



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

MARCOS VINICIUS DOS SANTOS SALES

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO E DERIVADOS SOBRE A
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO NO
DESENVOLVIMENTO DA HIPERTENSÃO

Maceió – AL

2023

MARCOS VINICIU DOS SANTOS SALES

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO E DERIVADOS SOBRE A
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO NO
DESENVOLVIMENTO DA HIPERTENSÃO

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Química
e Biotecnologia (PPGQB) da
Universidade Federal de Alagoas
(UFAL) como requisito para obtenção do
título de mestre em Ciências.

Maceió – AL

2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S163e Sales, Marcos Vinicius dos Santos.

Efeitos da exposição ao mercúrio e derivados sobre a bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo no desenvolvimento da hipertensão / Marcos Vinicius dos Santos Sales. – 2023.

81 f. : il color.

Orientadora: Ana Catarina Rezende Leite.

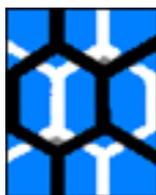
Co-orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.

Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 66-81.

1. Hipertensão. 2. Mercúrio. 3. Mitocôndrias. 4. Estresse oxidativo.
I. Título.

CDU: 661.849:616.12-008.331.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins

57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144

Email: ppgqb.@iqb.ufal.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação do mestrando **MARCOS VINÍCIUS DOS SANTOS SALES** intitulada: “**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO E DERIVADOS SOB A BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO NA HIPERTENSÃO**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 19 de julho de 2023, às 8:30, Na sala de aula da Pós-Graduação do IQB.

Maceió, 19 de julho de 2023.

Comissão Examinadora:

Dra. ALICE VALENÇA ARAÚJO, UFPE
Examinador(a) Externo(a) ao Programa



Documento assinado digitalmente

ALICE VALENÇA ARAUJO
Data: 19/07/2023 15:28:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. MARÍLIA OLIVEIRA FONSECA GOULART, UFAL
Examinador(a) Interno(a)



Documento assinado digitalmente

MARILIA OLIVEIRA FONSECA GOULART
Data: 20/07/2023 01:18:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. JOSUÉ CARINHANHA CALDAS SANTOS, UFAL
Coorientador



Documento assinado digitalmente

JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS
Data: 20/07/2023 12:49:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. ANA CATARINA REZENDE LEITE, UFAL
Presidente



Documento assinado digitalmente

ANA CATARINA REZENDE LEITE
Data: 20/07/2023 14:26:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer a minha família que apesar de não entenderem o que eu faço, sei que posso contar com eles pra tudo que eu precisar; sempre estiveram comigo apesar de tudo. **Minha mãe Rosângela** que sempre pedia pra eu voltar para casa para relaxar, perguntava como eu estava e inventava alguma festa só pra tentar me tirar do quarto; ao **meu pai Sivaldo** que apesar de bruto sempre se preocupou com o filho perguntando a minha mãe sempre como eu estava, se eu precisava de algo. Eu amo vocês, tenho orgulho de ser filho de vocês e pode ter certeza que farei meu máximo para retribuir e dar uma vida melhor para os dois!!!!

Segundamente a minha mãe científica, a que eu devo todo meu conhecimento e currículo, **Ana Catarina**, minha orientadora que eu amo tanto. Eu não sei mensurar o quanto sou grato pelo que a senhora fez por mim, por tanto tempo investido no seu aluno e eu bato no peito pra dizer que tenho orgulho de ter sido seu aluno, conhecer a senhora foi o melhor acontecimento da minha graduação, poder aprender com a melhor, a senhora me abriu tantas portas que hoje temos trabalhos, prêmios, reportagens e até capítulo de livro juntos... muito MUITO obrigado mesmo por tudo!!!! Levarei todos os seus ensinamentos pra vida, todas as broncas também até porque foram com elas que eu mais aprendi e eu sei que cada puxão de orelha foi pensando no meu melhor, como a senhora mesmo fala: “e você sabe disso” ... kkkk.

Obrigado também ao meu coorientador, **Josué Carinhanha**, não tivemos muito contato durante minha formação, mas o senhor sempre esteve presente nas minhas produções me ajudando com escrita, organização, fala e tudo; sempre tive o senhor como uma inspiração, um exemplo de profissional que eu quero ser, obrigado por tudo. Agradecer também a outros professores que me ajudaram e tiveram papéis importantes na minha formação: **Ueslen, Cintya e Isis**.

Por fim, quero agradecer meus amigos que sempre estiveram presentes durante essa minha trajetória desde a graduação como Victória e Victor, porque em todos os momentos bons e ruins ambos estavam presentes, principalmente Victória (essa me aguenta desde 2016) kk. Outra amiga que a amizade fortaleceu muuuito no laboratório, Maiara, a minha pirquinel maravilhosa obrigado por tudo, por rir juntos, chorar juntos, experimentos juntos, reclamar juntos, eu não o que seria de mim sem você. Aos que chegaram na reta final, mas que também esteve em vários momentos importantes e que eu fico extremamente feliz por ter vocês na minha vida, são amigos que vou levar pra vida, Leonardo, Sheila, Daniel e Victor Hugo.

RESUMO

A hipertensão é uma doença sistêmica que afeta grande parte da população mundial e seu desenvolvimento não tem um único fator relacionado a origem. Fatores ambientais como exposição a espécies de mercúrio podem ser um dos motivos que desencadeiam essa condição. Neste contexto, estudos apontam que a mitocôndria tem função central no desenvolvimento da hipertensão devido ao estresse oxidativo, o qual pode ser potencializado na presença do mercúrio. O timerosal (TM) é uma espécie orgânica de mercúrio presente em vacinas e formulações dermatológicas como conservante, que em meio aquoso pode liberar o etilmercúrio. Assim, devido à ausência de estudos que abordem os efeitos da contaminação por mercúrio na bioenergética mitocondrial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), decidimos então avaliar quais parâmetros poderiam variar expondo ratos SHR ao TM com ênfase na bioenergética mitocondrial de dois órgãos: fígado e cérebro. Os animais foram distribuídos em dois grupos; ambos foram tratados por 24 h com solução de TM na água ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$) ou solução aquosa salina (controle). A cadeia transportadora de elétrons (CTE) das mitocôndrias isoladas do fígado e do cérebro foram avaliadas usando um eletrodo de oxigênio. A integridade mitocondrial do fígado e cérebro foram analisadas por inchamento e potencial de membrana. O estresse oxidativo e nitrosativo mitocondrial foram analisados utilizando as sondas DCF (EROs não seletivo), amplex-red (H_2O_2) e DAF-FM ($\cdot\text{NO}$). Além disto, foram quantificados também marcadores de estresse oxidativo como atividade de enzimas antioxidantes (SOD e CAT), conteúdo total grupos sulfidrilas (SH), malonaldeído (MDA), razão GSH/GSSG e teor de proteínas carboniladas (LPO). O projeto foi aprovado pelo CEUA/UFAL (23/2021). Os experimentos de respiração mitocondrial mostraram que usando o complexo I como substrato, o controle respiratório (CR) do grupo exposto ao TM apresentou uma diminuição de 40% para o fígado e 23% para o cérebro. No entanto, quando comparado ao grupo controle, nos estados de repouso e desacoplado para o fígado, houve desempenho superior do grupo controle em relação ao grupo tratado (65 e 48%, respectivamente). Por outro lado, para o cérebro, esses resultados não demonstraram diferença significativa. Ao avaliar a integridade mitocondrial, potencial de membrana e inchamento, no fígado não encontramos diferenças entre os grupos. Na mesma linha, no fígado a geração de ROS totais e de $\cdot\text{NO}$ mitocondrial não apresentaram diferença estatística entre os grupos. A atividade da SOD no fígado demonstrou uma diminuição de 59% comparada ao grupo exposto com o grupo controle; por outro lado os demais marcadores não apresentaram diferença entre os grupos. No cérebro, não foram encontradas diferenças significativas na integridade mitocondrial (potencial de membrana e inchamento) entre os grupos, bem como também entre a geração mitocondrial de EROs e de $\cdot\text{NO}$. Por outro lado, ainda no cérebro, a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT apresentaram um aumento de 100 e 83% para o grupo tratado, respectivamente, entretanto para outros marcadores de estresse como SH e MDA houve diminuição de 46 e 41%, respectivamente (tratados vs. controle). De forma geral, nossos achados sugerem que a exposição aguda ao TM contribui negativamente para os danos no estado redox e funcionalidade da mitocôndria sendo responsável pelo desacoplamento da CTE, o que pode ser uma das causas para a disfunção mitocondrial que venha a desencadear a hipertensão.

ABSTRACT

Hypertension is a systemic disease that affects a large part of the world's population and its development does not have a single factor related to its origin. Environmental factors such as exposure to mercury species may be one of the reasons that trigger this condition. In this context, studies indicate that mitochondria play a central role in the development of hypertension due to oxidative stress, which can be enhanced in the presence of mercury. Thimerosal (TM) is an organic mercury species present in vaccines and dermatological formulations as a preservative, which in an aqueous medium can release ethylmercury. Thus, due to the lack of studies addressing the effects of mercury contamination on the mitochondrial bioenergetics of spontaneously hypertensive rats (SHR), we decided to evaluate which parameters could be varied by exposing SHR rats to TM with emphasis on the mitochondrial bioenergetics of two organs: liver and brain. The animals were divided into two groups; both were treated for 24 h with TM solution (0.5 mg kg^{-1}) or aqueous saline solution (control). The electron transport chain (ETC) of isolated liver and brain mitochondria were evaluated using an oxygen electrode. Liver and brain mitochondrial integrity were analyzed by swelling and membrane potential. Mitochondrial oxidative and nitrosative stress were analyzed using DCF (non-selective ROS), amplex-red (H_2O_2) and DAF-FM ($\bullet\text{NO}$) probes. In addition, oxidative stress markers such as antioxidant enzyme activity (SOD and CAT), total content of sulfhydryl groups (SH), malondialdehyde (MDA), GSH/GSSG ratio and carbonyl protein content (LPO) were also quantified. The project was approved by CEUA/UFAL (23/2021). Mitochondrial respiration experiments showed that using complex I as a substrate, the respiratory control (CR) of the group exposed to TM showed a decrease of 40% for the liver and 23% for the brain. However, when compared to the control group, in the resting and uncoupled states for the liver, there was a superior performance of the control group in relation to the treated group (65 and 48%, respectively). On the other hand, for the brain, these results showed no significant difference. When evaluating mitochondrial integrity, membrane potential and liver swelling, we found no differences between groups. In the same vein, in the liver, the generation of total ROS and mitochondrial $\bullet\text{NO}$ showed no statistical difference between groups. Liver SOD activity showed a 59% decrease compared to the exposed group compared to the control group; on the other hand, the other markers showed no difference between the groups. In the brain, no significant differences were found in mitochondrial integrity (membrane potential and swelling) between groups, as well as between mitochondrial generation of ROS and $\bullet\text{NO}$. On the other hand, still in the brain, the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT showed an increase of 100 and 83% for the treated group, respectively, however for other stress markers such as SH and MDA there was a decrease of 46 and 41%, respectively. (treated vs. control). Overall, our findings suggest that acute exposure to TM negatively contributes to damage to the redox status and functionality of the mitochondria, being responsible for the ETC uncoupling, which may be one of the causes for the mitochondrial dysfunction that triggers hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural do NADH e FADH ₂	16
Figura 2. Representação da cadeia transportadora de elétrons e ATP sintase.....	17
Figura 3. Transporte de elétrons pelo complexo I.....	18
Figura 4. Transporte de elétrons pelo complexo II, III e IV.....	19
Figura 5. Rotação da ATP sintase.	21
Figura 6. Sistema antioxidante mitocondrial. Sendo malato (Mal), succinato (Succ), glutatona redutase (GR) e tioredoxina redutase (TR).....	25
Figura 7. Esquema que resume as proteínas envolvidas na abertura do TPM.	28
Figura 8. Gráfico representativo para o experimento de CTE. O V ₂ representado como a adição de succinato, o V ₃ com a adição do ADP+Pi, o V ₄ com a adição de venturicidina ou oligomicina e a V _{CCCP} com a adição do dinitrofenol (DNP).	29
Figura 9. Ciclo do mercúrio em ambientes naturais.....	31
Figura 10. Dissociação do timerosal em meio aquoso.....	32
Figura 11. Quantificação de mercúrio total nos órgãos dos animais SHR após uma exposição aguda ao TM (<i>n</i> = 6).....	49
Figura 12. Respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de animais SHR expostos ao TM. A) Figura representativa do consumo de oxigênio pelas MFR. B-E) Velocidades de consumo de oxigênio nos estados respiratórios. MFR 0,5 mg L ⁻¹ (5 mM substrato para complexo I, 200 μM EGTA, 200 μM ADP, 1 μg mL ⁻¹ , 1 μM CCCP). Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística utilizando Teste t para amostras não pareadas, dados representados como média ± erro.....	52
Figura 13. Respiração de mitocôndrias isoladas de cérebro de animais SHR expostos ao TM. A) Figura representativa do consumo de oxigênio pelas MCR. B-E) Velocidades de consumo de oxigênio nos estados respiratórios. MCR 0,5 mg L ⁻¹ (5 mM substrato para complexo I, 200 μM EGTA, 200 μM ADP, 1 μg mL ⁻¹ , 1 μM CCCP). Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística utilizando Teste t para amostras não pareadas, dados representados como média ± erro.....	54
Figura 14. Marcadores de integridade mitocondrial em animais SHR expostos ao TM. A) Potencial de membrana monitorado pela fluorescência da Safranina O para MFR. B) Inibidores do poro no potencial de membrana de MFR. C) Inchamento mitocondrial para MFR. D) Potencial de membrana monitorado pela fluorescência da Safranina O para MCR. E) Inchamento mitocondrial para MCR. Foi utilizado MCR 0,5 mg L ⁻¹ , 5 mM substrato para o complexo I, 5 μM de Safranina O, 1 μM de CsA, 200 μM de EGTA. Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata.....	56

Figura 15. Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em mitocôndrias isoladas de fígado de animais SHR expostos ao TM. **A)** Traçado representativo da produção de EROs totais por DCF. **B)** Quantificação de EROs totais em MFR. **C)** Traçado representativo da produção de H₂O₂ por Amplex Red. **D)** Quantificação de H₂O₂ em MFR. **E)** Traçado representativo da produção de *NO por DAF. **F)** Quantificação de *NO em MFR. Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística utilizando Teste t para amostras não pareadas, dados representados como média ± erro..... 58

Figura 16. Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em mitocôndrias isoladas de cérebro de animais SHR expostos ao TM. **A)** Traçado representativo da produção de EROs totais por DCF. **B)** Quantificação de EROs totais em MCR. **C)** Traçado representativo da produção de H₂O₂ por Amplex Red. **D)** Quantificação de H₂O₂ em MCR. **E)** Traçado representativo da produção de *NO por DAF. **F)** Quantificação de *NO em MCR. Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística utilizando Teste t para amostras não pareadas, dados representados como média ± erro..... 60

