nas extremidades, bem como redução do campo visual, foram observados na população. Em 1971, um surto de intoxicação ocorreu no Iraque, onde mais de 6000 pessoas foram hospitalizadas por terem consumido pão a partir de grãos tratados com um fungicida à base de MeHg (BAKIR, 1973; MC CURRY, 2006). Além disso, a mineração do ouro é responsável por 37% do consumo e emissão de mercúrio no mundo (UNEP, 2013) somente em 2011, 1400 toneladas de mercúrio foram utilizadas na mineração, conseqüentemente, gerando resíduos de mercúrio no ambiente (UNEP, 2012) Estes casos colaboraram para aprofundar as pesquisas sobre a toxicidade do MeHg em sistemas biológicos.

Após a absorção no trato intestinal (KERSHAW et al, 1980; NIELSEN e ANDERSEN, 1992), o MeHg é distribuído para todo o organismo podendo atravessar a barreira hematoencefálica e causar danos ao sistema nervoso central (SNC) (ASCHNER e CLARKSON, et al 1988). O mesmo também pode atravessar a barreira placentária afetando o SNC do feto em formação (CLARKSON et al, 2003; COSTA et al., 2004; JOHANSSON et al., 2007; GRANDJEAN e HERZ, 2011). Abordagens experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o MeHg pode complexar-se com o aminoácido cisteína, uma vez que este complexo é semelhante a molécula de metionina, o MeHg entra nas células do SNC através do sistema de transporte L-amino ácido transportador (LAT) por um mecanismo de mimetismo (FARINA et al. 2011a). Além disso, em adultos, também já foi demonstrado que o sistema cardiovascular é alvo dos efeitos tóxicos do composto (CHOI et al., 2009).

A toxicidade induzida por MeHg é atribuída, em parte, às suas propriedades eletrofílicas, que fazem com que o mesmo interaja com os grupos tióis e selenóis de biomoléculas de baixo peso molecular, como a glutatona (GSH) e proteínas (FARINA et al., 2011a), sendo assim, o sistema antioxidante GSH é considerado um dos alvos principais do metal (KAUR et al., 2006; ASCHNER e SYVERSEN, 2005). Além disso, o MeHg também pode interagir com grupos selenóis presentes em enzimas do sistema antioxidante como a

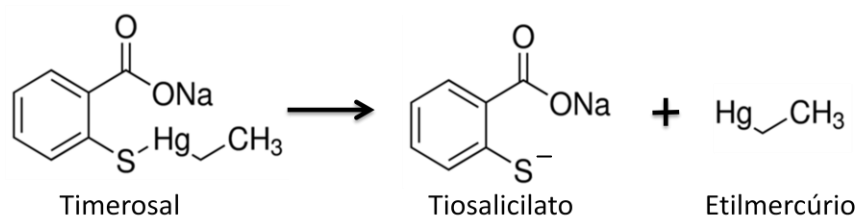
glutathione peroxidase (GPx) e thioredoxin reductase (TrxR), causando a diminuição das defesas celulares, o que pode levar à danos oxidativos (ASCHNER, et al 2010; FARINA, et al 2009, 2011; FRANCO, et al 2009, GLASER, et al 2010). Dalla Corte demonstrou que o aumento do estresse oxidativo induzido por MeHg pode envolver alterações na homeostase glutamatérgica (DALLA CORTE et al, 2012). O MeHg pode inibir a captação de glutamato em cultura de astrócitos (PORCIUNCULA, et al 2003), assim como aumentar a liberação de glutamato em vesículas sinápticas (MORETTO et al, 2005). Estes eventos levam ao aumento de níveis extracelulares de glutamato, acarretando em morte neuronal. O aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular foi demonstrado em vários tipos celulares após a exposição ao MeHg (SERAFIAN, 1993; ATCHISON e HARE, 1994; GRAFF, 1997), culminando em desequilíbrio na homeostase do  $Ca^{2+}$  (CASTOLDI et al, 2001) e consequente disfunção mitocondrial (SEEGAL e DREIEM, 2007).

### **1.1.2. Etilmercúrio**

Etilmercúrio é um composto orgânico de mercúrio derivado do metabolismo do timerosal, um composto que foi desenvolvido em 1927 para ser usado como conservante em cosméticos, medicamentos, removedor de maquiagem e vacinas. Contudo, somente em 1943 foi concluído que o timerosal era um contaminante e que não poderia ser considerado um conservante ideal (GEIER, et al 2007). No entanto, o timerosal continua sendo o conservante de muitas vacinas, expondo crianças no período pré e pós-natal ao EtHg (KERN, et al 2011; BIGHAM, et al 2005). Nos últimos anos, os EUA têm reduzido a exposição de crianças até os 6 meses de idade ao timerosal, mas nos países em desenvolvimento, bem como no Brasil, seu uso permanece em vacinas de múltiplas doses (KERN, et al 2013; DÓREA, 2011).

Normalmente, o timerosal é encontrado em vacinas de doses múltiplas, na qual são injetadas intramuscularmente. No músculo, o timerosal é dissociado em tiosalicilato e EtHg (Figura 3), este, assim como o MeHg, também tem grande afinidade por grupos tióis (-SH) de biomoléculas. Pouco se sabe sobre sua distribuição pelo organismo, contudo, parece depender de moléculas de baixo peso molecular, como cisteína e glutathione, ou de grandes moléculas contendo tiol (DÓREA, et al. 2012).

Figura 3. Dissociação do Timerosal em tiosalicilato e etilmercúrio.



Recentes estudos têm demonstrado que crianças urbanas expostas ao EtHg (através das vacinas) apresentam maior risco de desenvolver retardo no desenvolvimento psico e neuromotor do que crianças da comunidade rural, onde há maior ingestão de peixes contaminados com MeHg (DÓREA, et al 2012; MARQUES, 2014). Estudos em crianças relacionando o uso de vacinas com timerosal e autismo mostraram um aumento na taxa de diagnóstico dessa doença (GEIER, et al 2013; YOUNG, et al 2008; GALLAGHER, et al 2010).

Alguns mecanismos bioquímicos têm sido descritos para demonstrar a toxicidade do EtHg e/ou timerosal *in vitro*. Em células neuronais e em neuroblastoma humano, foi evidenciando o efeito tóxico de baixas doses de EtHg culminando na morte destes tipos celulares (GEIER, 2009; 2015). Já em linfócitos-B, o timerosal causou hipersensibilidade nas células, bem como a carbonilação de proteínas, além de levar ao estresse oxidativo. O estudo também descobriu que as mitocôndrias, são organelas-alvo na sensibilidade das células ao timerosal. (SHARPE, et al. 2013).

As vias de toxicidade do EtHg são de igual dimensão às encontradas para o MeHg (DÓREA, et al. 2013). Assim, como nos estudos a respeito da toxicidade do MeHg, Migdal (2010) relacionou os mecanismos toxicológicos do timerosal com a depleção de GSH e o aumento de EROs, seguido por estresse oxidativo. Ainda, alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial que podem levar ao influxo de cálcio (MIGDAL et al., 2010) . Apesar do tempo de permanência no sangue ser menor em comparação com MeHg, o EtHg permaneceu mais tempo no cérebro de macacos (BURBACHER et al., 2005), bem como levou à acumulação de Hg inorgânico no cérebro de animais expostos ao Timerosal (DÓREA, 2011).

## 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) podem ser geradas por fontes endógenas, como respiração celular, infecções microbianas, degradação de ácidos graxos e oxidação de biomoléculas. Além disso, são geradas também por fontes exógenas, como ação de poluentes, cigarro, álcool, radiação e exposição a metais (WU, et al 2013; HALLIWELL, et al 2007). Naturalmente na cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias dos sistemas vivos, as EROs são geradas a partir do oxigênio ( $O_2$ ). Este exerce um papel contraditório: de um lado, o  $O_2$  é essencial para a vida e a respiração aeróbica, de outro, o processo de redução de  $O_2$  para formação de água pode gerar EROs, podendo causar danos às células (DAVIES, et al 1995; WARNER, et al 1994).

Para proteger os sistemas biológicos, vários mecanismos de defesa celular são utilizados, incluindo antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (NORDBERG e ARNER; 2001). O sistema antioxidante enzimático é composto por algumas enzimas, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (REDDY e YAO, 1996). Estas enzimas atuam em conjunto na via metabólica de espécies reativas, como por exemplo, no bloqueio da peroxidação lipídica, onde a SOD atua convertendo o superóxido em peróxido de hidrogênio, que é decomposto em água pela CAT, impedindo assim, a formação de radical hidroxila. Já a GPx converte peróxidos em formas não tóxicas (WU, et al 2013). Peroxirredoxinas (Prx) e tiorredoxinas (Trx) também têm papel fundamental na defesa antioxidante. Assim como a CAT e a GPx, a Prx também degrada os hidroperóxidos (RHEE, et al 2011; WOOD, et al 2003). Esta enzima revelou-se um membro importante da defesa antioxidante, contudo, há indícios que o papel da Prx é mais complexo do que somente a remoção de hidroperóxidos (YANG, et al. 2002). O sistema tiorredoxina é tiol-dependente e atua fornecendo elétrons para uma variedade de enzimas (LU, 2014). Além deste, as defesas antioxidantes contam com um sistema não-enzimático, do qual fazem parte a glutathione (GSH -  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinilglicina), vitamina C, vitamina E, entre outros. A glutathione serve como doador de elétrons para a reação de redução de peróxido catalisada pela GPx, formando glutathione oxidada (GSSG). Esta por sua vez, é reduzida pela glutathione redutase (GR), formando um ciclo redox (DROSE, 2012).

A formação exacerbada de EROs, a diminuição das defesas antioxidantes bem como a combinação desses dois eventos leva a um desequilíbrio denominado estresse oxidativo. Tal

desequilíbrio pode ter como consequências danos a macromoléculas celulares como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. (HALLIWELL B e WHITEMAN, 2004; HALLIWELL, 2007).

Estudos já demonstraram que o MeHg pode inibir a atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx) e tioredoxina redutase (TrxR) (FARINA et al, 2009; FRANCO et al, 2009) enquanto que o EtHg pode também inibir componentes do sistema tioredoxina (Trx), além de ter sido relacionado com o esgotamento da glutatona reduzida (GSH), aumentando as espécies reativas de oxigênio (RODRIGUES, 2015). Essas enzimas são componentes importantes para o sistema antioxidante e a inibição destas pode contribuir para o desequilíbrio redox (FARINA et al., 2011b), assim, o estresse oxidativo mediado por MeHg e EtHg, pode ser considerado um evento central na toxicidade induzida por estes organometais.

Sabendo que compostos de mercúrio atuam formando EROs e conseqüentemente culminando em um quadro de estresse oxidativo, torna-se clara a importância dos sistemas antioxidantes para a defesa celular contra danos induzidos por esse metal. Assim, tendo em vista a necessidade de corroborar com estudos sobre a toxicidade de metais mediada pelo estresse oxidativo, estudos vêm sendo realizados utilizando os mais diversos modelos experimentais. Contudo, nos últimos anos, vêm crescendo consideravelmente a utilização de modelos alternativos para se estudar mecanismos de toxicidade associados às formas orgânicas de mercúrio.