Figura 17. Atividade de enzimas de animais SHR expostos ao TM. **A)** Atividade da SOD no fígado (SHR: 156,60 ± 28,71; TM-SHR: 64,75 ± 4,35). **B)** Atividade da CAT no fígado (SHR: 1,806 ± 0,073; TM-SHR: 1,468 ± 0,179). **C)** Atividade da GPx no fígado (SHR: 253,1 ± 24,4; TM-SHR: 382,8 ± 37,9). **D)** Atividade da SOD no cérebro (SHR: 69,01 ± 6,58; TM-SHR: 145,20 ± 4,89). **E)** Atividade da CAT no cérebro (SHR: 0,024 ± 0,001; TM-SHR: 0,043 ± 0,002) **F)** Atividade da GPx no cérebro (SHR: 8,33 ± 2,46; TM-SHR: 19,85 ± 4,05). **G)** Atividade da AChE no cérebro (SHR: 0,059 ± 0,009; TM-SHR: 0,063 ± 0,012). Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística utilizando Teste t para amostras não pareadas, dados representados como média ± erro..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades e reatividade das EROs em geral (adaptado de Mittler et al., 2016).....	23
Tabela 2. Programa de aquecimento para digestão em sistema fechado de amostras biológicas por radiação de micro-ondas.....	47
Tabela 3. Condições de operação do CV AFS para determinação de Hg total.....	48
Tabela 4. Quantificação em $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína dos marcadores secundários nos tecidos de animais SHR expostos a TM de forma aguda.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•UQH	Radical Semiubiquinona
ADP	Adenosina DiFosfato
ANG II	Angiotensina II
ANT	Translocador de Nucleotídeos de Adenina
APX	Ascorbato Peroxidase
ATP	Adenosina TriFosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BH4	Tetrahydropterina
CAT	Catalase
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil hidrazona
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CR	Controle Respiratório
CsA	Ciclosporina A
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
DNPH	2,4-difenilhidrazona
DTNB	5,5'-ácido ditio-bis-2-nitrobenzóico
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EGTA	Ácido Etilenoglicoltetracético
EO	Estresse oxidativo
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo Oxidada
FADH ₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo Reduzida
Fe-S	Centros de Ferro e Enxofre
FMN	Flavina Mononucleotídeo Oxidada
FMNH ₂	Flavina Mononucleotídeo Reduzida
GPx	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Dissulfeto de Glutationa ou Glutationa Oxidada

Heme	Porfirinogênio coordenado a um Fe ²⁺
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IL-6	Interleucina 6
MDA	Malonaldeído
MCR	Mitocôndria de Cérebro de Rato
MFR	Mitocôndria de Fígado de Rato
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOX	NADPH Oxidase
NRF2	Fator Nuclear Eritroide 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
oxiLDL	Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada
PER	Peroxidase
P _i	Fosfato Inorgânico
PRX	Peroxiredoxina
RBOH	NADPH Oxidase
R-COOH	Lipídeos
R-SH	Resíduos de Cisteína
SH	Tióis Totais
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
SOD	Superóxido Dismutase
t _{1/2}	Tempo de Meia Vida
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TFAM	Fator de Transcrição Mitocondrial A
TM	Timerosal
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TPM	Transição de Permeabilidade Mitocondrial
TRx	Sistema da Tireodoxina
UQ	Ubiquinona
UQH ₂	Ubiquinol

V_2	Estado Basal
V_3	Velocidade de Fosforilação
V_4	Velocidade de Repouso
V_{cccp}	Velocidade de Desacoplamento
VDAC	Canal de Ânion Dependente de Voltagem
ε_λ	Coefficiente de absorvidade molar em um dado comprimento de onda

Sumário

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
Sumário.....	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Mitocôndria: estrutura e função.....	15
2.2 Transição de Permeabilidade Mitocondrial	26
2.3 Estudos da bioenergética mitocondrial.....	28
2.4 Mercúrio e suas espécies orgânicas.....	30
2.5 Hipertensão	33
2.6 Hipertensão × Mitocôndria	37
3. JUSTIFICATIVA.....	39
4 OBJETIVOS	40
4.1 Objetivos Específicos	40
5. MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 Animais.....	41
5.2 Isolamento de mitocôndrias	41
5.3 Respiração mitocondrial	41
5.4 Potencial de membrana.....	42
5.5 Inchamento mitocondrial	42
5.6 Produção de espécies reativas de oxigênio totais	42
5.7 Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	43
5.8 Produção de óxido nítrico	43
5.9 Preparação de tecido homogeneizado	43
5.10 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	43
5.11 Atividade da catalase (CAT).....	44
5.12 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx).....	44
5.13 Atividade da acetilcolinesterase (AChE).....	44
5.14 Conteúdo do grupo sulfidril (SH).....	45
5.15 Quantificação do estado redox (relação GSH/GSSG).....	45
5.16 Peroxidação lipídica (MDA)	45
5.17. Produtos da oxidação de proteínas (LPO)	46
5.18. Análise de mercúrio total nos tecidos.....	46

5.19. Análise estatística	48
6. RESULTADOS e DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	65
8. PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

Timerosal (TM) é um composto organomercúrico usado como conservante em dermocosméticos e vacinas desde 1930 (Humphrey et al., 2005). O teor de mercúrio corresponde a ~50% do TM em massa, sendo este elemento considerado um metal tóxico e bioacumulativo (Carneiro et al., 2014) causando vários problemas bem conhecidos nos sistemas biológicos, como, neurotoxicidade, danos nos rins (Bianchini et al., 2019; Choi et al., 2016), em proteínas do sangue (Sales et al., 2022), dentre outros. Sabemos que a contaminação por mercúrio tem correlação com diversas comorbidades, como diabetes, Alzheimer e doenças cardiovasculares como a hipertensão. Além do que, é capaz de sofrer reações de alquilação, na sua forma inorgânica, ou de desalquilação, na sua forma orgânica, assim, ocorrendo interconversão entre as espécies Hg^{2+} , $MeHg^+$ e $EtHg^+$ (Barregard et al., 2011), as quais apresentam níveis de toxicidade diferentes sendo a sua forma orgânica metilada a mais danosa por conseguir atravessar a barreira hematoencefálica, por exemplo (Lohren et al., 2016).

O Ministério da Saúde (2018) afirma que 24,7% da população que vive nas capitais brasileiras foram diagnosticadas com hipertensão e que a parte mais afetada da sociedade são indivíduos acima de 55 anos (Vigitel, 2018). Em vista desses dados e sabendo que até o presente momento o desenvolvimento dessa patologia não tem um único fator que seja considerado como "*gatilho*", variáveis ambientais podem desencadear tal condição, como, por exemplo, a exposição crônica a derivados de mercúrio, fator já comprovado em estudos com animais (Simões et al., 2019). Neste sentido, a mitocôndria é uma organela que está relacionada ao desenvolvimento de diversas patologias (Lahera et al., 2017). A mitocôndria é uma organela que desempenha diversas funções cruciais para a sobrevivência da maioria das células, sendo em última instância reguladora da morte celular, seja por necrose ou por apoptose. Contudo, é essa organela que em condições normais tem vulnerabilidade elevada a exposição de mercúrio e suas espécies (Nesci et al., 2016). Entretanto até o presente momento não existe nenhum estudo que tenha avaliado o efeito aditivo do mercúrio, e seus derivados, na hipertensão, tendo como parâmetro, estudos focando a bioenergética mitocondrial.

Dessa forma, temos como objetivos avaliar os efeitos danosos da exposição ao TM explorando diferentes parâmetros da bioenergética mitocondrial e de processos relacionados ao estresse oxidativo em animais espontaneamente hipertensos (SHR).

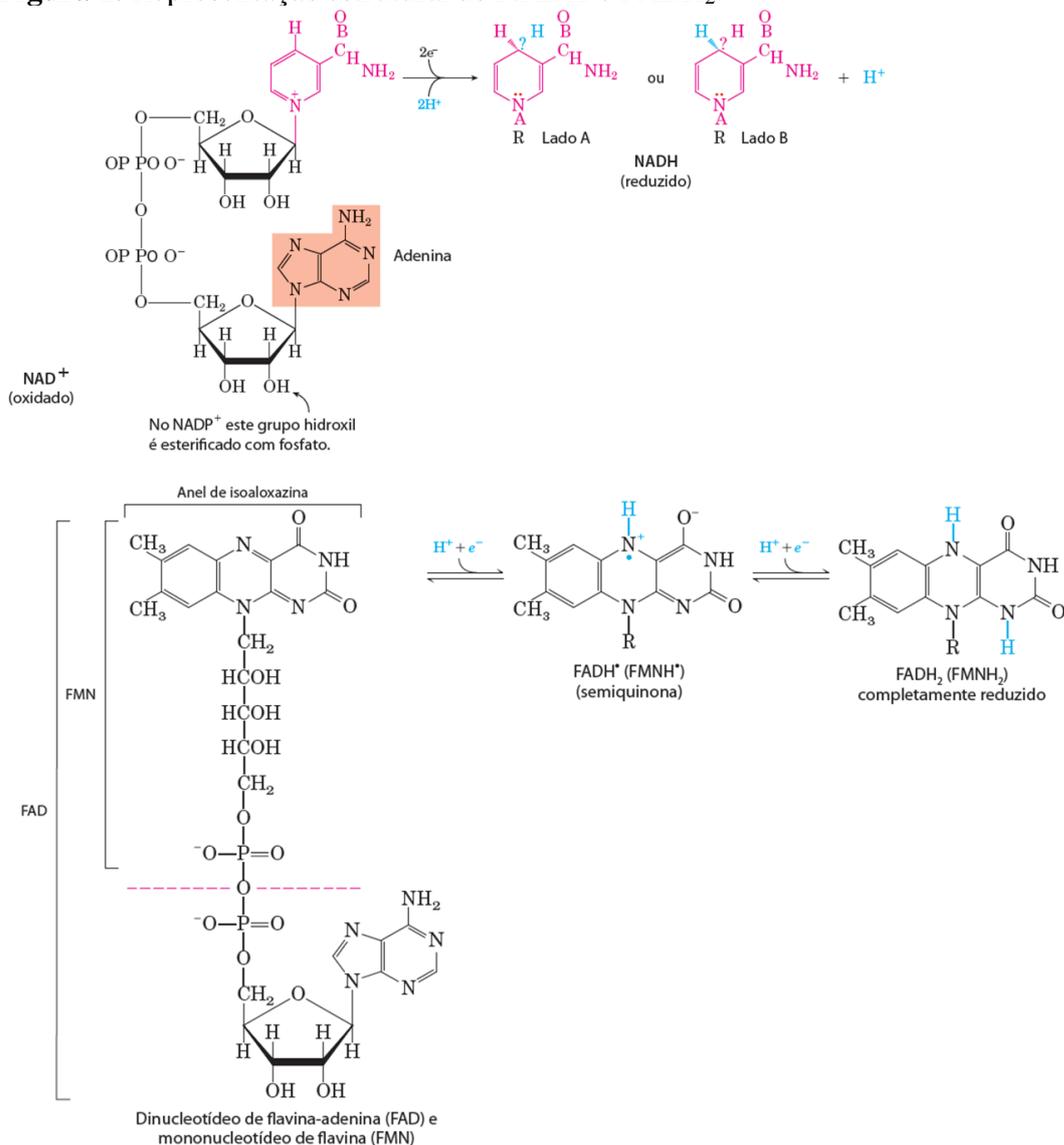
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mitocôndria: estrutura e função

A mitocôndria é uma organela presente na maioria das células animais e vegetais, essa organela é composta por duas membranas, uma externa e uma interna. A membrana externa é composta majoritariamente por lipídeos levando a uma maior permeabilidade e consequentemente a passagem das outras biomoléculas é facilitada. A membrana interna tem sua composição majoritária formada por proteínas e lipídeos como a cardiolipina, sendo assim, é menos permeável impedindo a passagem da maioria das biomoléculas que se deslocam de fora pra dentro da mitocôndria, dessa forma torna-se necessário o uso de alguns transportadores para realizar tal passagem (Nicholls & Ferguson, 2013). Esses transportadores são proteínas responsáveis pelo transporte ou troca de moléculas por membranas. As funções da mitocôndria são variadas, tendo papel em processos como o catabolismo das biomoléculas, com exceção dos carboidratos (citosol), morte celular e tem como sua função primordial a síntese de energia, neste caso, na forma de adenosina trifosfato (ATP).

De forma geral, o principal objetivo do catabolismo das biomoléculas é a síntese de Acetil-CoA para alimentar o ciclo de Krebs, o qual se caracteriza por um processo que ocorre por meio de nove reações enzimáticas. Essa cadeia de reações tem como objetivo principal produzir as coenzimas reduzidas: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH₂) (Metzler, 2003). As coenzimas, na maioria dos casos, são transportadoras de grupos funcionais específicos, sendo assim, o NADH e o FADH₂ são transportadoras de elétrons que se localizam como ligações com hidrogênio nas regiões demonstradas na **Figura 1**.

Figura 1. Representação estrutural do NADH e FADH₂.



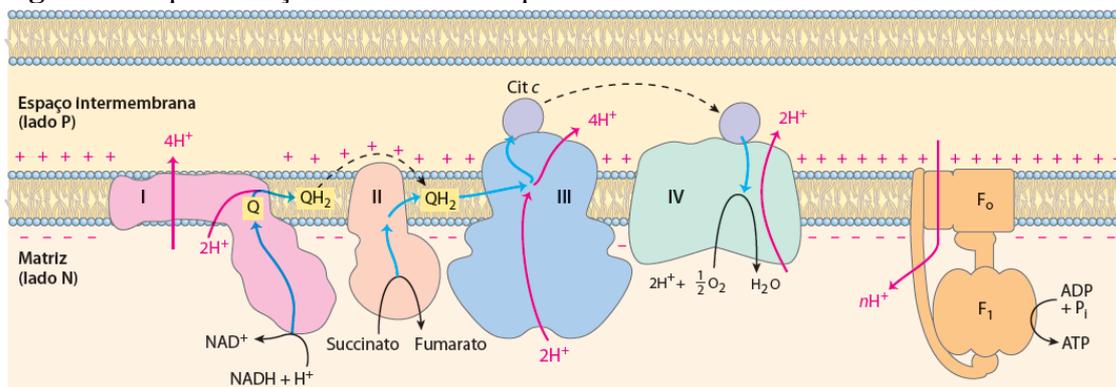
Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6^a edição, 2014.

Os elétrons transportados pelo NADH e FADH₂ são usados pela Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) para a redução do oxigênio molecular (O₂) em água (H₂O) e acoplada a esse processo temos a ATP sintase, a enzima que acelera a síntese do ATP (**Figura 2**). A CTE está localizada na membrana interna da mitocôndria e é formada por quatro complexos proteicos chamados de NADH desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), citocromo c oxidorreductase (complexo III) e citocromo oxidase (complexo IV), temos ainda auxiliando no transporte desses elétrons um lipídeo contendo uma porção fenólica, denominada de ubiquinona e um peptídeo conhecido como citocromo c (Nelson & Cox, 2014).