### **1.3 LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* COMO ORGANISMO MODELO**

*Saccharomyces cerevisiae* é classificada como um fungo da classe Ascomycota. Sua característica morfológica principal é reproduzir-se por brotos, especialidade que a torna conhecida como “levedura de brotamento”. Evidências da utilização da *S. cerevisiae* datam do período Neolítico (7400-7000 A.C.) onde a levedura era utilizada na fabricação do vinho (MCGOVERN et al. 1997). Porém, somente no ano de 1872 a *S. cerevisiae* foi descrita por Pasteur como sendo um micro-organismo (MCGOVERN et al. 1997). No entanto, apenas em 1930 tem-se o registro do primeiro trabalho com a levedura como organismo experimental, bem como em 1950, a construção da cepa S288C, a qual foi posteriormente utilizada como cepa parental para o isolamento de mutantes (MORTIMER e JOHNSTON, 1986). Em 1996 o genoma da *S. cerevisiae* foi totalmente sequenciado levando a um considerável aumento nas

pesquisas envolvendo mutantes, bem como a genética e biologia molecular (GOFFEAU et al, 1996).

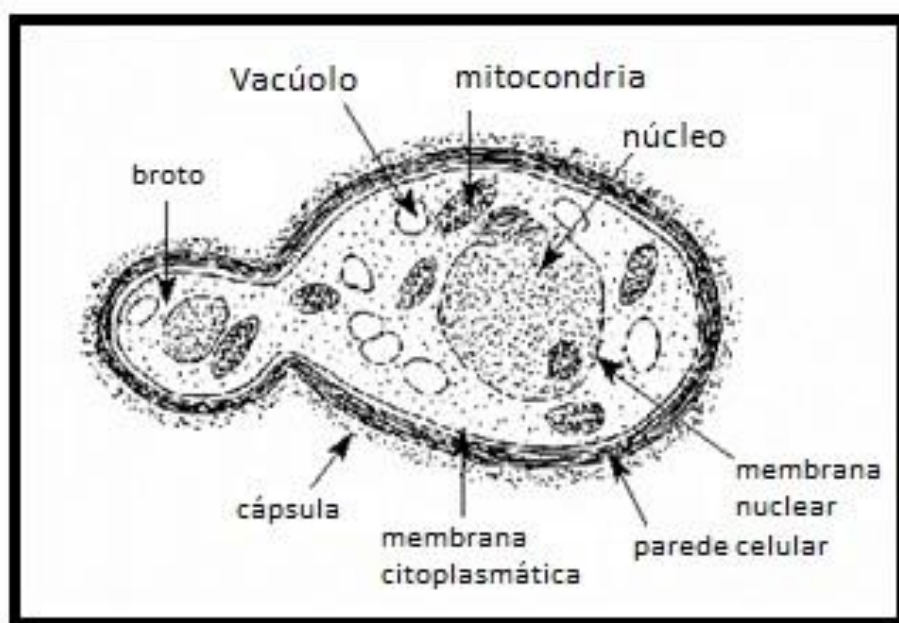
*S. cerevisiae* é um organismo eucariótico unicelular, não patogênico que possui um ciclo de vida curto de aproximadamente 90 minutos e o seu crescimento e manutenção não são muito dispendiosos (ALTMANN et al., 2007). As células de leveduras têm semelhanças notáveis com as células de mamíferos, incluindo macromoléculas, organelas, várias proteínas e genes ortólogos relacionados a doenças humanas (PLOGER et al., 2000) (Figura 3). Genes do tipo selvagem podem ser substituídos por alelos alterados ou interrompidos. O fenótipo resultante após a interrupção ou deleção de genes da levedura tem contribuído para a compreensão da função de inúmeras proteínas *in vivo* (SHERMAN, 1997; 2002).

Assim como em células eucarióticas, a levedura apresenta um eficaz mecanismo de defesa antioxidante, o qual pode ser estudado utilizando cepas com deleção de genes específicos, inclusive genes envolvidos nas defesas enzimáticas e não enzimáticas, dentre eles: *Gsh1* –  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase, catalisa o primeiro passo na biossíntese da glutatona (GSH). Sua expressão é induzida por oxidantes, cádmio e mercúrio. A abundância da proteína aumenta em resposta ao stress. É um gene não essencial, sua mutação nula confere auxotrofia à glutatona, seu crescimento é lento e ocorre aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo (KISTLER et al. 1990; GRANT et al. 1996); *Gpx1* – Glutationa peroxidase é induzida pela diminuição de glicose que protege as células dos hidroperóxidos de fosfolipídios e peróxidos não fosfolipídeos durante o estresse oxidativo; GPX1 tem um parálogo, HYR1, que surgiu a partir de toda a duplicação do genoma (INOUE et al. 1999); *Ctt1* – Catalase citosólica T; tem um papel na proteção contra os danos oxidativos causados por peróxido de hidrogênio. Gene não essencial, o mutante nulo alongou sua vida cronológica, é sensível ao ressecamento, ao choque térmico, estresse oxidativo, e vários produtos químicos. Em estudos de grande escala de aptidão competitiva, é reduzido em meio mínimo, mas aumentou em meio com glicerol ou etanol (TRACZYK et al 1985); *Sod1* – Superóxido dismutase, cobre-zinco citoplasmática, entra núcleo sob estresse oxidativo para promover a transcrição de genes de resposta ao estresse. É ortólogo humano da SOD1 implicado em Esclerose Lateral Amiotrófica, aumenta abundância sob estresse, replicação do DNA e durante a exposição ao ácido bórico. Gene não essencial, o mutante nulo requer lisina e metionina, exibe um defeito de crescimento sob condições respiratórias. Apresenta diminuição da vida útil cronológica e replicativa, e é sensível a uma variedade de tensões ambientais, incluindo o stress oxidativo, desidratação, pH alcalino, e a presença de vários produtos químicos. (GRALLA, et al. 1991; CULOTTA,

2006); *Prx1* – Peroxiredoxina mitocondrial com atividade de tiorredoxina peroxidase, é um membro da família 1-Cys das Prx's sendo ativada por peroxidases. Tem um papel importante na redução de hidroperóxidos, sua reativação requer Trx2p e glutatona. É induzida durante o crescimento respiratório e estresse oxidativo, é fosforilada e tem sua abundância aumenta em resposta ao stress de replicação de DNA (PEDRAJAS, et al. 2000). *Trx1* – isoenzima tiorredoxina citoplasmática é parte do sistema tiorredoxina que protege as células contra o estresse oxidativo e redutor, sua abundância aumenta sob estresse e replicação do DNA. TRX1 tem um parálogo, TRX2, que surgiu a partir de toda a duplicação do genoma (MULLER, EG. 1991). E a *Yap1* – fator de transcrição (bZIP), é necessário para a tolerância ao estresse oxidativo, é ativada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por meio da formação de várias etapas de ligações dissulfeto e de trânsito a partir do citoplasma para o núcleo. Yap1p é degradada no núcleo após o stress oxidativo e medeia a resistência ao cádmio, sua distribuição relativa ao núcleo aumenta a tensão sobre a replicação de DNA. YAP1 tem um parálogo, CAD1, que surgiu a partir de toda a duplicação do genoma (MORTIMER, 1989).

Considerando tais características, o uso de células de levedura como um organismo modelo constitui uma ferramenta relevante para avaliar o papel do estresse oxidativo na toxicologia de vários agentes, incluindo metais pesados.

Figura 4. Diagrama simplificado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.





## 2. JUSTIFICATIVA

Embora compostos contendo mercúrio sejam reconhecidos pelos efeitos adversos que causam a saúde humana e ao ambiente, estudos acerca dos precisos mecanismos envolvidos nos seus efeitos tóxicos em nível celular, ainda são escassos e merecem uma atenção especial.

Com relação ao MeHg, existem mais estudos voltados para esses aspectos e no geral o conhecimento sobre os efeitos do composto em diferentes tipos celulares *in vitro* e *in vivo* é mais amplo e vêm crescendo gradualmente. O EtHg, um composto também de grande relevância para a saúde pública, o número de pesquisas ainda é discreto e pouco se sabe sobre os eventos citotóxicos mediados por este compostos nas células.

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a toxicologia dos mercuriais nos sistemas biológicos e de comparar os efeitos de duas formas importantes de mercúrio em termos de intoxicação, o presente estudo foi delineado para caracterizar parâmetros toxicológicos em *S. cerevisiae* associados com a exposição aos compostos MeHg e EtHg, com enfoque em estresse oxidativo como evento envolvido nos efeitos analisados.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar e comparar os efeitos tóxicos entre o MeHg e EtHg em cepas selvagem e cepas com genes deletados relacionados às defesas antioxidantes de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Analisar o efeito da exposição ao MeHg e EtHg sobre a formação de Espécies Reativas, e também, sobre a permeabilidade da membrana na cepa selvagem de *S. cerevisiae*;
- Avaliar o efeito do crescimento celular da cepa selvagem e das cepas com deleção de genes relacionados às defesas antioxidantes de *S. cerevisiae* expostas ao MeHg e EtHg, bem como, a formação de colônias em meio sólido;
- Investigar o envolvimento dos sistemas antioxidantes na proteção da célula contra a exposição aos compostos organomercuriais.

#### 4. MANUSCRITO

### TOXIC EFFECTS OF METHYL AND ETHYLMERCURY TOWARD *Saccharomyces cerevisiae*: A COMPARATIVE STUDY

Angelica Ramos<sup>1</sup>, Matheus M. dos Santos<sup>1</sup>, Gabriel T. de Macedo<sup>1</sup>, Claudio A. Masuda<sup>2</sup>,  
Cristiane L. Dalla Corte<sup>3</sup>, Nilda B. V. Barbosa<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal do Pampa, Campus Caçapava do Sul, Caçapava do Sul, RS, Brasil.

\* Corresponding author: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. nvbarbosa@yahoo.com.br.

## ABSTRACT

Mercury is a toxic metal widely dispersed in nature that severely affects the environment and humans. Methylmercury (MeHg) is highly neurotoxic and human exposure results mainly from consumption of contaminated fish. Neurological symptoms also have been evidenced in human exposed to Ethylmercury (EtHg), which is present in thimerosal-containing vaccines. Using *Saccharomyces cerevisiae* as model organism, this study aimed to investigate and compare the toxicity of MeHg and EtHg, emphasizing the participation of oxidative stress on cell alterations. Wild type and mutant strains with deleted genes for antioxidant defenses, namely:  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\Delta Gsh1$ ), glutathione peroxidase ( $\Delta Gpx1$ ), catalase T ( $\Delta Ctt1$ ), superoxide dismutase ( $\Delta Sod1$ ), mitochondrial peroxiredoxin ( $\Delta Prx1$ ), cytoplasmic thioredoxin ( $\Delta Trx1$ ) and redox transcription factor ( $\Delta Yap1$ ) were used to identify events and target proteins linked to MeHg and EtHg cytotoxicity. Both compounds significantly inhibited cell growth and increased membrane permeability and ROS production in wild type yeast cells. In general, all mutants had their growth affected by compounds, exhibiting higher tolerance to MeHg. Our results indicate the involvement of oxidative stress in the detrimental effects induced by MeHg and EtHg and point *S. cerevisiae* as a suitable model to investigate the toxicology of mercurials.

**Key words:** mercury, oxidative stress, yeast

## 1. Introduction

Mercury (Hg) is considered by World Health Organization (WHO) one of the ten most hazardous chemicals for human health. It may be found in nature mainly as product from volcanic action, weathering of rocks, anthropogenic activity in industrial processes and mining (WHO). Among mercury containing compounds, methylmercury (MeHg) is pointed as the main way of human exposure to Hg, being contaminated fish consumption the main route of human exposure to the compound (Clarkson e Magos, 2006). In Brazil, cases of MeHg intoxication have been reported in many regions from Amazonian territory, especially in mining and fish-eating populations (Marques, et al. 2013). It is well known that MeHg intoxication can result in severe and irreversible damage to the central nervous system (Clarkson, et al. 2003; Franco, 2009; Farina, et al. 2011a;b). In addition to neurotoxicity, recent studies have highlighted the harmful effects of MeHg towards cardiovascular system (de Marco, et al. 2010; Moreira, et al. 2012). Different mechanisms are involved in the molecular and cellular toxicity elicited by MeHg. In this regard, events associated with oxidative stress such as thiol depletion, mitochondrial dysfunctions, calcium dyshomeostasis, excitotoxicity and free radical overproduction have been considered important mediators of MeHg cytotoxicity (Roos, et al., 2010; Farina, et al., 2011a; Dalla Corte, et al., 2012a).

Another organomercury that has received considerable toxicological attention is ethylmercury (EtHg). The compound shares some chemical properties with MeHg and is known as metabolite of thimerosal (sodium ethyl mercury thiosalicylate), which is used as a preservative for drugs and vaccines in many countries (Pless e Risher, 2000; Rodrigues, 2015). Although, there is no evidence on the toxicity from low doses found in vaccines; it is important consider the fact that repeated exposure to low doses might occur from pregnancy to postnatal vaccination schedule (Marques et al., 2007; Barile et al, 2012; Dórea, 2010; 2011). In this sense, epidemiological studies have evidenced a significant relationship between increased Hg exposure from thimerosal in childhood vaccines and neurological deficits (Dórea, 2012). In terms of action mechanisms, the toxic effects of EtHg are less investigated than MeHg, and researches toward EtHg in biological systems are still scarce. However, there is experimental evidence that EtHg elicits increase in ROS production, changes in mitochondrial membrane permeability and calcium influx and disturbances in thioredoxin cycle (Migdal et al. 2010; Rodrigues, et al. 2015).

*Saccharomyces cerevisiae* has emerged as advantageous tool for exploring a wide variety of biological aspects, including toxicological parameters (Kitagaki et al, 2007). Yeast cells exhibit conserved molecular pathways and a high degree of genetic similarities with mammalian cells (Ploger et al., 2000). Important, yeast cells exhibit a complete machinery against oxidative phenomena, which encompasses the action of glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase, thioredoxin reductase, peroxiredoxin reductase and DNA repair enzymes (Sherman, 2002).

Considering mainly following aspects: i) the scarcity of comparative studies about EtHg and MeHg toxicities in biological systems and the importance of them to understand the biochemical basis by which mercury exposure triggers cellular damage; ii) the importance of use and validation of *S. cerevisiae* as a simple alternative model for investigating cellular dysfunctions caused by environmental toxicants including heavy metals; in this study, we sought to compare how MeHg and EtHg toxicities are established in *S. cerevisiae*, emphasizing the participation of oxidative stress on cell alterations. For this purpose, *S. cerevisiae* wild type and mutant strains with genes deleted for antioxidant defenses were used to identify events and target proteins linked to MeHg and EtHg cytotoxicity.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Chemicals*

Agar, bactopectone and yeast extract were purchased from Difco (USA). Methylmercury chloride (MeHgCl), Ethylmercury chloride (EtHgCl), Dihydrorhodamine 123 (DHR) and Propidium Iodide (Pi) were purchased from Sigma (USA). The other chemicals were of analytical grade and purchased from local commercial suppliers.

### *2.2. Growth Conditions*

The *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. All strains were kindly provided by Prof. Dr. Monica Lomeli and Prof. Dr. Claudio Masuda of Institute of Medical Biochemistry from Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). Cells were growth in YPD medium (2% peptone, 1% extract yeast, 2% glucose) under overnight incubation at 250 rpm shaking, 30°C until an optical density (OD) of 0.8.

### *2.3 Curve of growth*

For curve growth, the cells were inoculated into fresh liquid medium YPD in a final optical density (OD) of approximately 0.008. Wild-type and mutant strains were exposed to MeHg and EtHg at final concentrations ranging from 0.5 to 5  $\mu\text{M}$  for 12, 18 and 24 hours. Cells were shaking at 30°C during all period. Afterwards, cell density was determined by measuring the absorbance spectrophotometer at 600 nm (Azad et al, 2014; Tulha, et al. 2012).

### *2.4. ROS Determination*

ROS levels were determined in wild type strain (OD~0.08) using dihydrorhodamine 123 (DHR) probe as marker, accordingly the methodology described by Tulha et al (2012). Briefly, cells were exposed to MeHg and EtHg at final concentrations of 0.5, 1, 2.5 and 5  $\mu\text{M}$  for 24 hours. Afterwards, cells were centrifuged, washed twice with phosphate buffer (PBS) pH 7.4 and then incubated with dihydrorhodamine 123 (final concentration 20 $\mu\text{M}$ ) for 30 minutes in dark at 30°C. Fluorescence was measured in a Flow Cytometer BD Accuri, where probe signal was detected at FL1 530/30.

### *2.5. Evaluation of cell membrane permeability*

Cell membrane permeability was determined in wild type strain (OD~0.08) using the probe Propidium iodide (Pi). Yeast cells were exposed to MeHg and EtHg at final concentrations of 0.5, 1, 2.5 and 5  $\mu\text{M}$  for 24 hours. Afterwards, cells were washed twice with buffer PBS pH 7.4, and incubated with Pi (final concentration 30  $\mu\text{M}$ ) for 20 minutes. Fluorescence was measured at FL2 585/40 in a Flow Cytometer BD Accuri (Tulha et al., 2012).

### *2.6. Determination of yeast tolerance to MeHg and EtHg*

Tolerance of Wild type and mutant yeast cells to MeHg and EtHg was determined by spotting test, as described by Kwolek-Mirek and Zadrag-Tecza (2014), with minor modifications. Yeast cells were first grown in YPD solid media until an OD~8, and then diluted to OD=1. Four subsequent 1:10 dilutions of cell suspensions were performed. Then, 3 $\mu\text{L}$  of each dilution was plated onto YPD-agar medium containing MeHg or EtHg at final concentrations

of 0.5, 1.5 and 2.5  $\mu\text{M}$ . Plates were incubated for 48 hours and the colony growth compared between wild type and mutants.

### 2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was done using the software GraphPad Prism 6.0. Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical differences were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni *post-test* when appropriate. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### *Cell growth is impaired by MeHg and EtHg*

Firstly, we evaluated cell growth of wild-type strain exposed to MeHg and EtHg in liquid medium for 12, 18 and 24 hours. We observed that both mercury compounds affected significantly the growth of cells from 1  $\mu\text{M}$  (Figure 1A and 1B). After 24 hours, the cells exposed to 1  $\mu\text{M}$  MeHg and EtHg had about 70% and 40% growth respectively compared with the control. There was no cell growth in the medium containing the higher concentrations of MeHg and EtHg (2.5 and 5  $\mu\text{M}$ ). This effect was verified in all tested times.

### *MeHg and EtHg increase ROS levels in S.cerevisae*

ROS levels were measured in wild type strain treated with both mercury compounds (0.5 - 5  $\mu\text{M}$ ) for 24hs (Figure 2). The exposure of yeast cells to 0.5, 1 and 2.5  $\mu\text{M}$  MeHg and EtHg did not culminate with elevated ROS levels. However, a significant increase in ROS levels was verified in yeast cells treated with 5  $\mu\text{M}$  MeHg and EtHg (Figure 2A and 2B). The potential of compounds in inducing ROS overproduction was similar.

### *MeHg and EtHg increase membrane permeability in S.cerevisae*

Cell membrane permeability was evaluated in yeast exposed to mercury compounds (0.5 - 5  $\mu\text{M}$ ) for 24h, and further treated with Pi. Yeast cells exposed to MeHg and EtHg at



concentration of 5 $\mu$ M had a significant and similar increase in membrane permeability when compared to the values found in control group (Figure 3A and 3B). These effects elicited by compounds were not verified in cells exposed to concentrations of 0.5, 1 and 2.5  $\mu$ M.

#### *S. cerevisiae tolerance is diminished by MeHg and EtHg*

Considering the effects of mercury compounds in increasing ROS levels, we evaluated qualitatively the tolerance of some mutant strains for antioxidant defenses grown in solid medium containing MeHg and EtHg, namely the strains:  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\Delta Gsh1$ ), glutathione peroxidase ( $\Delta Gpx1$ ), catalase T ( $\Delta Ctt1$ ), superoxide dismutase ( $\Delta Sod1$ ), mitochondrial peroxiredoxin ( $\Delta Prx1$ ), cytoplasmic thioredoxin ( $\Delta Trx1$ ) and transcription factor for cellular stress ( $\Delta Yap1$ ). In this set of experiment was possible observe that all tested strains were more resistant to MeHg than EtHg and that the tolerance of them for both compounds decreased with increasing concentration (Figure 4). For MeHg, this effect was more prominent in cells grown in the medium containing 2.5  $\mu$ M of compound. Different, all strains were highly sensitive to EtHg from 1.5  $\mu$ M. The medium containing 2.5  $\mu$ M EtHg inhibited completely the cell growth in all dilutions tested (Figure 4).

#### *S. cerevisiae growth in liquid medium is inhibited by MeHg and EtHg*

In this set of experiments we investigated the effects of MeHg and EtHg on growth of wild type and mutant strains in liquid medium. In order to verify the pattern growth of each mutant cell, firstly, we evaluate the growth of mutant cells in relation to the wild-type strain. It was possible observe that there was no significant difference in the growth profile among strains (Figure 5). Afterwards, the experiments with mercury compounds were performed. Figure 6 shows the inhibition growth of yeast strains treated with MeHg at final concentrations ranging from 0.5 to 5  $\mu$ M. In general, the mutant strains were more sensitive to MeHg than wild type strain, used as control. Comparing all mutants, it is possible observe that the strains with deletion in genes encoded for  $\Delta Gsh1$  and  $\Delta Ctt$  were more sensitive to MeHg (Figure 6). The growth of these mutants was markedly inhibited from 0.5 $\mu$ M and 1  $\mu$ M MeHg, respectively. Exception for  $\Delta Gpx1$  and  $\Delta Trx1$ , a complete inhibition of growth was verified in MeHg-treated strains from 2.5 $\mu$ M (Figure 6A, 6B, 6D, 6E and 6F).

Results from figure 7 illustrate the inhibition growth of strains EtHg- treated in liquid medium. All tested strains were more sensitive to EtHg than MeHg. EtHg exposure decreased significantly the growth of strains from 0.5  $\mu$ M and caused a total growth inhibition from 1  $\mu$ M. Among different mutants, EtHg affected mainly those with deletion in  $\Delta Yap1$ ,  $\Delta Sod1$  and  $\Delta Trx1$  genes (Figure 7A, 7E, 7G).

#### 4. Discussion

The toxicity of organic mercury compounds has been studied for a long time (Clarkson, 2002; Dórea, 2008; Marques et al, 2010). In this scenario, the environmental exposures to MeHg and their neurotoxic effects are responsible for the large number of studies in this field (Clarkson, 2007; 2006). Different from MeHg, the principal form of exposure to EtHg is in vaccines where it is found as thimerosal (Dórea, 2010; 2011). Also important, recent studies have reported developmental delays in children and newborn exposed to low and continuous doses of EtHg from thimerosal (Geier et al., 2015; Dórea, 2011, 2016). Although the symptoms from intoxication by MeHg and EtHg are relatively known in humans, the precise mechanisms involved in the detrimental effects triggered by compounds in biological systems are not fully understood. With this in mind, this study aimed to compare the toxicities of EtHg and MeHg, using yeast cells as toxicological target. To our knowledge this is one of the few studies utilizing *S. cerevisiae* to evaluate mercury-induced toxicities.