O funcionamento da CTE é descrito e explicado pela teoria quimiosmótica de Mitchell (Mitchell, 1979), na qual se explica como cada complexo reage em função dos

seus substratos, e que a partir dessas reações ocorre o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranar com a formação do potencial elétrico ($\Delta\Psi$) e químico (ΔpH) de membrana e como que esse potencial é convertido na força próton motriz usado pela mitocôndria para sintetizar ATP.

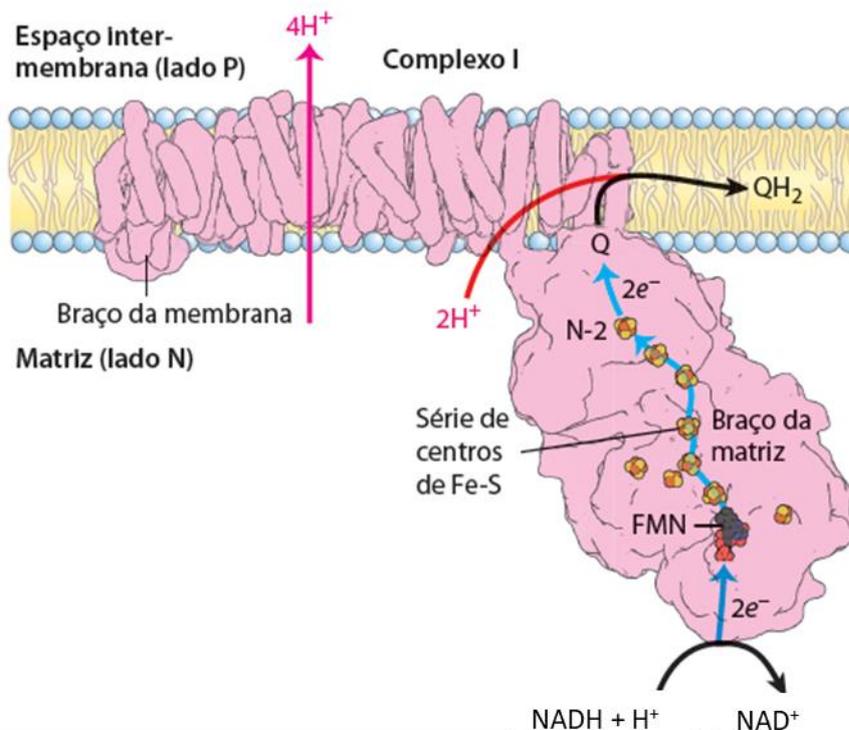
Figura 2. Representação da cadeia transportadora de elétrons e ATP sintase.



Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6ª edição, 2014.

O complexo I é o maior dentre os complexos da CTE, possuindo 44 subunidades e um massa de 980 kDa (**Figura 3**), em sua estrutura além de ter suas subunidades proteicas, tal complexo possui grupos prostéticos que auxiliam no transporte dos elétrons, como, por exemplo, os centros de ferro e enxofre (Fe-S) e a Flavina Mononucleotídeo (FMN). Durante sua atividade, o complexo I transfere dois elétrons do NADH, que pode advir principalmente do ciclo de Krebs, e os usa para reduzir o FMN para sua forma FMNH₂; a partir daí os elétrons são conduzidos pelos centros de Fe-S até a ubiquinona (UQ) oxidada, mas ao receber os elétrons é reduzida em ubiquinol (UQH₂). À medida que ocorre a passagem dos elétrons pelos centros até a chegada no sítio de ligação da UQ, concomitantemente ocorre a transferência de quatro prótons (H⁺) para o espaço intermembranar, ou seja, a região entre as membranas externa e interna da mitocôndria. Esses H⁺ são provenientes da dissociação da água que ocorre na matriz mitocondrial (Nicholls & Ferguson 2013). Vale ressaltar que o que dirige os elétrons no sentido exposto é a diferença de potencial de redução (E) existente entre todos os componentes que compõem a cadeia, em que se começa com um potencial negativo e é finalizado com um potencial positivo.

Figura 3. Transporte de elétrons pelo complexo I.



Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6ª edição, 2014.

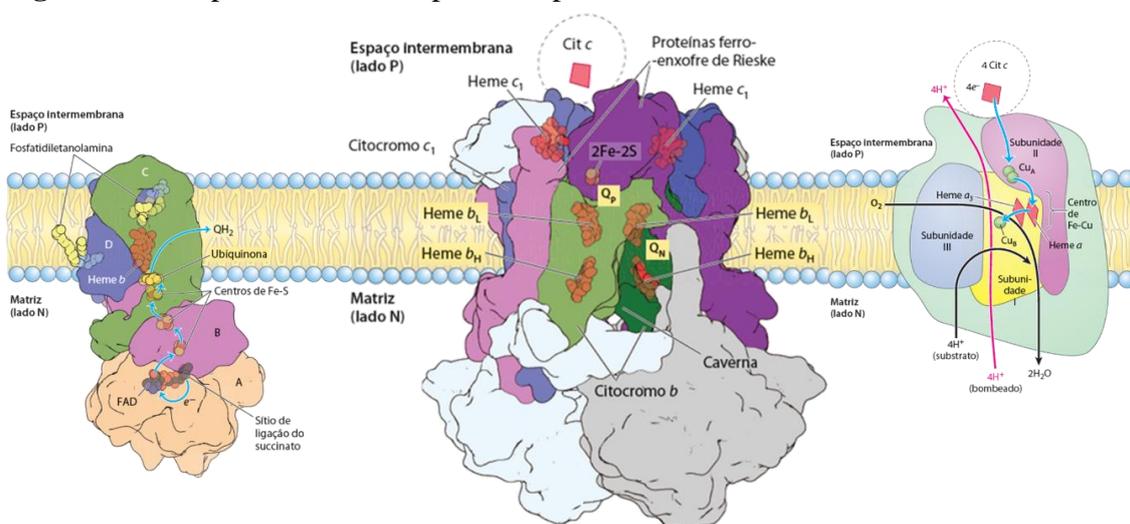
O complexo II é o menor de todos os complexos da CTE com apenas quatro subunidades e um massa molecular de 140 kDa (**Figura 4**). Esse complexo é o único compartilhado com o ciclo de Krebs e CTE. Apesar de ser uma proteína pequena, ela também possui alguns grupos prostéticos como os centros de Fe-S e uma flavina adenina dinucleotídeo oxidada (FAD), que são utilizadas com a mesma função do complexo I, ou seja, no transporte dos elétrons que nesse caso é decorrente do succinato – nessa reação o complexo capta os dois elétrons do succinato oxidando-o em fumarato e os direciona para a redução do FAD em FADH₂, então o FADH₂ transfere dois elétrons para os centros de Fe-S que transportam esses até a UQ que, por fim, é reduzida a UQH₂ (Nicholls & Ferguson 2013).

O UQH₂ se desloca pela membrana até o complexo III (11 subunidades, 250 kDa) (**Figura 4**), no qual existe um ciclo dedicado à ubiquinona que é chamado de ciclo Q, onde o UQH₂ se liga no sítio do complexo III, transfere um elétron para os seus grupos prostéticos (centro de Fe-S e porfirinogênio coordenado ao Fe²⁺, heme) que transportam o elétron até o citocromo c, um peptídeo que faz a comunicação entre o complexo III e o IV na transferência de elétrons. À medida que essa transferência ocorre, o UQH₂ doa um elétron ficando na sua forma radical semiquinona ([•]UQH) que se desloca para o final do complexo, em seguida um próximo radical [•]UQH reage com o primeiro reduzindo ele a

UQH₂ que pode ser reutilizada pelo complexo para reiniciar o ciclo – essa reação libera uma UQ livre que se desloca para o início da CTE e promove a transferência de mais 4 H⁺ para o espaço intermembranar (Nicholls & Ferguson, 2013).

Por fim, mas não menos importante, o complexo IV que possui 160 kDa de massa molecular e 13 subunidades (**Figura 4**), seu principal objetivo é utilizar os elétrons que são transferidos pelo citocromo c para reduzir o O₂ a H₂O, esse processo é conhecido como respiração celular. Durante esse processo, a citocromo oxidase transporta os elétrons da mesma forma que os demais complexos, porém diferentemente dos outros (I e III) ao invés de translocar 4 H⁺ ele transloca apenas 2 H⁺ (Nicholls & Ferguson 2013). Um fato histórico sobre tal complexo é que durante a segunda guerra mundial bombas de ácido cianídrico (HCN) foram utilizadas para matar soldados, tal efeito tóxico ocorre porque o íon cianeto (CN⁻) bloqueia o complexo IV e impede que ele consuma O₂ (Stock & Lohs, 1997). Dessa forma, a mitocôndria tem a interrupção do bombeamento de prótons, o bloqueio na produção de ATP e por consequência há a morte do organismo.

Figura 4. Transporte de elétrons pelo complexo II, III e IV.



Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6^a edição, 2014.

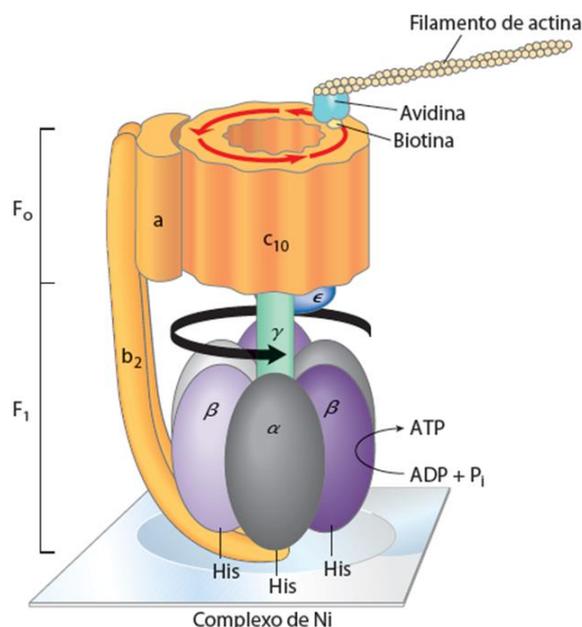
Os mecanismos de transporte de elétrons por esses grupos prostéticos foram descritos pelo cientista Henry Taube na década de 80 que divide o processo em três processos: esfera externa, esfera interna e mecanismo químico (Toma, 2015). Esfera externa ocorre quando os níveis de energia entre o doador de elétrons e o receptor de elétrons são ressonantes, ou seja, de mesma energia e com isso a transferência é favorável mantendo a composição química e mudando o estado de oxidação, tal processo é muito comum quando a enzima possui mais de um centro metálico no seu sítio ativo. Esfera

interna é comum quando possui moléculas com sistema π conjugados, como a UQ, por exemplo, pois os elétrons a serem recebidos por essas moléculas ocupam os orbitais moleculares de simetria π que estão vazios, formando uma ligação que normalmente seria com hidrogênio. No mecanismo químico, ocorre a transferência dos elétrons nos centros Fe-S porque nessa estrutura os elétrons recebidos são delocalizados em graus variados já que os átomos fazem papel de ponte com seus orbitais vazios que são capazes de doar e receber esses elétrons (Toma, 2015).

Esses prótons que são transferidos para o espaço intermembranar são de extrema importância, uma vez que são responsáveis pela formação do potencial eletroquímico de membrana, que é de 150 a 200 mV. O potencial elétrico é gerado devido à diferença de carga, sendo um lado mais positivo, decorrendo do acúmulo de íons H^+ no espaço intermembranar, e o outro lado mais negativo, devido ao acúmulo de íons hidroxilas (OH^-) na matriz mitocondrial. O potencial químico é a diferença de pH, sendo consequência desse acúmulo de OH^- e H^+ , ou seja, para um meio estar mais básico na matriz ($pH > 7,4$) e mais ácido no espaço intermembranar ($pH < 7,4$), a variação de pH pode ser de $\sim 0,75$ unidades (Mitchell 1979). Porém, esse estado de potencial formado não é favorável energeticamente e, por conta disso, os prótons retornam para a matriz utilizando apenas ATP sintase, entretanto, em casos específicos podem existir outros transportadores que também podem ser usados, como um grupo de proteínas desacopladoras (UCPs) (Nicholls & locke, 1984).

A ATP sintase (**Figura 5**) é uma proteína com 2 subunidades (F_0 e F_1) e um massa molecular de 448,85 kDa, uma enzima que catalisa a formação de ATP. Entretanto, para que essa reação ocorra, os prótons do espaço intermembranar precisam retornar para a matriz passando por dentro de uma das subunidades da ATP sintase, a F_0 , gerando uma força próton motriz que fornece energia cinética suficiente para girar a subunidade F_1 e fundir uma adenosina difosfato (ADP) com uma molécula de fosfato inorgânico (P_i) liberando o ATP (Nelson & Cox, 2014).

Figura 5. Rotação da ATP sintase.



Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6ª edição, 2014.

A mitocôndria é a principal organela e a maior produtora de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e isso acontece porque diversos fatores podem influenciar negativamente o funcionamento da CTE, como, por exemplo, íons de cálcio e fosfato inorgânico em excesso. Porém existem outros dois processos que podem ocorrer e que causam uma produção exacerbada de EROs. Um deles é o fluxo reverso de elétrons que ocorre quando a UQH₂ transporta os elétrons do complexo II para o complexo I, favorecendo o “*escape*” desses elétrons para a síntese do ânion radical superóxido (O₂⁻), a primeira espécie reativa de oxigênio formada. O outro evento e fonte geradora de EROs é a cinética reacional em que a CTE funciona, interferindo principalmente o complexo III, o qual torna-se o maior produtor de EROs de toda a cadeia, pois, no complexo III tem a formação de um radical ([•]UQH) e quando a CTE funciona de forma mais lenta gera um aumento na probabilidade desse radical reagir com o oxigênio molecular (O₂), assim, formando o O₂⁻ na matriz mitocondrial. Entretanto, a produção fisiológica de EROs é benéfica (quando o escape dessas espécies é de 8 a 10%) porque está envolvida em processos de sinalização na mitocôndria e na célula, além de respostas imunológicas importantes (Mittler et al., 2016). Por outro lado, existem outras fontes de produção de EROs que se encontram no citosol, como, por exemplo, a NADPH oxidase, que é uma enzima produtora de O₂⁻, ou a xantina oxidase, que produz peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

O estresse oxidativo é uma condição caracterizada pelo desequilíbrio entre oxidantes (EROs) e antioxidantes, levando a uma interrupção na sinalização redox bem como no controle aos danos celulares (Sies et al., 2017). As EROs são moléculas derivadas de oxigênio que apresentam uma reatividade elevada e tempo de meia vida curto comparado as outras moléculas do meio biológico (**Tabela 1**), devido a isso, essas espécies são capazes de oxidar biomoléculas, como DNA, carboidratos, glutathiona (GSH), lipídeos (R-COOH) e até proteínas, principalmente, nos seus resíduos de cisteínas reduzidas (R-SH).