Firstly, we evaluated the growth profile of wild-type strain exposed to different concentrations of MeHg and EtHg. In general, both compounds were toxic to cells by inhibiting significantly cell growth. However, the toxicity elicited by low concentrations of EtHg was more pronounced than MeHg in this parameter. The exposure of wild-type strains to mercury compounds was similarly marked by two interesting phenomena: ROS overproduction and membrane permeability loss.

Increased ROS levels has been postulated as an important hallmark of oxidative stress induced by mercury-containing compounds in different experimental models (Roos et al, 2010; Marques, 2014, Dórea, 2014). In diverse mammalian cell types, MeHg exposure commonly culminates with exacerbated generation of ROS (Dalla Corte et. al., 2012a; Shanker, et al. 2005; Dórea, 2013). The high affinity of compound for -SH groups from low molecular weight molecules and thiol-containing proteins and the consequent antioxidant

system disruption have been pointed out as principal mechanism involved in this effect (Roos et al., 2010; Farina, 2011b). Increased production ROS and reduced intracellular GSH are also phenomena observed in some cell lines exposed to EtHg (Choi et al., 2009; Migdal et al., 2010; Zimmermann et al., 2013). Corroborating results from literature with other organisms, here we found that both compounds display analogous effects on ROS formation in *S. cerevisiae*, increasing ROS levels at concentration of 5 $\mu$ M.

Another signal of MeHg and EtHg toxicity towards *S. cerevisiae* was the change caused in membrane permeability to the dye Pi, characteristic that might be associated with loss of cell viability and cell death. Although there are no related published data with yeast, these findings have been evidenced in other models. An elegant study performed by Baskin and collaborators demonstrated that thimerosal induces membrane and DNA damage and apoptosis in human neurons and fibroblasts (Baskin et al., 2003). For MeHg, these effects have already been reported in several cell types (Kuo, 2004; Fujimura and Usuki, 2015; Dupont et al, 2016). Important, a recent comparative study on MeHg and EtHg effects in rat glioma C6 cells also demonstrated the analogous toxicities of compounds regarding cellular viability (Zimmermann et al., 2013).

The impairment of antioxidant defense systems is among the main harmful effects provoked by exposures to mercury compounds in experimental studies (Farina, et al, 2011a). Similar to mammalian, yeast antioxidant machinery is composed by a wide range of enzymes that in response to oxidative insults can be accurately regulated (Mortimer, 2000; Pereira, et al. 2012; Morano, et al. 2012). In *S. cerevisiae*, the expression of antioxidant enzyme genes is thinly controlled by redox-sensitive transcription factor YAP-1, a functional homologue of mammalian AP-1 factor (Activator protein 1) in yeast. Under oxidative stress-inducing conditions, Yap1 dissociates from cytosolic inhibitory protein Crm1 and translocates to the nucleus, leading to enhanced expression of the target genes (Kuge., et al. 1998; Maeta, et al. 2004). In addition to YAP1, here we analyzed the effects of MeHg and EtHg particularly in strains with deletion in genes for  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\Delta Gsh1$ ), glutathione peroxidase ( $\Delta Gpx1$ ), mitochondrial peroxiredoxin ( $\Delta Prx1$ ), cytoplasmic thioredoxin ( $\Delta Trx1$ ), catalase T ( $\Delta Ctt1$ ), superoxide dismutase ( $\Delta Sod1$ ), proteins known by their important role as regulators of the intracellular redox environment, and that usually are affected by mercury exposure in other organisms. Among them, it is important highlight the isoforms from glutathione and thioredoxin systems, which have been described as central targets of MeHg poisoning (Franco et al, 2009; Zemolin et al., 2012; Carocci, et al, 2014; Branco, et al 2011).

GPX isoforms catalyze the reduction of different peroxide species at the expense of GSH, whereas TRX isoforms catalyze the transfer of reducing equivalents between NADPH and thioredoxin, presenting a critical role in cycling GSSG/GSH (Flohe, et al, 1973; Nordberg, et al 2001). Analyzing the growth of mutant strains, we verified that the mutant  $\Delta Gsh1$  was more sensitive to MeHg, followed by  $\Delta Ctt1$ ,  $\Delta Prx1$ ,  $\Delta Yap1$  and  $\Delta Sod1$ . Different,  $\Delta Sod1$  was the mutant that exhibited higher sensitivity to EtHg, followed by  $\Delta Yap1$  and  $\Delta Trx1$ . To note, the growth of all tested mutants was more affected by EtHg than MeHg. Taken together, these data indicate that in addition to GPX and TRX systems, catalase and superoxide dismutase seem play a key role on redox dyshomeostasis induced by MeHg and EtHg in *S. cerevisiae*. Collectively, the data of the present work show that both MeHg and EtHg exhibit similar toxic potential toward *S. cerevisiae*. In terms of action mechanisms, the results indicate that probably the stress oxidative had a strong participation on the harmful effects elicited by both compounds, since mutants with deletion in genes engaged for pathways related with antioxidant defenses were markedly sensitive to compounds. Additionally, this study points *S. cerevisiae* as a suitable model to investigate and expand the knowledge about the toxicology from mercurials, considering the fact that the findings obtained corroborate with those found in vertebrates.

### **Acknowledgments**

The financial supports by FAPERGS, CAPES and CNPq are gratefully acknowledged. J.B.T.R and N.V.B are recipients of CNPq fellowships. The authors declare that they have no competing interests.

## 5. References

- AZAD, G. K. et al. Ebselen induces reactive oxygen species (ROS)-mediated cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae* with inhibition of glutamate dehydrogenase being a target. *FEBS Open Bio*. Jan 6;4:77-89. 2014.
- BARILE, J. P. et al. Thimerosal exposure in early life and neuropsychological outcomes. *J Pediatr Psychol*. Jan-Feb;37(1):106-18. 2012.
- BASKIN, D.S.; NGO, H.; DIDENKO, V.V. Thimerosal induces DNA breaks, caspase-3 activation, membrane damage, and cell death in cultured human neurons and fibroblasts. *Toxicol Sci*. Aug;74(2):361-8. 2003.
- BRANCO V., et al. Inhibition of the thioredoxin system in the brain and liver of zebra-seabreams exposed to waterborne methylmercury. *Toxicol Appl Pharmacol*. Mar 1; 251(2):95-103. 2011.
- CAROCCI, A. et al. Mercury toxicity and neurodegenerative effects. *Rev Environ Contam Toxicol*.; 229:1-18. 2014.
- CHOI, A.L., et al. Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in Faroese whaling men. *Environ. Health Perspect*. 117, 367–372. 2009.
- CLARKSON, T.W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol*. Sep;36(8):609-62. 2006.
- CLARKSON, T.W. The Three Modern Faces of Mercury. *Environmental Health Perspectives* Feb: 110. 2002.
- CLARKSON, T. W.; MAGOS, L.; MYERS G. J. The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations, *N. Engl. J. Med*. 349 (18) 1731–1737. 2003
- CLARKSON, T.W.; VYAS, J.B; BALLATORI, N. Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med*. Oct; 50(10):757-64. 2007.
- DALLA CORTE, C.L. et al. The combination of organoselenium compounds and guanosine prevents glutamate-induced oxidative stress in different regions of rat brains. *Brain Res*. Jan 9;1430:101-11. 2012
- DE MARCO, K. C, et al. Environmental exposure to methylmercury is associated with a decrease in nitric oxide production. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 106, 411–415. 2010.
- DÓREA, J.G, MARQUES, R.C, ABREU, L. Milestone achievement and neuro- development of rural Amazonian toddlers (12 to 24 months) with different methylmercury and ethylmercury exposure. *J Toxicol Environ Health A* 77:1–13. 2014.
- DÓREA, J. G. Further considerations on hair mercury as surrogate of fish consumption and time to pregnancy in Japanese women. *Int J Hyg Environ Health*. Jul;211(3-4):463-4. 2008

DÓREA, J. G.; MARQUES, R. C.; ISEJIMA, C. Neurodevelopment of Amazonia infants: antenatal and postnatal exposure to methyl- and ethylmercury. *J Biomed Biotechnol*; 2012:132876. 2012

DÓREA, J. G.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *J Appl Toxicol*. 33(8):700-11, 2013.

DÓREA, J. G. Integrating experimental (in vitro and in vivo) neurotoxicity studies of low-dose thimerosal relevant to vaccines. *Neurochem Res*. Jun;36(6):927-38. 2011

DÓREA, J. G. Making sense of epidemiological studies of young children exposed to thimerosal in vaccines. *Clin Chim Acta*. Nov 11;411(21-22):1580-6, 2010

DÓREA, JG; MARQUES RC. Mercury levels and human health in the Amazon Basin. *Annals of Human Biology*, 43(4):349–359, 2016

DUPONT A, et al. Effects of Methylmercury on Harbour Seal Peripheral Blood Leucocytes In Vitro Studied by Electron Microscopy. *Arch Environ Contam Toxicol*. Jan;70(1):133-42. 2016

FARINA, M; ASCHNER, M; ROCHA, J. B. T. Oxidative stress in MeHg -induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*.;256(3):405–417. 2011a

FARINA, M.; ROCHA, JB.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci*. 2011 Oct 10;89(15-16):555-63. doi: 10.1016/j.lfs.2011.05.019. Epub Jun 13. 2011b

FLOHE L, GÜNZLER WA, SCHOCK HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*. May 15;32(1):132-4. 1973

FRANCO, J. L. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radical Biology & Medicine* 47; 449–457. 2009

FUJIMURA, M; USUKI, F. Methylmercury causes neuronal cell death through the suppression of the TrkA pathway: in vitro and in vivo effects of TrkA pathway activators. *Toxicol Appl Pharmacol*. Feb 1;282(3):259-66. 2015.

GEIER, D. A. et al. Thimerosal: clinical, epidemiologic and biochemical studies. *Clin Chim Acta*. Apr 15;444:212-20. 2015

KITAGAKI, H. et al. Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Lett*. Jun; 581:2935-2942. 2007.

KUGE, S, et al. Crm1 (XpoI) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells*. Aug;3(8):521-32. 1998

KUO, T.C, LIN-SHIAU, S.Y. Early acute necrosis and delayed apoptosis induced by methyl mercury in murine peritoneal neutrophils. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. Jun;94 (6):274-81. 2004

KWOLEK-MIREK, M; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res.* Nov;14(7):1068-79. 2014.

MAETA, K., et al. Activity of the Yap1 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by methylglyoxal, a metabolite derived from glycolysis. *Mol Cell Biol.* Oct;24(19):8753-64. 2004.

MARQUES R.C, DÓREA J.G; BERNARDI, J.V. Thimerosal exposure (from tetanus-diphtheria vaccine) during pregnancy and neurodevelopment of breastfed infants at 6 months. *Acta Paediatr.* Jun;99(6):934-9. 2010.

MARQUES, R.C. et al. Fish consumption during pregnancy, mercury transfer, and birth weight along the Madeira River Basin in Amazonia. *Int J Environ Res Public Health.* May 28;10(6):2150-63. 2013.

MARQUES, R.C. et al. Hair mercury in breast-fed infants exposed to thimerosal-preserved vaccines. *Eur J Pediatr.* Sep;166(9):935-41. 2007.

MARQUES, R.C. et al. Perinatal multiple exposure to neurotoxic (lead, methylmercury, ethylmercury, and aluminum) substances and neurodevelopment at six and 24 months of age. *Environ Pollut;* 187:130–5. 2014.

MIGDAL, C., et al. Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling. *Toxicology.* 274, 1-9, 2010.

MORANO, K.A;GRANT, C.M; MOYE-ROWLEY, W.S. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* Apr;190(4):1157-95. 2012.

MOREIRA, E. L., et al . Does Methylmercury-Induced Hypercholesterolemia Play a Causal Role in Its Neurotoxicity and Cardiovascular Disease? *Toxicological Sciences* 130(2), 373–382. 2012.

MORTIMER, R. K. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.* Apr;10(4):403-9. 2000.

NORDBERG, J.; ARNÉR, ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* Dec 1;31(11):1287-312. 2001.

PEREIRA C., et al. Newtherapeutic strategies for cancer and neurodegeneration emerging from yeast cell-based systems. *Curr. Pharm. Des* 18; 4223–4235. 2012.

PLESS, R; RISHER J. F. Mercury, infant neurodevelopment, and vaccination. *J Pediatr.* May;136(5):571-3. 2000.

PLOGER, R. et al. XREFdb: cross-referencing the genetics and genes of mammals and model organisms. *Nucleic Acids Res.* Jan 1;28(1):120-2. 2000.

RODRIGUES, J. et al. Toxicological effects of thiomersal and ethylmercury: Inhibition on thioredoxin system and NADP<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases of the pentose phosphate pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* Aug 1;286(3):216-23.. 2015.

ROOS, D.H. et al. Complex methylmercury-cysteine alters mercury accumulation in different tissues of mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* Oct;107(4):789-92, 2010

SHANKER, G. et al. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 137:11–22; 2005.

SHERMAN, F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.*;350:3-41. 2002.

TULHA, J. et al. Programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae* is hampered by the deletion of GUP1 gene. *BMC Microbiol.* May 22;12:80. 2012.

UNEP, United Nations Environment Programme. **Mercury: time to act.** [http://www.unep.org/PDF/PressReleases/Mercury\\_TimeToAct\\_hires.pdf](http://www.unep.org/PDF/PressReleases/Mercury_TimeToAct_hires.pdf). 2013

UNEP, United Nations Environment Programme. **Reducing mercury use in artisanal and small-scale gold mining.** [http://www.unep.org/hazardoussubstances/Portals/9/Mercury/Documents/ASGM/Techdoc/UNEP%20Tech%20Doc%20APRIL%202012\\_120608b\\_web.pdf](http://www.unep.org/hazardoussubstances/Portals/9/Mercury/Documents/ASGM/Techdoc/UNEP%20Tech%20Doc%20APRIL%202012_120608b_web.pdf). 2012

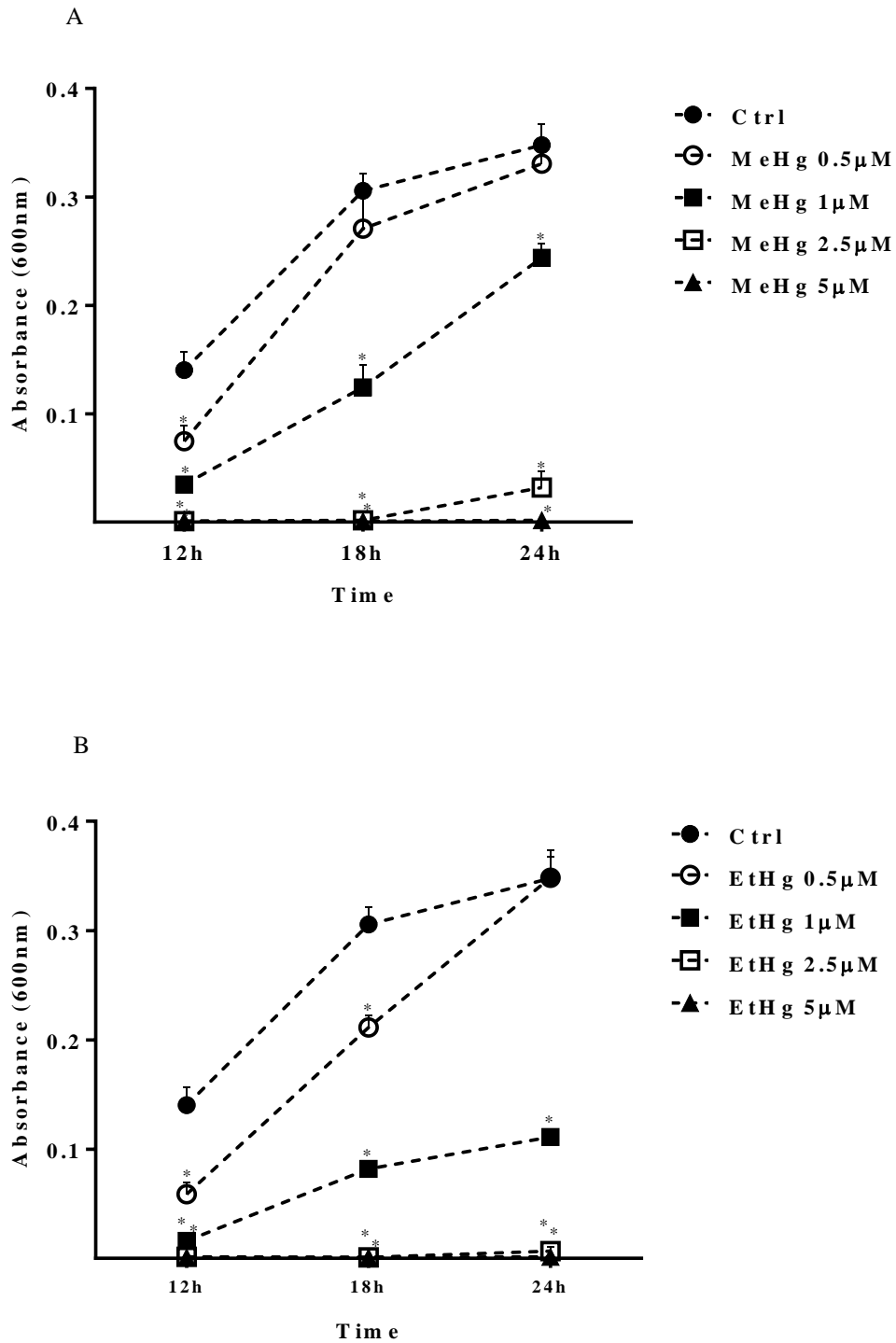
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mercury and health (Fact sheet No. 361). Geneva, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/en/>. Acesso em: 16 jun 2016

ZEMOLIN, A.P. et al. Evidences for a role of glutathione peroxidase 4 (GPx4) in methylmercury induced neurotoxicity in vivo. *Toxicology.* Dec 8;302(1):60-7. 2012

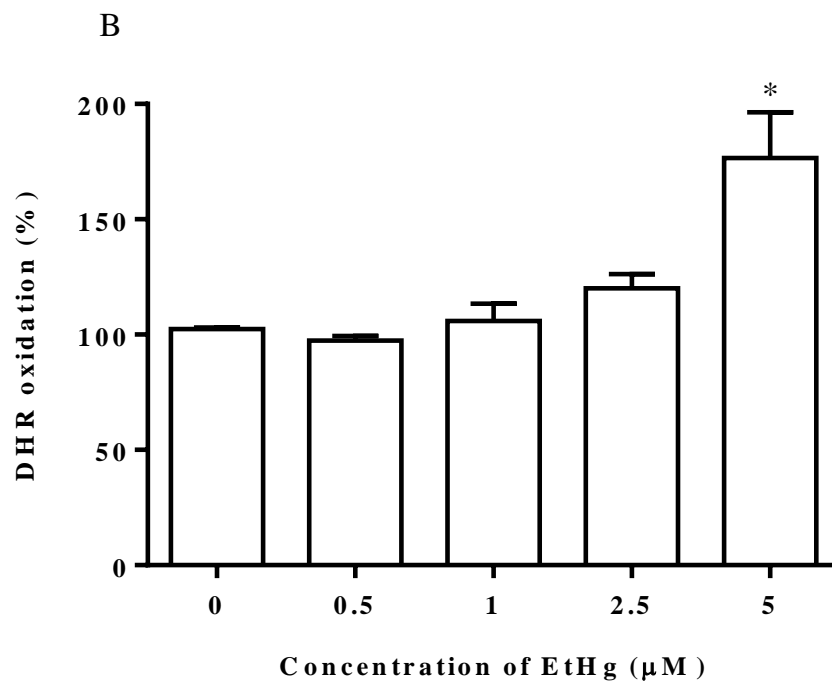
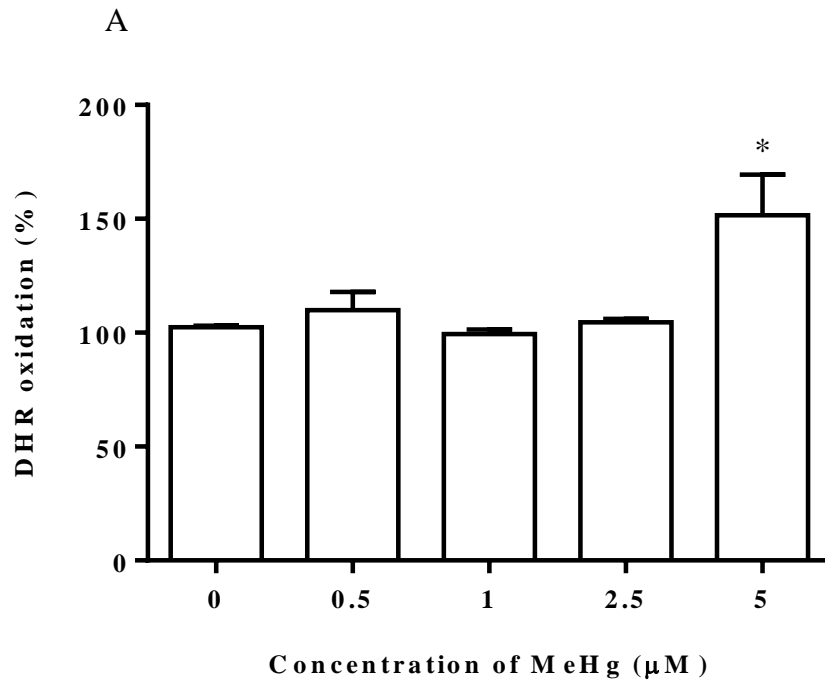
ZIMMERMANN, L.T. et al. Comparative study on methyl- and ethylmercury-induced toxicity in C6 glioma cells and the potential role of LAT-1 in mediating mercurial-thiol complexes uptake. *Neurotoxicology.* Sep;38:1-8. 2013.