Tabela 1. Propriedades e reatividade das EROs em geral (adaptado de Mittler et al., 2016).

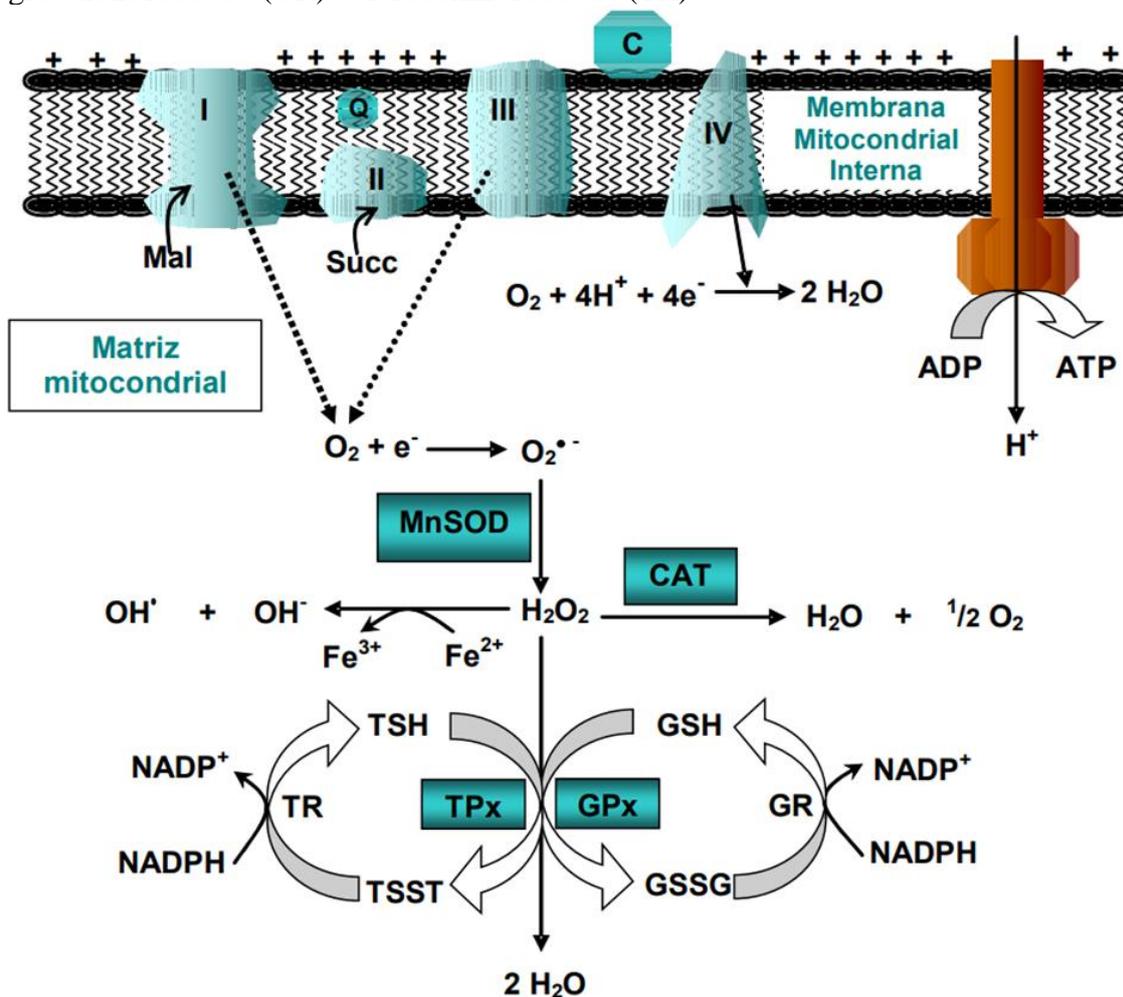
EROs	$t_{1/2}$	Distância de migração	Modo de ação	Sítio de produção	Sistema de eliminação
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	1-4 μ s	30 nm	Reação com proteínas Fe-S, Dismutação para H_2O_2	Apoplastos (RBOHs), cloroplastos, mitocôndria, peroxissomos,	SOD, flavonóides, ascorbato.
Radical Hidroxila (\cdotOH)	1 ns	1 nm	Extremamente reativo com todas as biomoléculas incluindo DNA, RNA, lipídeos e proteínas	Ferro e H_2O_2 (reação de Fenton)	Flavonóides, prolina, açúcares, ascorbato...
Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	>1 ms	>1 μ m	Reage com proteínas atacando os resíduos de cisteína e metionina, reage com o heme proteico, reage com DNA	Peroxissomos, cloroplastos, mitocôndria, citosol, apoplastos	APX, CAT, GPX, PER, PRX, ascorbato, glutaciona...
Oxigênio Singlete (1O_2)	1-4 μ s	30 nm	Oxida lipídeos, proteínas (resíduos de Trp, His, Met e Cys) e moléculas de G do DNA	Membranas, cloroplastos, núcleo	Carotenóides e α - tocoferol

Propriedades ($t_{1/2}$, distância de migração), reatividade (modo de ação), formação (sítios de produção) e eliminação (sistemas de eliminação) de EROs em células vegetais e animais. Abreviaturas: APX, ascorbato peroxidase; CAT, catalase; GPX, glutaciona peroxidase; PER, peroxidase; PRX, peroxiredoxina; RBOH, NADPH oxidase; SOD, superóxido dismutase, Trp, triptofano; His, histidina; Met, metionina; Cys, cisteína.

Entretanto, a mitocôndria conta com um dos mais potentes sistemas antioxidantes de toda a célula, pois, embora trate-se da principal produtora de EROs nas células, seu sistema antioxidante é composto por diversas biomoléculas capazes de neutralizar estas EROs por uma série de vias, como as enzimas antioxidantes. A primeira delas é a superóxido dismutase que realiza a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , a SOD é uma enzima que possui 3 isoformas (SOD1, SOD2 e SOD3), cada uma delas ocupa uma região específica da célula sendo a SOD2 mitocondrial, e seu sítio ativo possui um manganês (Mn^{2+}) como cofator coordenado a quatro histidinas e uma molécula de água. A catalase (CAT) age detoxificando o H_2O_2 , seu sítio ativo é composto por um grupo heme onde o átomo de ferro está com o estado de oxidação $3+$ e a glutathione peroxidase (GPx, cujo sítio ativo é composto por selênio, Se^{2+}) ambas capazes de reduzir o H_2O_2 em água, porém quando a GPx neutraliza o H_2O_2 sua atividade é perdida devido a oxidação do seu sítio ativo, entretanto, existe um outro sistema acoplado a essa enzima chamado de Sistema da Glutathione que serve para reduzir o sítio ativo da GPx e reconstituir a forma ativa da enzima (Facundo et al., 2007).

O sistema da glutathione funciona como um ciclo utilizando duas glutathiones reduzidas (GSH, um peptídeo formado por cisteína, glutamato e glicina) para reduzir a GPx na sua forma ativa gerando como subproduto o dissulfeto de glutathione ou a glutathione oxidada (GSSG); essa, por sua vez, é reduzida pela enzima glutathione reductase dependente de NADPH reconstituindo a forma reduzida da glutathione, GSH, concluindo o ciclo (Facundo et al., 2007) (**Figura 6**). Além do sistema da GPx também existe o sistema da tioredoxina (TRx) que funciona de forma similar.

Figura 6. Sistema antioxidante mitocondrial. Sendo malato (Mal), succinato (Succ), glutationa redutase (GR) e tioredoxina redutase (TR).



Fonte: Facundo et al., 2007.

Existem diversos estudos que comprovam o envolvimento da mitocôndria nas mais variadas doenças, como, por exemplo, doenças cardiovasculares (Assis et al., 2022), doenças neurodegenerativas (Park et al., 2021) e até câncer (Zong et al., 2016). O envolvimento em questão é proveniente por essa organela ser a maior produtora de EROs quando comparado aos demais sistemas celulares. Uma das teorias mais aceitas para o desenvolvimento de diabetes tipo 1, por exemplo, é o “burst oxidativo”, no qual ocorre uma produção acentuada de EROs levando à morte das células β pancreáticas e extinguindo a produção de insulina no paciente acometido com tal patologia (Newsholme et al., 2007). Outra doença que tem essa característica de ser causada pela elevação de EROs é a aterosclerose, essa patologia é caracterizada pelo acúmulo de lipídeos na parede do endotélio, sendo decorrente de um processo que envolve a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (oxiLDL) pelas EROs tornando-se uma estrutura não reconhecida pelo organismo, com isso, o sistema imune é ativado recrutando as células desse sistema,

como por exemplo os monócitos, esses são diferenciados em macrófagos que são responsáveis pela fagocitose desse oxLDL formando células esponjosas que se alojam na parede dos vasos sanguíneos (Assis et al., 2022).

Existe uma gama de doenças neurológicas que também sofrem influência do estresse oxidativo mitocondrial; começando com a doença de Alzheimer, uma doença neurodegenerativa que causa demência e comprometimento das funções cognitivas, onde Park e colaboradores (2021) relatam que pacientes acometidos com essa doença possuem grande quantidade de 4-hidroxinonenal (4-HNE) e malonaldeído (MDA), produtos da peroxidação lipídica, que nesse caso ocorre por vias mitocondriais devido ao aumento na produção do O_2^{\bullet} . A doença de Parkinson, é outra patologia neurológica comum que afeta o movimento, possui perda de neurônios dopaminérgicos e formação de corpos de lewy, na qual o envolvimento mitocondrial está atrelado a vários processos fisiológicos, como o comprometimento da CTE, mutações no DNA mitocondrial e alterações na própria morfologia da organela (Subramaniam et al., 2013). Por fim, a esclerose lateral amiotrófica também é uma doença que tem o envolvimento mitocondrial e afeta principalmente os neurônios motores causando atrofia muscular, porém os dados sobre essa doença ainda são limitados, mas se sabe que uma das possíveis causas da morte celular é consequência da enzima superóxido dismutase mitocondrial que sofre mutação, forma um aduto com um canal presente na membrana externa da mitocôndria, o canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), gerando disfunção mitocondrial como liberação do citocromo c, alteração na homeostase do cálcio e aumento na expressão de um fator pró-apoptótico, proteína X (BAX), levando à morte celular (Candelise et al., 2022).

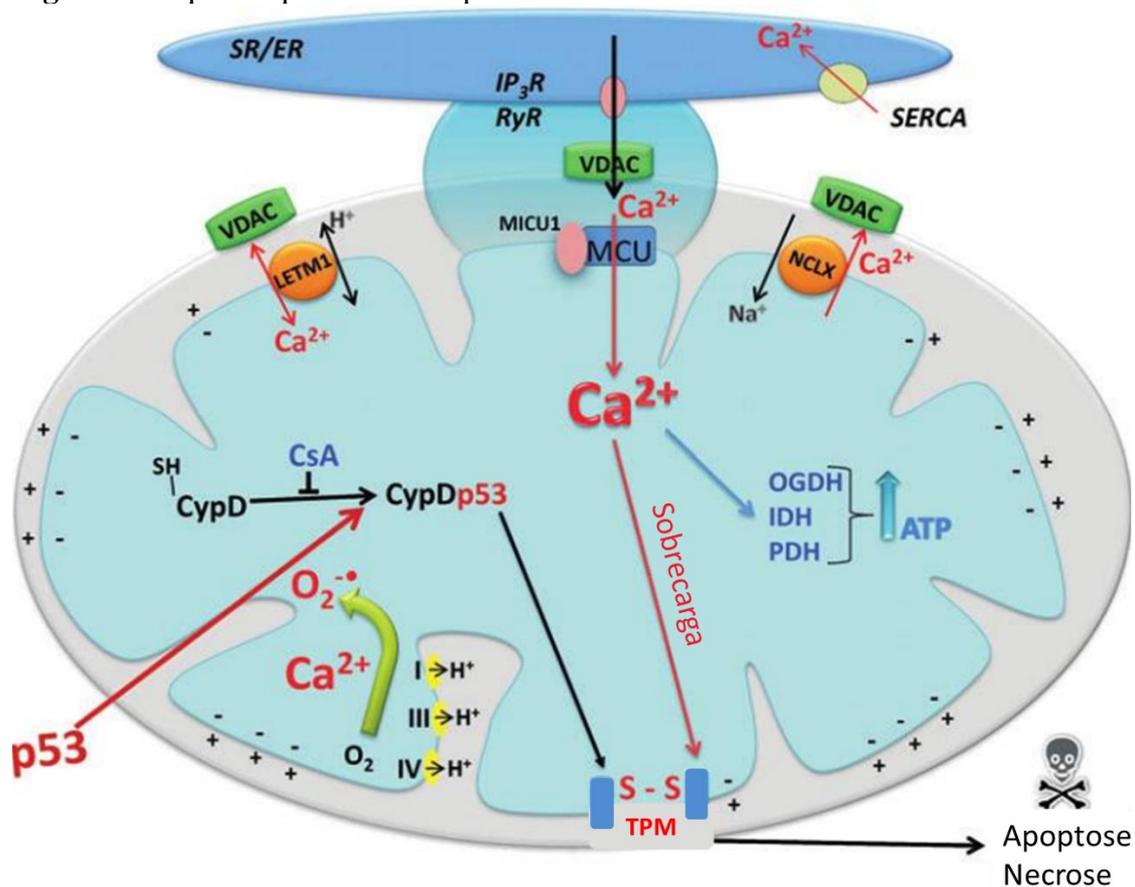
2.2 Transição de Permeabilidade Mitocondrial

A mitocôndria possui diversos mecanismos que podem auxiliar na perda da sua integridade e funcionalidade, podendo levar à morte celular (Li et al., 2018). A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é uma condição que ocorre na membrana interna de forma não seletiva caracterizada pela abertura de um poro decorrente de um acúmulo excessivo de íons cálcio (Ca^{2+}). Essa abertura causa perda na funcionalidade da CTE bem como a entrada de moléculas de água gerando um inchamento da organela, perda no potencial de membrana e por consequência o rompimento da membrana interna liberando fatores de morte celular, como, por exemplo, o citocromo c (Kowaltowski et al., 2001).

A abertura do poro envolve uma série de proteínas ou componentes proteicos que são influenciados por vários fatores (**Figura 7**). Uma das proteínas mais conhecidas que faz parte deste poro e que está na matriz mitocondrial é a ciclofilina D, que tem função catalítica e pertence a uma família de isomerases que estão vinculadas ao processo de enovelamento proteico (Haleckova et al., 2022). Outras duas proteínas envolvidas também na abertura do poro são o transportador de fosfato e o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) (Ronchi et al., 2011), ambas tem função de canal sendo a primeira responsável pelo transporte de fosfato e a segunda responsável pela troca de ADP por ATP, em um processo que envolve diferenças de cargas para tal transporte (Chinopoulos et al., 2010).