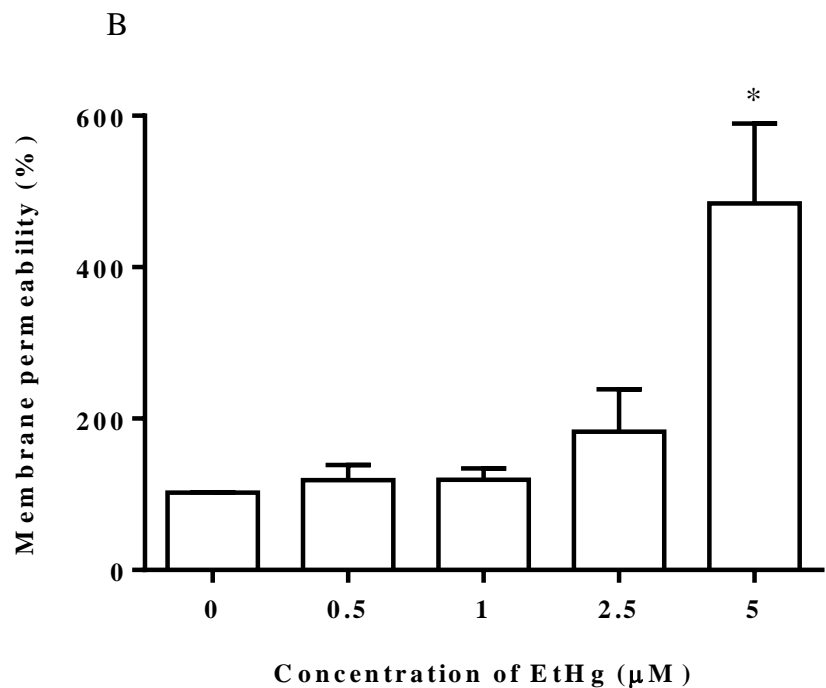
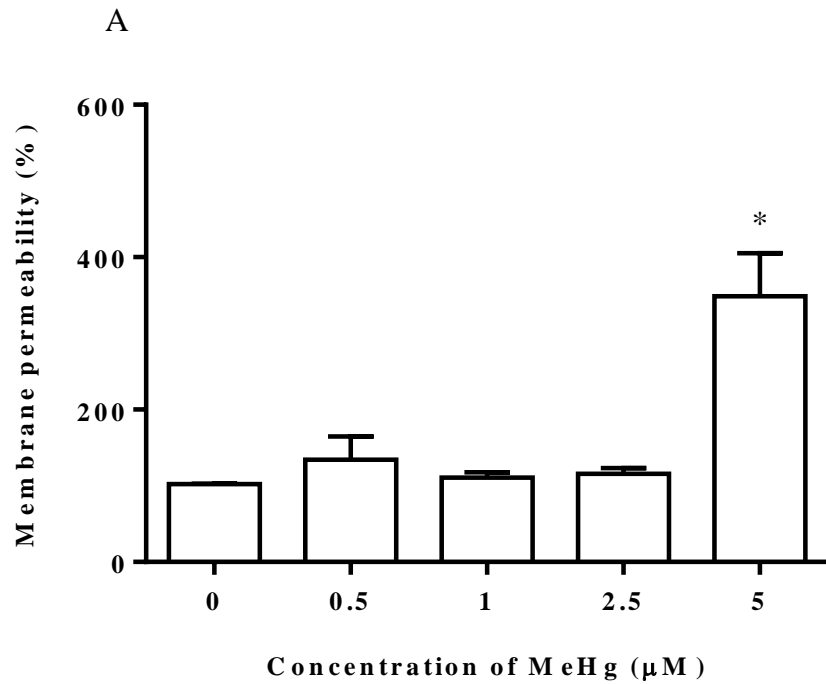
## 6. Figures



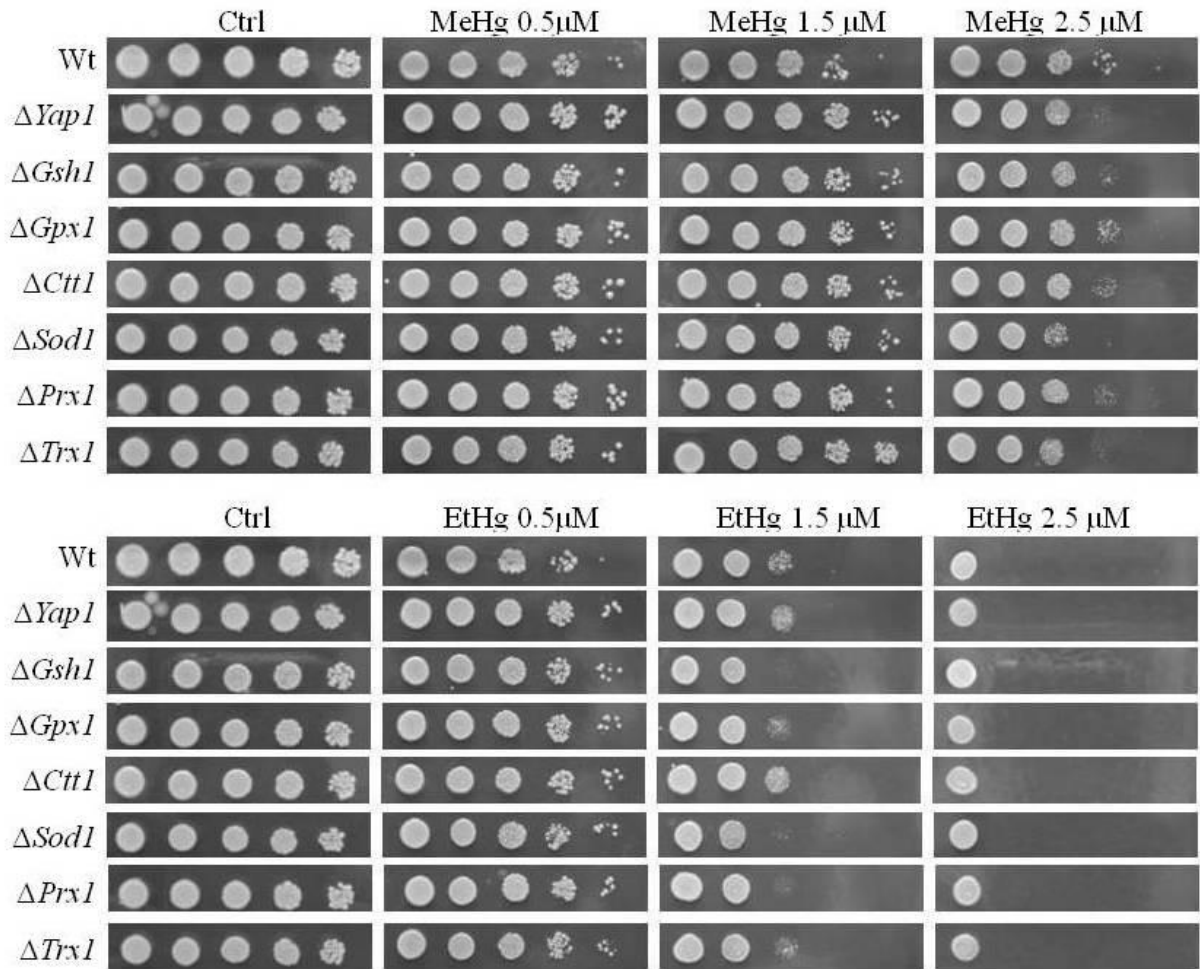
**Figure 1. Effect of MeHg and EtHg on *Saccharomyces cerevisiae* growth.** Wild type strains were treated with MeHg (A) and EtHg (B) for 12, 18 and 24h at 30°C under shaking. Cell density was determined by measuring the absorbance in spectrophotometer at 600 nm. Values are expressed as mean±SEM of four independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. \*p<0.05 compared to control.



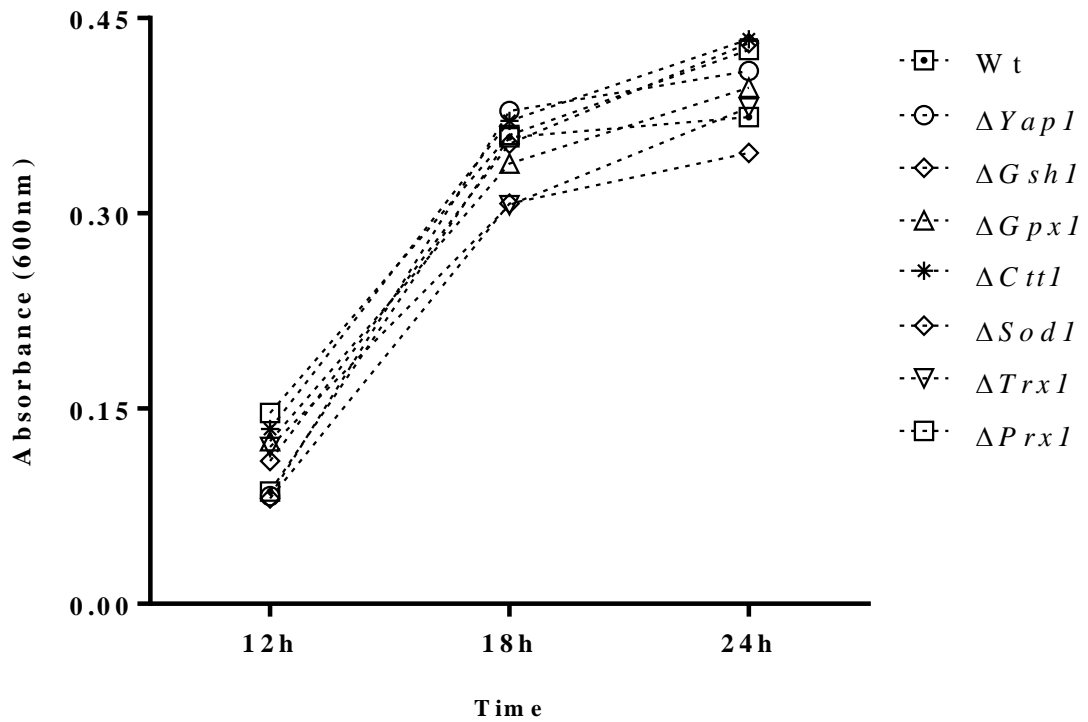
**Figure 2. Effect of MeHg and EtHg on ROS levels in *Saccharomyces cerevisiae***  
 ROS production induced by MeHg (A) and EtHg (B) was analyzed in Wild type strains by flow cytometer after 24h of exposure. Values are expressed as mean $\pm$ SEM of four independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. \*p<0.05 compared to control.