Além dessas proteínas, a TPM induzida por Ca^{2+} também é mediada pela oxidação dos grupos tiólico (SH) promovendo a reticulação desses grupos formando agregados proteicos (Vercesi et al., 2018). Dito isto, agentes que modulam esses sistemas são bastante estudados seja para favorecer ou inibir a TPM, por exemplo, para favorecer a TPM são usadas altas concentrações de Ca^{2+} (Leite et al., 2010) ou outras moléculas oxidantes que induzem o estresse oxidativo (Kowaltowski et al., 2000). Por outro lado, para inibir a TPM são usados redutores tiólicos (NEM e DTT), EGTA para complexar Ca^{2+} , catalase como fonte antioxidante e o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) que está envolvido na reconstituição dos sistemas da glutatona e da tioredoxina (Facundo et al., 2007), dentre outros inibidores. Um outro agente que adicionado farmacologicamente que tem uma atuação importante na modulação da TPM é a ciclosporina A (CsA), que é um fármaco imunossupressor que inibe a ciclofilina D inibindo a formação do agregado proteico que leva à TPM (Kowaltowski et al., 1999; Fernandes et al., 2014).

Figura 7. Esquema que resume as proteínas envolvidas na abertura do TPM.



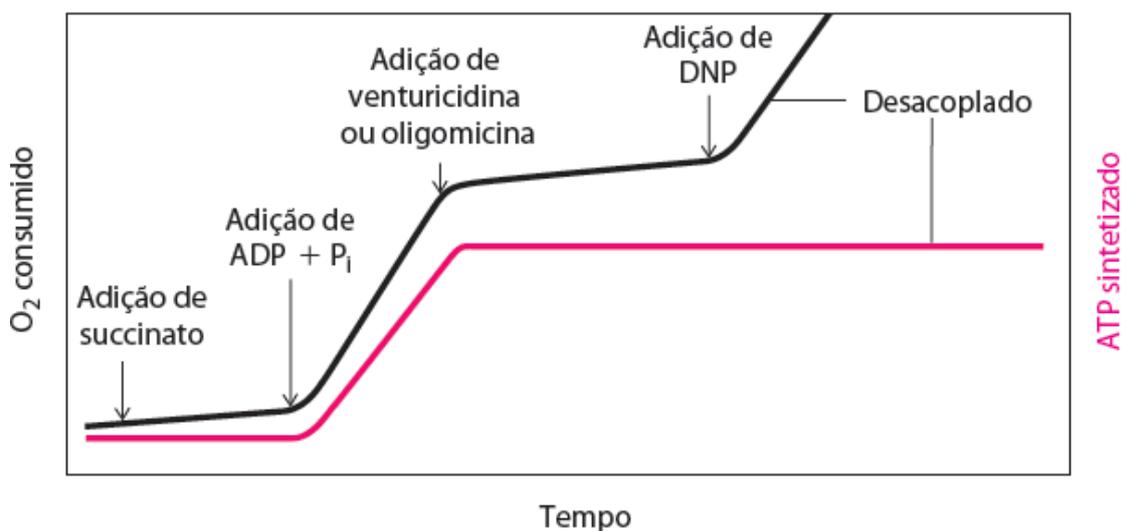
Fonte: Figueira et al. 2013.

2.3 Estudos da bioenergética mitocondrial

O desenvolvimento de estudos utilizando mitocôndrias não é tão simples, principalmente quando se quer estudar sua funcionalidade e integridade, pois implica em reproduzir os experimentos com a organela funcional. No primeiro experimento geralmente realizado para se avaliar a funcionalidade da mitocôndria, observa-se o funcionamento da CTE através do consumo de oxigênio. Tal parâmetro é avaliado em tecido ou células permeabilizados, ou em mitocôndrias isoladas. Tal experimento se baseia em fornecer substrato para a mitocôndria a fim de estimular cada estágio do seu funcionamento, ou seja, inicialmente as mitocôndrias são colocadas frente a uma mistura de substratos para o complexo I (piruvato, glutamato, malato e α -cetogluturato), onde a maioria desses compostos são componentes do ciclo de Krebs, ou substratos de outras desidrogenase que produzem NADH. Nos experimentos (no oxígrafo), esse início é chamado de velocidade basal (V_2), logo depois é adicionado ADP para se estimular a ATPsintase frente a seu substrato, aumentando assim a taxa de consumo de oxigênio decorrente da síntese de ATP, em outras palavras fosforilação oxidativa, esse estado é

chamado de velocidade de fosforilação (V_3). Quando todo o ADP é utilizado o consumo de oxigênio requerido é demasiadamente diminuído, tal estado é chamado de velocidade de repouso (V_4). Porém quando não ocorre esse processo de forma espontânea, faz-se necessário o uso da oligomicina, uma droga que tem como função o bloqueio da ATP sintase e conseqüentemente a redução ou quase inibição do consumo de oxigênio. Por fim, a adição de um desacoplador químico que é capaz de transportar os H^+ do espaço intermembranar para a matriz sem a utilização da ATP sintase (por exemplo DNP ou CCCP), esse estado também induz a capacidade máxima de respiração por acelerar a CTE como um todo; esse é a velocidade de desacoplamento (V_{cccp}) (**Figura 8**). No fim desse experimento é então calculado uma razão entre a V_3 e a V_4 chamado de Controle Respiratório (CR) para avaliar se o funcionamento da CTE está adequado e quanto maior for o valor de tal razão, melhor será o funcionamento da CTE e conseqüentemente o funcionamento da mitocôndria (Nelson & Cox, 2019).

Figura 8. Gráfico representativo para o experimento de CTE. O V_2 representado como a adição de succinato, o V_3 com a adição do ADP+Pi, o V_4 com a adição de venturicidina ou oligomicina e a V_{CCCP} com a adição do dinitrofenol (DNP).



Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6ª edição, 2014.

Para a avaliação da integridade mitocondrial os experimentos clássicos são: o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) e o inchamento mitocondrial. Para o potencial elétrico de membrana o método mais eficiente é o da Safranina O. Uma molécula carregada positivamente que emite fluorescência, porém ao interagir de forma eletrostática com a mitocôndria sofre um *quenching*, perda de fluorescência, onde essa perda é proporcional a formação do $\Delta\psi$. Já o inchamento mitocondrial o experimento é

baseado no espalhamento de luz, ou seja, quanto maior o espalhamento de luz e menor a turbidez maior o inchamento mitocondrial (Fernandes et al., 2014).

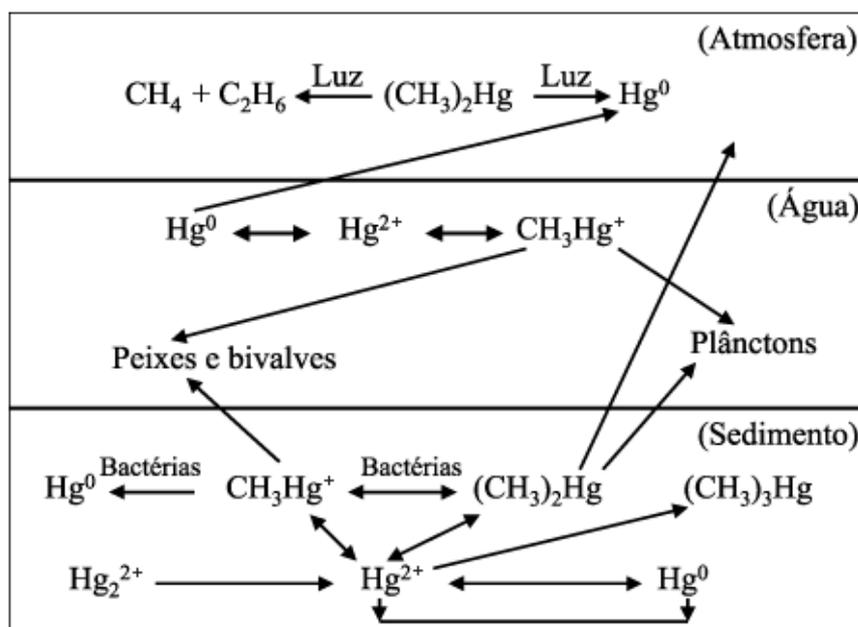
Por fim, um dos experimentos clássicos para se avaliar a maquinaria mitocondrial é a produção de EROs, que é um processo fisiológico da organela que já foi descrito acima. Um dos métodos mais usados para se quantificar as EROs são através de moléculas que reagem com cada uma delas de forma específica gerando um produto que emite fluorescência e essa emissão é proporcional a quantidade de tais espécies.

2.4 Mercúrio e suas espécies orgânicas

Mercúrio ($200,59 \text{ g mol}^{-1}$) é um metal de transição com número atômico 80 e símbolo Hg, pertence ao grupo 12 da família IIB da tabela periódica e é um metal que em temperatura ambiente se encontra no estado líquido. Seus estados de oxidação mais comuns são 0, 1+ e 2+. Além disso, é um metal que tem uma versatilidade na formação de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, cloreto de mercúrio (HgCl_2), metilmercúrio (MeHg^+) e etilmercúrio (EtHg^+). É um metal que tem diversas aplicações, por exemplo, em indústrias de soda cáustica (hidróxido de sódio, NaOH), na mineração, podendo solubilizar outros metais como o ouro e o zinco formando amalgama, na produção de termômetros, baterias, lâmpadas fluorescentes e como conservante de alguns cosméticos e até em vacinas (Quali, 2020).

Como o mercúrio é uma substância presente na natureza, encontrado principalmente no solo como cinábrio (HgS), no ar na forma de vapor e nas águas nas mais variadas formas, está propenso a um ciclo geoquímico natural. O mercúrio presente na atmosfera é predominantemente o mercúrio elementar (Hg^0), porém está suscetível a reações de oxidação e se converte em mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) sendo capaz de interagir com vapores de água, se infiltrar no solo, rios e com isso o mercúrio inorgânico pode sofrer ação de bactérias capazes de converter esse íon em espécies orgânicas como metilmercúrio (MeHg^+) ou em um ciclo complexo para formação de sais de baixa solubilidade (Bisinoti et. al. 2004, Wasserman et. al. 2001) (**Figura 9**). Ações humanas como a mineração e o setor industrial acabam potencializando a contaminação do meio ambiente (Silva-Filho et al., 2021; Santos et al., 2021), dessa forma, as concentrações dessas espécies aumentam e conseqüentemente acumulam nesses ecossistemas, causando riscos a mais de 100 mil pessoas que trabalham ou vivem próximos de regiões contaminadas, como, por exemplo, a região amazônica (Ministério do Meio Ambiente, 2013).

Figura 9. Ciclo do mercúrio em ambientes naturais.



Fonte: Bisinoti et. al. 2004.

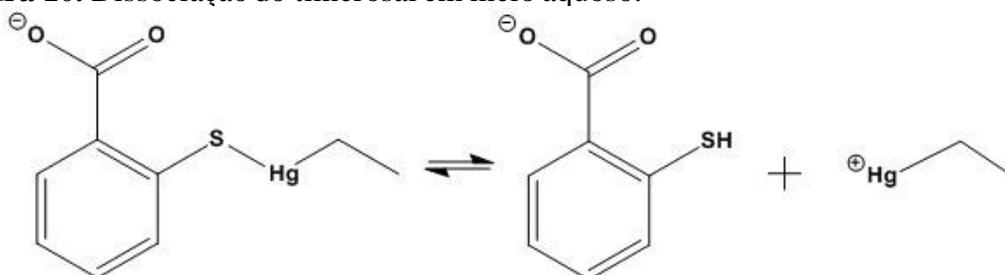
O mercúrio apresenta capacidade de bioacumulação em diferentes sistemas biológicos, assim, acarretando variados problemas ao organismo humano, principalmente devido a disfunções neurológicas (Nascimento et al., 2015), problemas renais (Choi et al., 2016) e até doenças cardíacas (Fillion et al., 2006). Além disso, é capaz de sofrer reações de alquilação, na sua forma inorgânica, ou de desalquilação, na sua forma orgânica, assim, ocorrendo interconversão entre as espécies Hg^{2+} , MeHg^+ e EtHg^+ (Barregard et al., 2011), as quais apresentam níveis de toxicidade diferentes sendo a sua forma orgânica metilada a mais danosa por conseguir atravessar a barreira hematoencefálica, por exemplo (Lohren et al., 2016). O estado da arte aponta que o mecanismo tóxico do mercúrio e suas espécies envolve principalmente o esgotamento dos antioxidantes naturais derivados de enxofre (Carocci et al., 2014) e também o aumento do estresse oxidativo (Liu et al., 2019), causando a morte celular por vias mitocondriais (Carneiro et al., 2015), citotoxicidade em astrócitos (Teixeira et al., 2018), em células hepáticas (Cordier et al., 2021) e até prejudicar o sistema de nocicepção por meio da ativação do sistema opioide endógeno (Olczak et al., 2009).

A parcela orgânica dessas moléculas contribui para a capacidade de se difundir pelas membranas, assim, a molécula completa é capaz de passar para o interior da célula e como o mercúrio possui afinidade por enxofre, existe uma tendência que as espécies de Hg estejam distribuídas preferencialmente nas organelas ricas em SH, como a

mitocôndria (Nesci et al., 2016). Além disso, o mercúrio inorgânico pode fragilizar a membrana das células e dessa forma potencializar sua passagem para o interior destas (Silva-Filho et al., 2021). Estudos realizados por Ahmad e colaboradores (2019) demonstraram que concentrações crescentes de HgCl_2 apresentam relação dose-dependente no processo de hemólise, levando a formação de meta hemoglobina e diminuindo a atividade de enzimas do metabolismo glicolítico.

Um das espécies de mercúrio que vem sendo amplamente estudado nos últimos anos é o timerosal (TM), um composto orgânico ($\text{C}_9\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$) usado como conservante em cosméticos e vacinas desde 1930 (Humphrey et al. 2005), porém na água o TM pode liberar o íon etilmercúrio e o ácido tiosalicílico (**Figura 10**). Desta forma, é um composto capaz de reagir espontaneamente com proteínas como a albumina (Santos et al., 2018) e hemoglobina (Silva et al., 2020) prejudicando essas biomoléculas em aspectos estruturais e funcionais. Além disso, Sales e colaboradores (2022) mostraram que o TM é capaz de atravessar a membrana dos eritrócitos causando alterações morfológicas, bem como, mudanças funcionais na hemoglobina, uma das proteínas mais abundantes dos eritrócitos e responsável pelo transporte de O_2 . Carneiro e colaboradores (2014) mostraram em seu estudo com ratos Wistar que a exposição ao TM pode gerar no organismo outras espécies de mercúrio em decorrência do metalismo, desta forma, no balanço de massa, se observou 67% de mercúrio inorgânico e 33% de mercúrio orgânico (EtHg^+) após 8 horas de exposição.