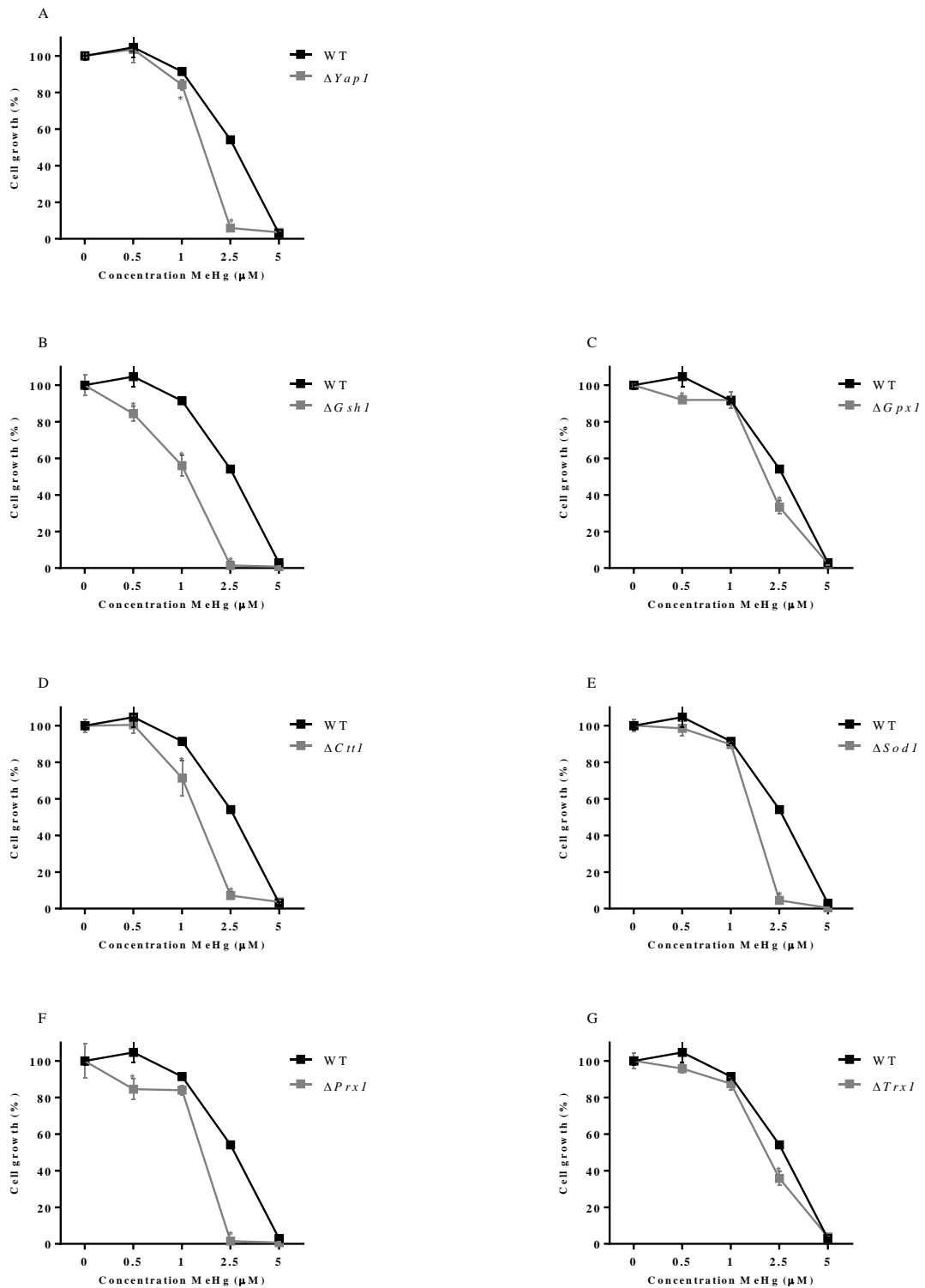
**Figure 3. Effect of MeHg and EtHg on membrane permeability of *Saccharomyces cerevisiae*.** Plasma membrane permeability was analyzed in Wild type strains by flow cytometer after 24h of exposure to MeHg (A) or EtHg (B). Values are expressed as mean $\pm$ SEM of four independent experiments (n=4). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. \*p<0.05 compared to control.



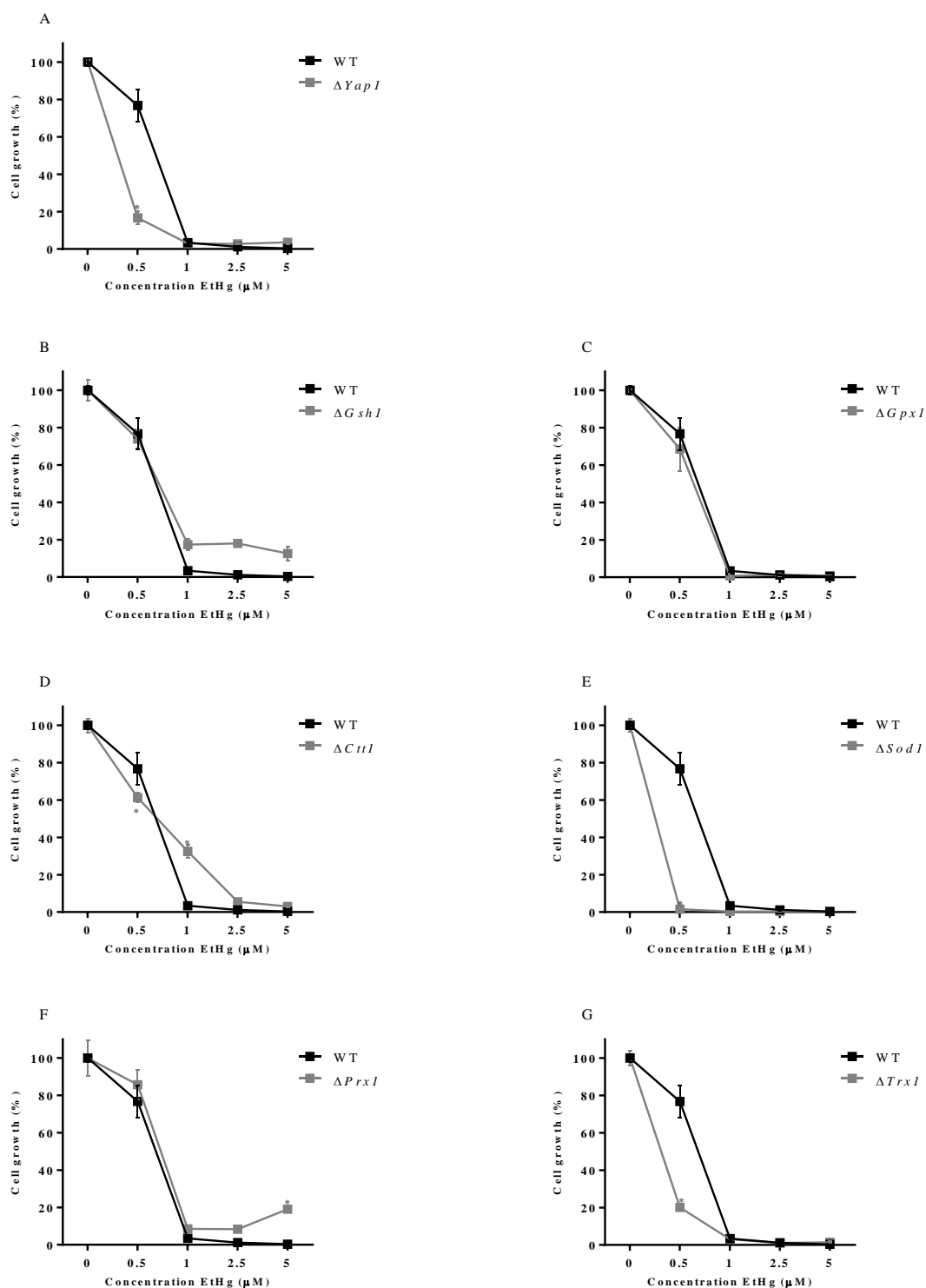
**Figure 4. *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to MeHg and EtHg.** Tolerance of wild type and mutant strains to MeHg and EtHg was determined by spot test. Cells were first grown in YPD media until OD=1. Four subsequent 1:10 dilutions were plated on YPD-agar containing 0.5, 1.5 and 2.5  $\mu\text{M}$  MeHg or EtHg. Plates were then incubated for 48 hours. The picture represents the data of four independent experiments.



**Figure 5. Growth profile of mutant strains.** Wild type and mutant strains were kept for 12, 18 and 24h at 30°C under shaking. After, cell density was determined by measuring the absorbance in spectrophotometer at 600 nm. Values are expressed as mean±SEM of four independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.



**Figure 6. Effect of MeHg on growth of mutant strains.** Cells were treated with MeHg in liquid medium for 24h at 30°C under shaking. Cell density was determined by measuring the absorbance in spectrophotometer at 600 nm. (A) $\Delta Yap1$  (B) $\Delta Gsh1$  (C) $\Delta Gpx1$  (D) $\Delta Ctt1$  (E) $\Delta Sod1$  (F) $\Delta Prx1$  (G) $\Delta Trx1$ . Values are expressed as mean $\pm$ SEM of four independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. \*p<0.05 compared to control.



**Figure 7. Effect of EtHg on growth of mutant strains.** Cells were treated with EtHg in liquid medium for 24h at 30°C under shaking. Cell density was determined by measuring the absorbance in spectrophotometer at 600 nm. (A)ΔYap1 (B)ΔGsh1 (C)ΔGpx1 (D)ΔCtt1 (E)ΔSod1 (F)ΔPrx1 (G)ΔTrx1. Values are expressed as mean±SEM of four independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. \*p<0.05 compared to control.

Table 1- *S. cerevisiae* strains

Strain	Description
WT BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>
$\Delta Ctt1$	<i>MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YGR088w::kanMx4</i> Cytosolic catalase T; has a role in protection from oxidative damage by hydrogen peroxide 1
$\Delta Gsh1$	<i>MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YJL101c::kanMx4</i> $\gamma$ - glutamylcysteine synthetase; catalyzes the first step in glutathione (GSH) biosynthesis; expression induced by oxidants, cadmium, and mercury; protein abundance increases in response to DNA replication stress 2
$\Delta Gpx1$	<i>MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YKL026c::kanMx4</i> Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase; induced by glucose starvation that protects cells from phospholipid hydroperoxides and nonphospholipid peroxides during oxidative stress 3
$\Delta Prx1$	<i>MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YBL064c::kanMx4</i> Mitochondrial peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity; induced during respiratory growth and oxidative stress; phosphorylated; protein abundance increases in response to DNA replication stress 4
$\Delta Sod1$	<i>MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YJR104c::kanMx4</i> Cytosolic copper-zinc superoxide dismutase; detoxifies superoxide; abundance increases under DNA replication stress and during exposure to boric acid;
$\Delta Trx1$	<i>MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YLR043c::kanMx4</i> Cytoplasmic thioredoxin isoenzyme; part of thioredoxin system which protects cells against oxidative and reductive stress; abundance increases iunder DNA replication stress;6
$\Delta Yap1$	<i>MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YML007w::kanMx4</i> Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor; required for oxidative stress tolerance; Yap1p is degraded in the nucleus after the oxidative stress has passed; relative distribution to the nucleus increases upon DNA replication stress;

Table 2 – IC<sub>50</sub> values for MeHg and EtHg on cell growth in WT and mutant strains.

	IC <sub>50</sub> MeHg (μM)	IC <sub>50</sub> EtHg (μM)
WT	2.57 ± 0.01	0.61 ± 0.02
$\Delta Yap1$	1.41 ± 0.03	0.24 ± 0.11
$\Delta Gsh1$	1.04 ± 0.02	0.67 ± 0.03
$\Delta Gpx1$	2.02 ± 0.02	0.53 ± 0.01
$\Delta Ctt1$	1.27 ± 0.03	0.65 ± 0.02
$\Delta Sod1$	1.46 ± 0.02	0.05 ± 2.32
$\Delta Prx1$	1.34 ± 0.05	0.67 ± 0.04
$\Delta Trx1$	2.00 ± 0.02	0.31 ± 0.06



## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os dados encontrados neste trabalho, podemos concluir que:

- Os compostos MeHg e EtHg foram tóxicos para as células de *S. cerevisiae*;
- EtHg apresentou maior toxicidade às células de levedura;
- Cepas com deleção de genes antioxidantes apresentaram maior sensibilidade aos compostos;
- Sistemas antioxidantes como tiorredoxina, peroxirredoxina, superóxido dismutase, catalase e glutathione são essenciais para a defesa celular contra a toxicidade de organometais.