Figura 10. Dissociação do timerosal em meio aquoso.



Fonte: autoral, 2023.

Um estudo sobre o uso do TM foi avaliando a relação que tal composto tem com o desenvolvimento do transtorno do espectro autista (Gerber et al., 2009), visto que grávidas e principalmente crianças recebem uma carga alta de vacinas nos primeiros meses de vida, porém os dados epidemiológicos mostram que não existe uma relação de causalidade. Outrossim, baixas concentrações desse composto induzem a

neurotoxicidade e podem induzir síndromes, como, neurite periférica, encefalopatia e polineuropatia (Dórea et al., 2011). Além de tudo, existem estudos mais específicos mostrando que o TM pode causar aumento nas concentrações de cálcio no citosol de células acometidas com osteosarcoma (Chang et al., 2005), promove reações pseudoalérgicas relacionadas à proteína G (Peng et al., 2019), oxidação de proteínas e danos ao DNA (Öztürk et al., 2022). Por fim, o mercúrio, assim como o TM, vem sendo associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e um dos possíveis motivos é o aumento da atividade de enzimas como a fosfolipase D, a qual hidroliza fosfolídeos de membrana e produz lipídeos bioativos, consequentemente causando disfunção vascular (Hagele et al., 2007).

Recentemente (dados não publicados), nosso grupo realizou uma pesquisa baseada na exposição aguda (24 h) de TM em doses semelhantes às de uma vacina para humanos em ratos Wistar com idades equivalentes a uma criança de 2 anos. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar as alterações que o TM poderia causar na bioenergética mitocondrial e no sistema antioxidante no fígado e no cérebro desses animais. Em tal estudo, a exposição aguda ao TM promoveu aumento no controle respiratório em ambos os órgãos utilizando substrato para o complexo I, porém no fígado foi observado uma redução da V_3 mostrando que apesar da melhora no controle respiratório os animais tinham uma diminuição na produção de ATP, assim, esse resultado nos levou a teorizar que o TM causa o comprometimento do bombeamento de prótons limitando a atividade da ATP sintase. Além disso, o sistema antioxidante só foi afetado no cérebro demonstrando que esse órgão é mais sensível ao danos causados pelo mercúrio, assim como a atividade da acetilcolinesterase diminuída constatando o perfil neurotóxico causado pelo TM. Portanto, o TM de uma forma geral tem uma maior capacidade de gerar danos no sistema nervoso, mas isso não impede do mesmo composto causar danos em outros órgãos, levando a outras patologias.

2.5 Hipertensão

Hipertensão é uma doença caracterizada pela pressão arterial elevada que ocorre quando existe uma relação entre a alteração da resistência periférica total e o débito cardíaco onde considera-se a pressão diastólica maior que 90 mm Hg e/ou a pressão sistólica superior a 140 mm Hg (Kumar et al., 2005). Tal condição ainda pode aumentar os riscos de doenças cardíacas, cerebrais, renais, entre outras (OMS 2022). A hipertensão também é caracterizada pela interação de diversos fatores genéticos, demográficos e

ambientais que interferem no débito cardíaco e na resistência vascular (Kumar et al., 2005), dessa forma, quanto maior a pressão arterial, maior é a dificuldade do coração bombear. Além disso, a OMS afirma que mais de 1 bilhão de pessoas são acometidas com essa condição patológica e, com isso, é uma das principais causas de morte em todo o mundo; sendo um a cada quatro homens, e ainda uma a cada cinco mulheres portadores de tal doença. Por fim, outra questão importante sobre essa patologia é que os países que mais são afetados são aqueles de média e baixa renda (WHO 2022).

Já no Brasil, o Ministério da Saúde publicou uma nota em 27 de abril de 2022 afirmando que na população adulta estima-se que 24,5% seja hipertensa e considerando apenas os indivíduos com mais de 65 anos, essa porcentagem chega aos 59,3%, além disso, no Brasil a incidência dessa patologia é maior em mulheres chegando a 61,6% e nos homens a 55,5% (Ministério da Saúde, 2022). Com base nesses números, a Sociedade Brasileira de Cardiologia em 29 de abril de 2021 descreveu que no Brasil ocorrem cerca de 300 mil mortes por ano decorrentes de doenças cardiovasculares principalmente por Acidente Vascular Cerebral (AVC) ou Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), levando em consideração esses valores, cerca de 80% dos pacientes que morrem de AVC e 60% que morrem de IAM tem hipertensão (Sociedade Brasileira de Cardiologia 2021).

Os sintomas para essa doença são os mais variados, os mais comuns dentre eles são descritos pelo Ministério da Saúde, são eles: dores no peito, dores de cabeça, tontura, fraqueza e sangramento nasal; mas também em muitas vezes a doença pode se demonstrar silenciosa, ou seja, sem apresentar sintomas. Entretanto, a hipertensão por ser uma doença sistêmica pode desencadear outras patologias no indivíduo, como, por exemplo, a insuficiência renal, feocromocitoma, aldosteronismo e até doença renovascular (Kabra, 2015; Boettcher et al., 2018; Carretero & Oparil, 2000). No estado da arte, como o desenvolvimento da hipertensão é multifatorial os autores descrevem as causas que podem desencadear essa patologia, como: pré disposição genética, consumo excessivo de álcool, ingestão exacerbada de sódio, alto estresse mental e até fatores ambientais (Garfinkle, 2017; Gangwisch, 2014; Xin et al., 2001; Esler, 2017). O desenvolvimento da sociedade também é um fato relevante para desencadear a doença, visto que, existe uma relação diretamente proporcional a várias exposições, que vão de fatores ambientais, como por exemplo, ruído alto, poluição do ar e poluentes atmosféricos; onde efeitos na pressão arterial que são clinicamente significativos (Brook et al., 2011; Münzel et al., 2020).

Page (1967) propõe uma teoria chamada “Teoria do Mosaico das Múltiplas Causas da Hipertensão” que afirma que a hipertensão é uma consequência da perturbação

de mecanismos regulatórios que controlam a pressão arterial em vários tecidos e isso abrange modificações nos sistemas imunológicos, endócrinos e neurológicos, além disso, o aumento do estresse de cisalhamento, alongamento vascular e ainda aumento da hemodinâmica (Dikalov & Ungvari, 2013). Porém essa teoria foi reformulada por Harrison (2013) que acrescentou fatores como o aumento dos EROs que leva ao estresse oxidativo, esse aumento de EROs pode ser decorrente de várias vias e uma delas é da ativação da NADPH oxidase via angiotensina II que produz o $O_2^{\cdot-}$. Esse estresse oxidativo, hoje em dia, é considerado o mecanismo essencial e responsável para o início da doença (Rodrigo et al., 2011), o porquê de tal estresse ser relevante para o desenvolvimento e até a progressão da doença se dá pelo fato de que avaliando o sistema antioxidante de pacientes acometidos com tal patologia é comum encontrar excesso de subprodutos desse sistema, como por exemplo, produtos da peroxidação lipídica, redução da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e de intermediários moleculares responsáveis pela neutralização dos EROs (GSH e SH) (Griendling et al., 2021).

Existe vários tipo de hipertensão, uma delas é dependente de angiotensina II gerando um desbalanço nos níveis desse hormônio causando o estresse oxidativo, dessa forma, o organismo aumenta a liberação de citocinas pró inflamatórias, como, por exemplo, interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α); dessa forma, com a IL-6 aumentada o fígado é estimulado a liberar mais angiotensinogênio sendo essa uma das vias que amplifica os níveis de angiotensina II circulante (Satou et al., 2018). Com isso, os receptores AT1R são ativados dando início a fibrogênese hepática onde as células estreladas hepáticas, um tipo de célula responsável pelo controle dos componentes da matriz extracelular, começam a liberar colágeno do tipo I e II consequentemente sofrem uma transformação fenotípica para miofibroblastos ativos (Shim et al., 2018). Outro processo patológico e progressivo relacionado à hipertensão é a doença hepática gordurosa não alcoólica, entretanto, não está claro ainda qual doença é desenvolvida primeiro e sim a relação bidirecional entre as duas, isso porque ambas compartilham muitos sintomas como a resistência insulínica além de injúria no fígado demonstrado por marcadores como glutamiltransferase, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (Zhao et al., 2020).

Em outra mão, temos que a produção exarcebada de EROs pela angiotensina II promove também o esgotamento do conteúdo mitocondrial e consequentemente seu DNA contribuindo com a disfunção dessa organela, além disso, ocorre a redução dos níveis de glicogênio devido ao comprometimento da atividade do glicogênio sintase causando um

aumento nos níveis de glicose no sangue (Ramalingam et al., 2017) podendo ser esse um dos motivos para a resistência insulínica causada pela hipertensão. Está claro até então que o estado da arte aborda a hipertensão como um fator que pré-dispõe o fígado a outras patologias com a doença hepática gordurosa não alcoólica, a hipertensão portal que é um tipo de hipertensão específica na veia porta (Kim et al., 2016) e a cirrose, o estágio final do comprometimento do fígado causado pelo excesso de fibrose, inflamação crônica e acúmulo de gordura (Ginès et al., 2021). Contudo, a ligação entre essas doenças ainda permanece sem muito esclarecimento, visto que, a hipertensão é multifatorial podendo ser a precursora ou a consequência das demais patologias supracitadas.

Para o cérebro os problemas causados pela hipertensão são mais significativos, visto que a hipertensão abre portas para outros tipos de doenças neurodegenerativas como Alzheimer ou então implicações cognitivas, como, perda do raciocínio abstrato e retardo no processamento mental (Ungvari et al., 2021). Como a hipertensão é tratada como a doença do envelhecimento, existe também fatores relacionado a esse processo que influenciam diretamente na patologia, por exemplo, o envelhecimento compromete a homeostase das defesas antioxidantes pela via da regulação negativa do fator nuclear eritroide 2 (NRF2), um fator transcricional que induz a expressão de vários genes antioxidantes (Ungvari et al., 2011), conseqüentemente aumenta o estresse oxidativo gerado pela hipertensão comprometendo a saúde do cérebro levando a neuro inflamação, ruptura da barreira hematoencefálica e até problemas na micro vasodilatação (Toth et al., 2013).

O processo patológico hipertensivo no cérebro é tratado com um ciclo, ou seja, a atividade da angiotensina II promove um aumento de EROs citosólico e mitocondrial, esse acúmulo induz um processo inflamatório produzindo citocinas que regula negativamente a expressão do NRF2 e de outro fator de transcrição mitocondrial A (TFAM, esse relacionado com a biogênese mitocondrial) (Wu et al., 2016). Com isso, há um comprometimento na bioenergética mitocondrial proveniente da diminuição na atividade da CTE, depleção do conteúdo de ATP e expressão de proteínas desacopladoras como as UCPs (Chan et al., 2017) atenuando assim a hipertensão neurológica. Estudos como o do Mohammadi e colaboradores (2015) mostram também que a hipertensão é capaz de aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica decorrente da depleção da expressão de proteínas como claudinas podendo esse ser uma das vias que causa lesões cerebrais. Como consequência disso, as regiões protegidas pela barreira hematoencefálica acabam sendo expostas a principalmente angiotensina II circulante dando início a um novo ciclo hipertensivo causando um problema generalizado (Young et al., 2015).

Existe diversos modelos experimentais que podem simular doenças cardiovasculares e que são utilizados para entender melhor tanto a patologia como também processos terapêuticos que visam a melhora da doença, um exemplo desses modelos e que é um dos mais estudados para hipertensão são os ratos espontaneamente hipertensos (SHR). O grande volume de estudos utilizando esse modelo se dá porque a resposta cardiovascular é facilmente obtida por desenvolverem a patologia de forma espontânea com 90 dias de idade (Dornas & Silva, 2011). Os ratos SHR foram produzidos por endogamia seletiva, implementando um estado homozigótico a fim de prover um modelo geneticamente homogêneo de hipertensão hereditária (Okamoto, 1963). Mesmo que a hipertensão dos SHR seja de origem espontânea, fatores ambientais podem potencializar o agravamento de tal patologia como: a ingestão elevada de sódio, estresse ambiental, alterações sociais e interferência do ciclo claro e escuro (Fazan et al. 2006).

Além disso, o modelo hipertensivo SHR tem vantagens em relação a outros modelos, visto que, possuem uma semelhança com a hipertensão desenvolvida por humanos, são elas: pré-disposição genética, respostas semelhantes aos humanos a medicamentos relacionados ao tratamento da patologia e aumento da resistência vascular periférica total (Trippodo & Frohlich, 1981). Esses animais possuem três fases de desenvolvimento hipertensivo, a primeira acontece até a quarta semana de vida e é chamada de pré-hipertensiva, nessa fase os animais possuem a pressão arterial semelhante aos animais normotensos; a segunda fase acontece entre a quinta e a décima quarta semana de vida do animal, aqui os animais demonstram um aumento significativo da pressão arterial porém ainda não são considerados hipertensos; por fim, a terceira fase que ocorre a partir da décima quinta semana até o final da vida, nessa fase a pressão arterial do animal estabiliza em níveis altos e permanecem assim constantemente (Okamoto, 1963).

2.6 Hipertensão × Mitocôndria

Como já foi descrito, a mitocôndria tem um papel fundamental para a produção de EROs, com isso no estresse oxidativo geralmente tal organela está envolvida nas principais doenças crônicas que se sobressaem em nossa população, como a aterosclerose (Dorighello et al., 2018), o câncer (Oliveira et al., 2008), o diabetes tipo 1 (Malaguti et al., 2014) e na doenças do fígado gorduroso não alcóolico (Navarro et al., 2017). Dessa forma, o papel da mitocôndria na hipertensão vem sendo explorado a fim de tentar explicar o seu envolvimento com a doença. Por exemplo, Lopez-Campistrous e

colaborados (2008) estudaram o porquê das mitocôndrias do cérebro apresentarem um funcionamento deficiente em ratos hipertensos e sugerem que a disfunção mitocondrial (maior produção de EROs, diminuição na síntese de ATP como consequência de uma respiração prejudicada) era decorrente a defeitos de montagem nos complexos da CTE e que isso poderia contribuir para o desenvolvimento da hipertensão.

Outro fator importante que tem um papel fundamental na hipertensão é o sistema da renina-angiotensina que é responsável pela regulação da pressão arterial, entretanto, quando existe um desequilíbrio nesse sistema e o corpo produz muita Angiotensina II (ANG II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A ANG II tem várias funções e uma delas é induzir a produção de aldosterona, um hormônio associado a reabsorção de sódio e controle do volume extracelular aumentando a pressão arterial (Berne, 2004), então quando ocorre a ingestão excessiva de sódio o corpo produz mais ANG II, e consequentemente produz mais aldosterona gerando um desequilíbrio que induz a pressão arterial elevada (Gao et al., 2022). Outro papel da ANG II é a ativação dos receptores do tipo 1 estimulando a enzima NADPH oxidase (NOX) a produzir o $O_2^{\bullet-}$, essa é uma das fontes prevalentes de espécie reativa de oxigênio, que vem sendo estudada para avaliar os danos oxidativos gerados por essa via. Dentro desse contexto, Cui & Cols (2019) avaliaram o papel da vitamina D como potencial antioxidante na via da ANG II, demonstrando que essa vitamina pode modular o sistema da renina-angiotensina fazendo o cérebro produzir um peptídeo chamado ANG (1-7) derivado da ANG II que inibe a NOX e bloqueia a cascata oxidativa como um mecanismo neuroprotetor.

Em células hepáticas e endoteliais uma das vias danificadas pela hipertensão é a via da óxido nítrico sintase (NOS) que é a enzima produtora de $\bullet NO$, um vasodilatador, dependente da tetrahydropterina (BH4), diminuindo sua biodisponibilidade gerando uma disfunção endotelial. Svoboda e colaboradores (2012) mostraram que em animais hipertensos (SHR) tem uma menor expressão da enzima que regenera a BH4 quando comparado a animais normotensos (Wistar), com isso, a NOS deixa de transferir elétrons para a arginina e passa a transferir elétrons para o oxigênio molecular dissolvido gerando o $O_2^{\bullet-}$ em vez de $\bullet NO$ contribuindo para o estresse oxidativo. Em vista de todo o contexto abordado, a hipótese desse trabalho é avaliar se a exposição ao TM, derivado de mercúrio que já tem seu papel fundamentado na indução de estresse oxidativo, pode acelerar o desenvolvimento da hipertensão em animais espontaneamente hipertensos (SHR) com foco na bioenergética mitocondrial, visto que, existe uma relação direta entre a disfunção mitocondrial e tal patologia.

3. JUSTIFICATIVA

Nosso grupo recentemente provou que o TM, um composto derivado de mercúrio, quando na presença da hemoglobina dos eritrócitos humanos causa alterações conformacionais e funcionais, principalmente devido a perda em mais 50% da sua capacidade de se ligar ao O₂ evidenciando a toxicidade deste composto nas condições avaliadas (Sales et al., 2022). Além disso, Silva-Filho et. al. (2021) estudando moradores que habitavam em torno de uma lagoa em Maceió, contaminada por mercúrio, encontrou estresse oxidativo em células sanguíneas, bem como, níveis elevados de mercúrio total no sangue dessa população em relação ao grupo controle. A hipertensão é uma das principais doenças crônicas e multifatorial que afetam grande parte da população mundial (WHO 2021), o estresse oxidativo celular e mitocondrial é um evento chave para o desenvolvimento dessa patologia e que pode sofrer influência do mercúrio, outro fator conhecido por ter uma correlação com o desenvolvimento da mesma. Diante da ausência de estudos que tenham essas abordagens, utilizaremos um modelo experimental de hipertensão arterial (ratos SHR) na fase pré hipertensiva na tentativa de investigar se a exposição ao TM causa algum efeito que acelere o processo de desenvolvimento da patologia, tendo como foco a bioenergética mitocondrial e o estado redox.

4 OBJETIVOS

Avaliar os possíveis efeitos causados pela exposição aguda ao TM sobre a bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

4.1 Objetivos Específicos

- ❖ Quantificar o mercúrio total nos órgãos dos animais SHR tratados ou não com TM.
- ❖ Avaliar os efeitos sobre a respiração mitocondrial dos animais SHR controles e tratados com TM (mitocôndrias isoladas dos órgãos: fígado e cérebro);
- ❖ Avaliar a integridade mitocondrial no grupo tratados ou não com TM (potencial de membrana, inchamento mitocondrial e transporte de cálcio) em mitocôndrias isoladas de fígado e cérebro;
- ❖ Mensurar a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no grupo tratados ou não com TM em mitocôndrias isoladas de fígado e cérebro;
- ❖ Medir a atividade das enzimas antioxidantes mitocondriais: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) no grupo ou não com TM no fígado e cérebro;
- ❖ Quantificar marcadores secundários do estresse oxidativo: glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG) e a razão GSH/GSSG, grupos tióis totais reduzidos, lipídeos oxidados, e proteínas carboniladas no grupo tratados ou não com TM no fígado e cérebro;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Os animais ($n = 40$) espontaneamente hipertensos (SHR) machos com 37 dias de vida e pesando 250 g foram divididos em dois grupos: exposto (TM-SHR) e controle (SHR). No grupo exposto agudamente, os animais receberam água contaminada com TM a $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (Arefieva et al., 2016). Os animais controles receberam apenas água. Como os animais foram usados na fase pré-hipertensiva, não foi realizado a medição da pressão arterial já que pela literatura os animais nessa fase teriam uma condição normotensa. A eutanásia foi feita após 24 h de exposição com TM e em seguida o tecido de interesse (fígado e cérebro) foi retirado e colocado em uma solução gelada e saturada de carboidratos, para fígado (250 mM sacarose, 10 mM HEPES e 0,5 mM EGTA, pH = 7,2) e para cérebro (75 mM sacarose, 225 mM manitol, 0,5 mM HEPES, 1 mM EGTA e 0,1% (m/v) BSA, pH = 7,4). Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UFAL, com o número 23/2021.

5.2 Isolamento de mitocôndrias

O isolamento de mitocôndrias se deu por centrifugação diferencial a uma temperatura de 4°C , como descrito por Brustovetsky & Dubinsky (2000) para cérebro e por Schneider & Hogeboom (1950) para o fígado. Logo após o isolamento, foi realizado a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e todos os experimentos foram realizados usando o tampão de reação: fígado (125 mM sacarose, 60 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM K_2HPO_4 e 10 mM HEPES) e cérebro (200 μM EGTA, 130 mM KCl, 10 mM HEPES, 2mM KH_2PO_4 e 1 mM MgCl_2) ambos a pH 7,2.

5.3 Respiração mitocondrial

Avaliamos o consumo de oxigênio frente a uma mistura de substratos para o complexo I (500 mM de malato, 500 mM de glutamato, 500 mM de piruvato e 500 mM de α -cetoglutarato) e EGTA 200 μM . As medidas foram realizadas usando $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteína em uma câmara de vidro de 1,0 mL equipada com agitador magnético, em uma câmara termostatizada e um eletrodo de oxigênio (Oxygraph, Hansateh Instrument,

Reino Unido). A concentração inicial de oxigênio no meio de reação foi de 225 nmol O₂ mL⁻¹ mg⁻¹ de proteína à temperatura de 28°C (Robinson & Cooper, 1970).

O estado de fosforilação foi induzido pela adição de 200 µM de ADP. Depois que todo o ADP foi consumido, o estado de repouso foi iniciado ao se adicionar 1 µg mL⁻¹ de oligomicina. Por fim, o estado máximo ou desacoplado foi induzido pela adição de 1 µM de carbonilcianeto *m*-clorofenil hidrazona (CCCP).

5.4 Potencial de membrana

A determinação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada utilizando uma sonda fluorescente safranina O (5 µM) e as medidas realizadas empregando um espectrofluorímetro (Shimadzu, modelo RF 5301) à 28°C. A reação foi realizada em uma cubeta de 1 mL com 0,5 mg mL⁻¹ de proteína e uma mistura de substratos para o complexo I, o mesmo descrito acima (item 3.4). As condições instrumentais foram estabelecidas como $\lambda_{\text{ex}} = 495$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 586$ nm e *slit* de 5 nm (excitação e emissão) (Nunes et al., 2019). Para os testes de TPM foi utilizado ciclosporina A (1 µM) e EGTA (200 µM) como inibidores do poro.

5.5 Inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial de fígado foi avaliado monitorando a absorbância da suspensão mitocondrial em um espectrofotômetro UV-vis (Shimadzu, modelo UV-1900i) à 520 nm. As mitocôndrias (0,5 mg mL⁻¹) foram adicionadas ao tampão de reação e uma mistura de substratos para o complexo I, a absorbância foi registrada durante 10 min à 28 °C. Para o inchamento mitocondrial de cérebro o monitoramento foi feito em um espectrofluorímetro (Shimadzu, modelo RF5301). As condições instrumentais foram estabelecidas como $\lambda_{\text{ex}} = 540$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 540$ nm e *slit* de 1,5 nm (excitação e emissão). As condições de análise foram iguais as utilizadas nas análises da mitocôndria isolada do fígado (Figueira et al., 2011).

5.6 Produção de espécies reativas de oxigênio totais

O ensaio foi monitorado em um espectrofluorímetro (Shimadzu, modelo RF5301). Assim, para quantificar a produção total de EROs de forma não seletiva, o H₂DCF-DA (5 µM) foi utilizado em mitocôndrias isoladas (0,5 mg mL⁻¹). As condições

instrumentais foram estabelecidas como $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ e com *slit* de 5 nm (excitação e emissão) (Nunes et al., 2019). Uma curva analítica de DCF oxidado foi utilizada para determinar a concentração de DCF (em nM) produzida.

5.7 Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Em mitocôndrias isoladas, a produção de H_2O_2 foi determinada utilizando Amplex-red (10 μM) que é uma sonda seletiva para a produção de tal espécie reativa. Este experimento foi realizado à 28°C na presença de peroxidase (HPR, 1 U mL^{-1}). As análises foram realizadas utilizando um espectrofluorímetro (Shimadzu RF5301) com as condições instrumentais estabelecidas como $\lambda_{\text{ex}} = 563\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 587 \text{ nm}$ e com *slit* de 3 nm (excitação e emissão) (Nunes et al., 2019). Foi realizada uma curva de calibração utilizando uma solução de H_2O_2 para determinar a concentração produzida pelas amostras em nM.

5.8 Produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi mensurada utilizando a sonda fluorescente DAF-FM-DA 5 μM usando um espectrofluorímetro (Shimadzu RF5301) à 28 °C, com uma mistura de substratos para o complexo I. As condições instrumentais foram estabelecidas como $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ e com *slit* de 3 nm (excitação e emissão). Em seguida, 1 μM de catalase e 1 μM de superóxido dismutase foram adicionados ao tampão de reação para minimizar a provável interferência de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 na biodisponibilidade de óxido nítrico (Leite et al., 2010).

5.9 Preparação de tecido homogeneizado

Aproximadamente 0,1 g de tecido foram adicionados a 1,5 mL de tampão de extração contendo 50 mM Tris-HCl (pH = 7,4) e 1 mM EDTA, homogeneizado em gelo usando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e centrifugado a 1180×g e 4°C por 10 min (Silva-Filho et al., 2021). Após o processamento do homogenato foi determinado a concentração de proteínas totais pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

5.10 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

O homogenato de tecido (80 µg de proteína) foi incubado em 50 mM de tampão carbonato/bicarbonato de sódio (NaCO₃/NaHCO₃, pH = 10,2 com 0,1 mM EDTA) à 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL de epinefrina (150 mM) em ácido acético (0,5% v/v) para um volume final de 1,0 mL. A absorbância foi medida à 480 nm em um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1900i) por 5 min. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína necessária para inibir a autoxidação de 1 µmol de epinefrina por minuto. Os resultados foram expressos em proteína U mg⁻¹ (Misra e Fridovich, 1972).

5.11 Atividade da catalase (CAT)

O princípio do ensaio é baseado na determinação da decomposição do H₂O₂. Um total de 40 µg de proteína (do homogeneizado de tecido) foi adicionado em tampão fosfato 50 mM (KH₂PO₄ + Na₂HPO₄, pH = 7,0) à 25°C. A reação foi iniciada adicionando H₂O₂ 10 mM em um volume final de 1,0 mL. O decaimento da absorbância foi medido à 240 nm em um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1900i) por 2 min. Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de proteína necessária para converter 1 µmol de H₂O₂ em H₂O e O₂ por minuto. Os resultados foram expressos como k mg⁻¹ proteína (Aebi, 1984).

5.12 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade de GPx foi monitorada determinando a diminuição na absorbância de NADPH à 340 nm em um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1900i) por 3 min à 20°C. O meio continha 80 µg de proteína (do tecido homogeneizado), 50 mM de Na₂HPO₄ (pH = 7,0), 5 mM EDTA, 84 µM NADPH, 1,1 mM azida de sódio, 1,5 mM GSH, 0,1 U mL⁻¹ glutathiona redutase (GR) e 90 µM H₂O₂ em um volume final de 1,0 mL. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade necessária para a oxidação de 1 µmol de NADPH min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Os resultados foram expressos como U mg⁻¹ (Paglia e Valentine, 1967).

5.13 Atividade da acetilcolinesterase (AChE)

Este ensaio enzimático foi realizado apenas em homogenato de cérebro, realizado com um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1900i) a 405 nm por 3 min usando 108 µg

mL⁻¹ de proteína incubada com tampão PBS a 0,1 M e 0,25 mM de DTNB (5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico), pH 7,4). A acetilcolina (62 mM) foi usada como substrato para AChE. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 mmol de substrato por minuto (Assis et al., 2010).

5.14 Conteúdo do grupo sulfidril (SH)

O teor de sulfidril foi determinado a partir da reação com DTNB (5,5'-ácido ditiobis-2-nitrobenzóico). O homogenato de tecido (100 µg de proteína) foi incubado no escuro com DTNB 500 µM por 30 min. Após isso, o volume foi ajustado para 1 mL com tampão de extração (50 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA, pH 7,4), e a absorbância foi determinada à 412 nm (Ellman, 1959) em um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1900i). Foi feita uma curva de calibração utilizando L-cisteína nas concentrações de 6,25 à 100 µM como padrão para determinar a concentração de SH nas amostras em µM.

5.15 Quantificação do estado redox (relação GSH/GSSG)

A relação GSH/GSSG foi avaliada pela quantificação do teor de GSH e GSSG (Hissin e Hilf, 1976). Na reação de GSH e GSSG foram utilizados homogenato de tecido (50 e 100 µg de proteína, respectivamente) e o-ftalaldeído (1 mg mL⁻¹; sonda fluorescente). Para o ensaio GSH o tampão usado continha 100 mM NaH₂PO₄ (pH = 8,0) e 5 mM EDTA, e para o ensaio de GSSG foi utilizado 100 mM NaOH adicionado com *N*-etilmaleimida (NEM), um bloqueador de grupo tiol para evitar a interferência do GSH. A fluorescência foi monitorada em um leitor de placa (Tecan Infinite 200 pro) com excitação 350 nm e emissão 420 nm. Uma curva analítica baseada em concentrações conhecidas de 40 à 1600 nM de GSH e de GSSG foi empregada para determinar as concentrações desses biomoléculas nas amostras.