## **6. PERSPECTIVAS**

Tendo em vista os resultados obtidos nesse trabalho, temos como perspectivas:

- Investigar os mecanismos de transporte do MeHg e EtHg para o interior da célula;
- Investigar parâmetros de apoptose nas células expostas aos compostos;
- Verificar o papel de outras enzimas do sistema de defesa antioxidante frente à toxicidade induzida por ambos compostos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMANN, K.; DÜRR, M.; WESTERMANN, B. ***Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology**: general considerations and basic procedures. *Methods Mol Biol.* 372:81-90, 2007.
- ASCHNER M.; CLARKSON T. W.; **Uptake of methylmercury in the rat brain**: effects of amino acids. *Brain Res.* 462:31–39, 1988.
- ASCHNER, M.; ONISHCHENKO, N.; CECCATELLI S. **Toxicology of alkyl mercury compounds**. *Met Ions Life Sci.* 7:403-34, 2010.
- ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. **Methylmercury**: recent advances in the understanding of its neurotoxicity. *Ther Drug Monit.* 27(3):278-83, 2005.
- ATCHISON, W. D.; HARE, M. F. **Mechanisms of methylmercury** – induced neurotoxicity. *FASEB J.* 8:622-629, 1994.
- BAKIR, F. et al. **Methylmercury poisoning in Iraq**. *Science.* 181:230-241, 1973.
- BIGHAM, M.; COPEL, R. **Thiomersal in vaccines**: balancing the risk of adverse effects with the risk of vaccine-preventable disease. *Drug Saf.* 28(2):89–101, 2005.
- BURBACHER, T. M. et al. **Comparison of blood and brain mercury levels in infant monkeys exposed to methylmercury or vaccines containing thimerosal**. *Environ Health Perspect.* 113:1015–21, 2005.
- CASTOLDI, A. F. et al. **Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury**. *Brain Res. Bull.* 55:197-203, 2001.
- CHOI, A. L. et al. **Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in Faroese whaling men**. *Environ Health Perspect.* 117:367–372, 2009.
- CLARKSON T. W.; MAGOS L. **The toxicology of mercury and its chemical compounds**. *Crit Rev Toxicol.* 36(8):609-62, 2006.
- CLARKSON, T. W. **The three modern faces of mercury**. *Environ Health Perspect.* 110(Suppl 1):11–23, 2002.
- CLARKSON, T. W.; MAGOS L.; MYERS G. J. **The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations**. *N Engl J Med.* 349(18):1731–1737, 2003.
- CLARKSON, T. W.; VYAS, J. B.; BALLATORI, N. **Mechanisms of mercury disposition in the body**. *Am J Ind Med.* 50(10):757-64, 2007.
- COSTA, L. G. et al. **Developmental neuropathology of environmental agents**. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44:87–110, 2004.

CULOTTA, V. C.; YANG M.; O'HALLORAN T. V. **Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal.** *Biochim Biophys Acta.* 1763:747–758. 2006.

DALLA CORTE C. L. et al. **The combination of organoselenium compounds and guanosine prevents glutamate-induced oxidative stress in different regions of rat brains.** *Brain Res.* 1430:101-11, 2012.

DAVIES K. J. **Oxidative stress: the paradox of aerobic life.** *Biochem Soc Symp.* 61:1-31, 1995.

DÓREA, J. G. **Integrating experimental (*in vitro* and *in vivo*) neurotoxicity studies of low-dose thimerosal relevant to vaccines.** *Neurochem Res.* 36(6):927-38, 2011.

DÓREA, J. G.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. **Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury.** *J Appl Toxicol.* 33(8):700-11, 2013.

DÓREA, J. G.; MARQUES, R. C.; ISEJIMA, C. **Neurodevelopment of Amazonian infants: antenatal and postnatal exposure to methyl- and ethylmercury.** *J Biomed Biotechnol.* 2012:132876, 2012.

DROSE, S.; BRANDT, U. **Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain.** *Adv Exp Med Biol.* 748:145-169, 2012.

FARINA M.; ROCHA J. B.; ASCHNER M. **Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies.** *Life Sci.* 89(15-16):555-63, 2011.

FARINA, M. et al. **Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells.** *Toxicol. Sci.* 112:416–426. 2009.

FARINA, M; ASCHNER, M; ROCHA, J. B. T. **Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 256(3):405–417. 2011a.

FRANCO J. L. **Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase.** *Free Radic Biol Med.* 47:449–457, 2009.

GALLAGHER C. M.; GOODMAN, M. S. **Hepatitis B vaccination of male neonates and autism diagnosis.** *J Toxicol Environ Health A.* 73(24):1665–77, 2010.

GEIER, D. A. et al. **A two-phase study evaluating the relationship between Thimerosal-containing vaccine administration and the risk for an autism spectrum disorder in the United States.** *Transl Neurodegener.* 2(1):25, 2013.

GEIER, D. A. et al. **Thimerosal: clinical, epidemiologic and biochemical studies.** *Clin Chim Acta.* 444:212-20, 2015.

GEIER, D. A.; KING, P. G.; GEIER, M. R. **Mitochondrial dysfunction, impaired oxidative reduction activity, degeneration, and death in human neuronal and fetal cells induced by low-level exposure to thimerosal and other metal compounds.** *Toxicol Environ Chem.* 91(3–):735–49, 2009.

GEIER, D. A.; SYKES, L. K.; GEIER, M. R. **A review of Thimerosal (Merthiolate) and its ethylmercury breakdown product:** specific historical considerations regarding safety and effectiveness. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 10(8):575–96, 2007.

GLASER, V. et al. **Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury.** *NeuroToxicol.* 31:454–460, 2010.

GOFFEAU, A. et al. **Life with 6000 genes.** *Science* 274: 546-567, 1996.

GOLDWATER, L. **Mercury: A history of quicksilver.** York Press, Baltimore, MD, 1972.

GRAFF, R. D. et al. **Altered sensitivity of posttranslationally modified microtubules to methylmercury in differentiating embryonal carcinoma –derived neurons.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 144:215-224, 1997.

GRALLA, E.B, et al. **ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene.** *Proc Natl Acad Sci USA.* Oct.1;88(19):8558-62, 1991.

GRANDJEAN, P.; HERZ, K. T. **Methylmercury and brain development:** imprecision and underestimation of developmental neurotoxicity in humans. *Mount Sinai J Med.* 78:107–118, 2011.

GRANT, C. M.; MACIVER F. H., DAWES I. W., **Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Curr Genet.* 29:511–515, 1996.

HALLIWELL B.; WHITEMAN M. **Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture:** how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142(2):231-55, 2004.

HALLIWELL, B. **Biochemistry of oxidative stress.** *Biochem Soc Trans.* 35(Pt 5):1147-50, 2007.

HINTELMANN, H. **Organomercurials:** Their formation and pathways in the environment. *Met Ions Life Sci.* 7:365–401, 2010.

INOUE Y, et al. **Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem.* Sep 17;274(38):27002-9, 1999.

JOHANSSON, C. et al. **Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development.** *Neurotox Res.* 11:241 –260, 2007.

KAUR, P.; ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. **Glutathione modulation influences methylmercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes.** *NeuroToxicol.* 27:492–500, 2006.

KERN, J. K. et al. **Thimerosal exposure and the role of sulfation chemistry and thiol availability in autism.** *Int J Environ Res Public Health.* 10(8):3771–800, 2013.

KERN, J. K. et al. **Toxicity biomarkers among US children compared to a similar cohort in France: a blinded study measuring urinary porphyrins.** *Toxicol Environ Chem.* 93(1–2):396–405, 2011.

KERSHAW, T. G.; CLARKSON T. W.; DHAHIR, P. H. **The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man.** *Arch Environ Health.* 35(1):28–36, 1980.

KISTLER M, MAIER K, ECKARDT-SCHUPP F. **Genetic and biochemical analysis of glutathione-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mutagenesis.* Jan;5(1):39–44, 1990.

LU, J.; HOLMGREN, A. **The thioredoxin antioxidant system.** *Free Radic Biol Med.* 66:75–87, 2014.

MARQUES, R. C. et al. **Perinatal multiple exposure to neurotoxic (lead, methylmercury, ethylmercury, and aluminum) substances and neurodevelopment at six and 24 months of age.** *Environ Pollut.* 187:130–5, 2014.

MCCURRY, J. **Japan remembers Minamata.** *Lancet;* 367: 99–100. 2006

MCGOVERN, P. E. et al. **The beginnings of winemaking and viniculture in the ancient near east and egypt.** *Expedition.* 39:3–21, 1997.

MIGDAL, C. et al. **Sensitization effect of thimerosal is mediated *in vitro* via reactive oxygen species and calcium signaling.** *Toxicology.* 274:1–9, 2010.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Diagnóstico preliminar sobre o mercúrio no Brasil, perfil do gerenciamento de mercúrio no Brasil, incluindo seus resíduos.** Brasília: MMA, 2011.

MORETTO M. B. et al. **Ebselen protects glutamate uptake inhibition caused by methyl mercury but does not by Hg<sup>2+</sup>.** *Toxicology.* 214(1–2):57–66, 2005.

MORTIMER R.K, et al. **Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*.** Edition 10. *Yeast.* Sep–Oct;5(5):321–403, 1989.

MORTIMER, R. K.; JOHNSTON J. R. **Genealogy of principal strains of the Yeast Genetics Stock Center.** *Genetics.* 113:35–43, 1986.

MULLER, E.G. **Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle.** *J Biol Chem.* May 15;266(14):9194–202, 1991.

NIELSEN, J. B.; ANDERSEN, O. **The toxicokinetics of mercury in mice offspring after maternal exposure to methylmercury — effect of selenomethionine.** *Toxicology.* 74, 233–241, 1992.

NORDBERG J.; ARNER E. S. **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.** *Free Radic Biol Med.* 31:1287–312, 2001.

PEDRAJAS, J. R. et al. **Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity.** J Biol Chem. 275:16296–16301, 2000.

PLOGER, R. et al. **XREFdb: cross-referencing the genetics and genes of mammals and model organisms.** Nucleic Acids Res. 28(1):120-2, 2000.

PORCIÚNCULA, L. O. et al. **Methylmercury inhibits glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain.** Neuroreport. 14(4):577-80, 2003.

POULAIN, A. J; BARKAY, T. **Cracking the Mercury Methylation Code.** Science. 339(6125):1280-1, 2013.

REDDY R. D.; YAO J.K. **Free radical pathology in schizophrenia: a review.** Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 55:33–43, 1996.

RHEE, S. G.; Woo, H. A. **Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and protein chaperones.** Antioxid Redox Signal. 15:781–794, 2011.

RODRIGUES, J. et al. **Toxicological effects of thiomersal and ethylmercury: Inhibition on thioredoxin system and NADP<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases of the pentose phosphate pathway.** Toxicol Appl Pharmacol. 286(3):216-23, 2015.

SEEGAL R. F.; DREIEM A. **Methylmercury –induced changes in mitochondrial function in striatal synaptosomes are calcium-dependent and ROS –dependent.** NeuroToxicol. 28:720-726, 2007.

SERAFIAN, T. A. **Methyl mercury increases intracellular Ca<sup>2+</sup> and inositol phosphate levels in cultured cerebellar granule neurons.** J Neurochem. 61:648-657, 1993.

SHARPE, M. A.; GIST, T. L.; BASKIN, D. S. **B-lymphocytes from a population of children with autism spectrum disorder and their unaffected siblings exhibit hypersensitivity to thimerosal.** J Toxicol. 2013:801517, 2013.

SHERMAN, F. **An introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, R. A. Meyers, VCH Pub., Weinheim, Germany, 6:302-325, 1997.

SHERMAN, F. **Getting started with yeast.** Methods Enzymol. 350:3-41, 2002.

TRACZYK A., et al. **Catalase T deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** Acta Microbiol Pol. 34(3-4):231-41, 1985.

WARNER, R. H. **Superoxide dismutase, aging and degenerative disease.** Free Radic Biol Med. 17(3):249-258, 1994.

WOOD Z. A. et al. **Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins.** Trends Biochem Sci. 28:32–40, 2003.

WU J. Q. et al. **Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 46:200–206, 2013.

YANG K. S. et al. **Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid.** *J Biol Chem.* 277:38029–38036, 2002.

YOUNG H. A.; GEIER D. A.; GEIER M. R. **Thimerosal exposure in infants and neurodevelopmental disorders:** an assessment of computerized medical records in the Vaccine Safety Datalink. *J Neurol Sci.* 271(1–2):110–8, 2008.