5.16 Peroxidação lipídica (MDA)

A técnica colorimétrica foi utilizada para determinar substâncias reativas tiobarbitúricas (Buege e Aust, 1978). Um total de 450 µg de proteína do homogenato de tecido foi adicionado a 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) à 3 M e agitado por 1 min. Em seguida, 200 µL de Tris-HCl à 10 mM (pH = 7,4) foram adicionados ao material, agitados por 1 min e centrifugados à 1180×g por 10 min à 4 °C. O sobrenadante coletado

(450 μL) foi misturado com ácido tiobarbitúrico à 0,73% (m/v) (450 μL), o qual reage com os produtos de lipoperoxidação para formar um composto de cor rosa. Assim, tal mistura foi incubada por 15 min à 100 °C e depois resfriada. Finalmente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1900i) à 535 nm. Os resultados foram expressos em mM mg^{-1} proteína, visto que, o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) é de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.17. Produtos da oxidação de proteínas (LPO)

A quantificação de produtos de carbonilação de proteínas foi realizada utilizando a reação com 2,4-difenilhidrazona (DNPH) (Zanatta et al., 2013). Para a quantificação é necessário dividir em dois grupos para cada amostra sendo eles o grupo controle e o grupo de reação; para ambos utiliza-se 100 μL do homogenato de tecido. A diferença entre os grupos é que para o grupo controle se utiliza 400 μL de HCl 2,5 M e para grupo de reação se utiliza 400 μL de DNPH 10 mM (solubilizado em HCl 2,5 M), a partir dessa etapa o procedimento é igual para todos os grupos. Incuba-se os tubos em temperatura ambiente por 1h (agitar a cada 15 min), em seguida adiciona-se 500 μL de TCA 2 M e agita-se para promover a precipitação das proteínas. As proteínas precipitadas por TCA são então centrifugadas três vezes à $10.000 \times g$ por 10 min à 4 °C e lavadas usando-se uma mistura de etanol e acetato de etila (1:1 v/v). Por fim as amostras são ressuspensas em uma solução de guanidina 6 M, centrifugada à 10.000 g por 10 min à 4 °C e o sobrenadante é coletado e utilizado para se efetuar a leitura. A absorbância foi então medida à 370 nm em um leitor de placa (Tecan Infinite 200 pro) e os resultados foram expressos em pmol mg^{-1} proteína (Reznick & Packer, 1994).

5.18. Análise de mercúrio total nos tecidos

Os procedimentos experimentais utilizaram reagentes de pureza analítica da Sigma-Aldrich (EUA) ou Merck (Alemanha). Para o preparo das soluções, foi utilizada água ultrapura (condutividade $< 0,1 \text{ mS cm}^{-1}$) de um purificador Master System MS2000 (Gehaka, Brasil). As soluções de referência de Hg(II) utilizadas na curva analítica foram preparadas a partir de diluições sequenciais da solução padrão de mercúrio inorgânico (1000 mg L^{-1} , rastreabilidade Specsol® 92786-62-4, NIST, EUA). A determinação de mercúrio total foi realizada com solução de KBr (100 mM) e KBrO_3 (17 mM). Em água

deionizada, o excesso de bromo foi eliminado com ácido ascórbico 12% (m/v) (Oliveira et al., 2021; Silva et al., 2022).

O procedimento de mineralização das amostras foi realizado em sistema de digestão fechado utilizando micro-ondas de alta pressão, modelo ETHOS ONE (Milestone, Sorisole, Itália), equipado com 10 rotores (SK-10), com vaso de 100 mL (volume interno), confeccionado em Teflon quimicamente modificado (TFM™). Para digestão de amostras de fígado e cérebro de animais controle e expostos, a massa de cada órgão previamente liofilizado foi adicionada a um recipiente de digestão (220 - 250 mg), 3,5 mL de HNO₃ (14 M), 1,0 mL de solução de peróxido a 30% (v/v) e 3,5 mL de água deionizada. Este sistema foi deixado em repouso por 30 min (etapa de pré-digestão). Em seguida, o balão de digestão foi levado ao equipamento de micro-ondas para digerir a matéria orgânica. A **Tabela 2** mostra a programação utilizada para o processo (Silva-Filho et al., 2021, Santos et al., 2021). Brancos de digestão foram preparados de forma semelhante. A acidez residual máxima foi de 1,86 M, que foi utilizada para compatibilização das soluções em curvas analíticas (Oliveira et al., 2021).

Tabela 2. Programa de aquecimento para digestão em sistema fechado de amostras biológicas por radiação de micro-ondas.

Etapa	Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura (°C)
1	05*	750	TA - 130
2	05**	750	130
3	10*	1000	130 - 180
4	20**	1000	180
5	10**	0	50

TA = temperatura ambiente // *tempo de rampa // **tempo de espera

Para determinação de mercúrio total por CV AFS, 500 µL da mistura (1:1) de KBr / KBrO₃ (100 / 17 mM) foram adicionados a 8 mL do digerido em balão volumétrico de 25 mL e deixados reagir por 5 min. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de ácido ascórbico 12% (p/v) e o volume foi completado até a marca de medição com água deionizada.

As determinações de mercúrio total foram realizadas usando um sistema CV AFS (PSA 10.025 Millennium Merlin Instrument, www.psanalytical.com). O vapor de Hg⁰ foi gerado através da redução química do mercúrio inorgânico com SnCl₂·2H₂O e transportado para um separador gás-líquido por um fluxo de argônio (0,25 L min⁻¹). A umidade do gás carreador foi removida por um dispositivo Perma Purer®, reduzindo a interferência pela extinção da fluorescência do Hg com um gás secador (2,5 L min⁻¹). As concentrações de mercúrio foram determinadas usando um método de calibração externa

baseado em medições de fluorescência de altura de pico de 10 a 2000 ng L⁻¹. As condições instrumentais do CV AFS, taxas de fluxo e todas as concentrações de reagentes usadas para determinação de mercúrio total em todas as amostras biológicas estão resumidas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Condições de operação do CV AFS para determinação de Hg total.

Parâmetros	Condições
Comprimento de onda (nm)	253,7
Modo de medida	Peak height
Replicatas	3
Tempor de atraso (s)	15
Tempo de análise (s)	40
Tempo de lavagem da memória (s)	40
Ganho	10
Taxa de fluxo do gás de arraste (mL min ⁻¹)	250
Taxa de fluxo do secador (L min ⁻¹)	2,5
Taxa de fluxo do transportador (mL min ⁻¹)	9
Taxa de fluxo da amostra (mL min ⁻¹)	9
Taxa de fluxo do SnCl ₂ (mL min ⁻¹)	4,5
SnCl ₂ % (m/v)	2
HCl % (v/v)	20
KBr / KBrO ₃ (mM)	100 / 17
Ácido ascórbico % (m/v)	12

5.19. Análise estatística

Os dados representam a média ± erro padrão da média. As comparações estatísticas foram realizadas por teste t de Student com 95% de confiança ($\alpha = 0,05$). As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 8.0 e a construção dos gráficos utilizou o software Origin 9.0.

6. RESULTADOS e DISCUSSÃO

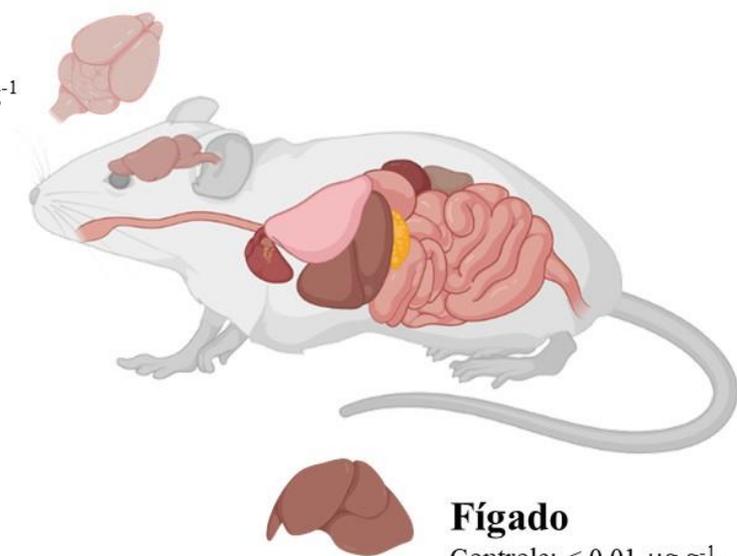
Inicialmente, quantificamos a distribuição de Mercúrio derivada do TM que mostra uma diferença >100% em todos os órgãos quando comparado com controle (**Figura 11**) isso porque o grupo controle obteve resultados menores que $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$. O fígado, nesse caso, foi o órgão que mais acumulou mercúrio e isso pode ser consequência do processo chamado de excreção hepatobiliar, ou seja, eliminação de drogas no tecido, que é demorado. Oliveira e colaboradores (2018) mostraram que em 24 h de exposição ao cloreto de mercúrio em ratos, o fígado consegue eliminar apenas metade do que foi acumulado. Já o cérebro comparado com o fígado foi o tecido que menos acumulou mercúrio, mas isso ocorre porque o mercúrio orgânico no cérebro é eliminado rapidamente, principalmente na forma de EtHg^+ (Rodrigues et al., 2010). Alguns estudos sobre esse processo de bioacumulação de espécies de mercúrio em órgãos também descreveram o mesmo comportamento, isto é, menor acumulação no sistema nervoso (Zareba et al., 2007; Orct et al., 2006).

Figura 11. Quantificação de mercúrio total nos órgãos dos animais SHR após uma exposição aguda ao TM ($n = 6$).

Cérebro

Controle: $< 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$

Exposto: $2,15 \pm 0,25 \mu\text{g g}^{-1}$



Fígado

Controle: $< 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$

Exposto: $13,18 \pm 1,09 \mu\text{g g}^{-1}$

Fonte: Autoral, 2023.

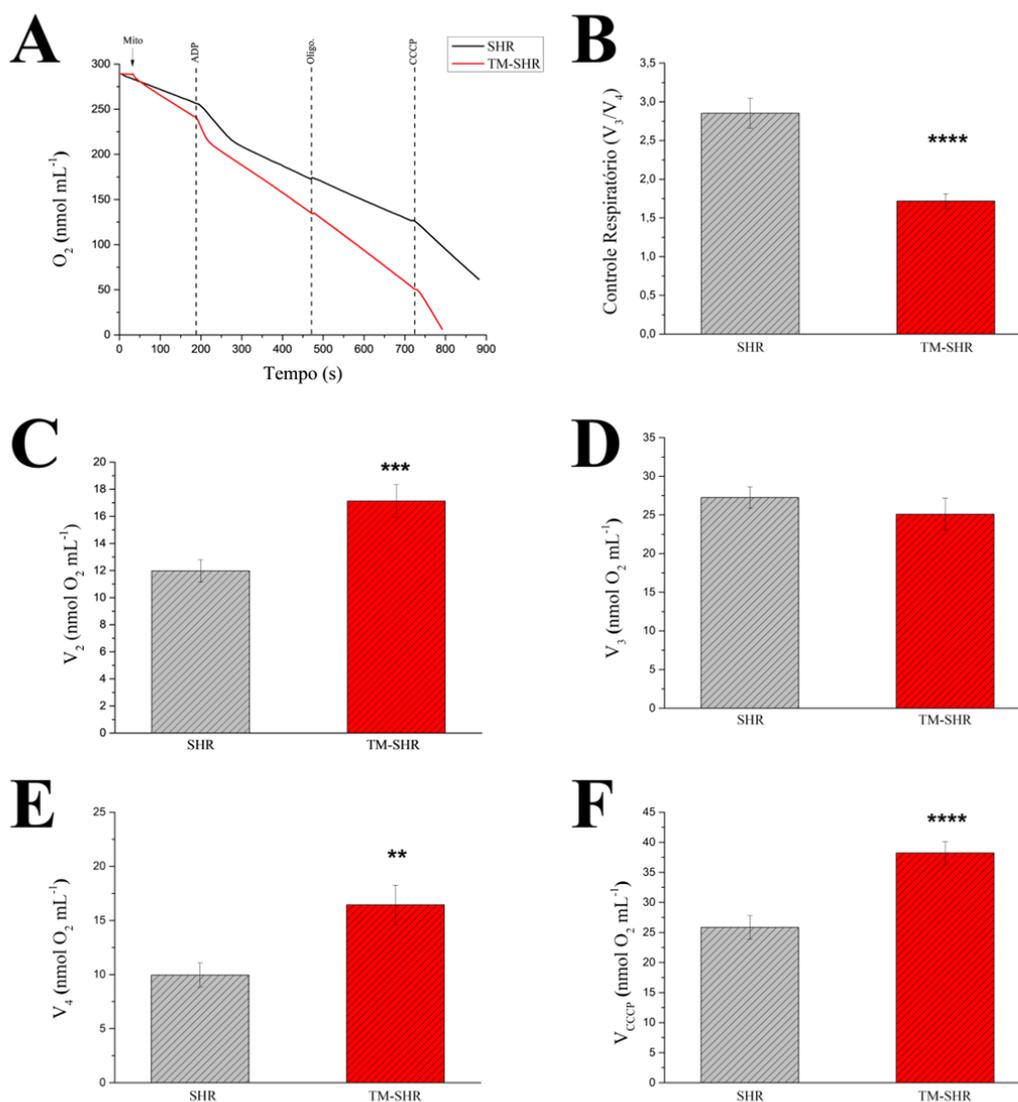
Como o experimento de respiração mitocondrial fornece uma gama de resultados e o mesmo foi feito para o fígado e para o cérebro, os resultados serão descritos isoladamente para cada órgão, contudo os demais resultados referentes a integridade mitocondrial e

marcadores de estresse oxidativo serão expressos de forma conjunta. O primeiro dado que obtivemos foi o da respiração mitocondrial, onde o controle respiratório é um reflexo quanto ao funcionamento da CTE. Para as mitocôndrias de fígado de rato (MFR) houve uma redução significativa de 40% para os animais SHR expostos ao TM ($p < 0,0001$) quando comparados com os animais SHR controle, ou seja, que receberam solução salina (**Figuras 12A-B**). No entanto, fazendo uma busca na literatura notamos que o CR para ratos Wistar, que são animais normotensos, estaria em torno de 6,0 (Nunes et al., 2019) enquanto que para os ratos SHR o CR seria 2,8; como demonstrado na **Figuras 12A-B**. Constatamos assim que a hipertensão afeta o funcionamento da CTE; junto a isso, a exposição ao TM agrava ainda mais esses danos causados a mitocôndria, sendo então um aditivo em tal disfunção mitocondrial.

Ao destrincharmos esses dados iniciais podemos avaliar cada condição separadamente do traçado, ou seja, as velocidades de consumo de oxigênio como reflexo de cada etapa da CTE como já foram explicadas anteriormente e assim entender em qual das etapas está sendo gerado esse comprometimento na cadeia. Para as mitocôndrias hepáticas, a V_2 que reflete a respiração basal está maior em 43% no grupo exposto quando comparado aos controle (**Figura 12C**), $p = 0,0009$, sendo um reflexo direto de que as mitocôndrias dos animais que receberam TM estão consumindo mais oxigênio, porém utilizando com uma menor eficiência. Como não existe muitos estudos referente a mitocôndrias hepáticas de animais SHR, a discussão dos resultados será baseada nos estudos dos demais órgãos como o descritos por Lee e colaboradores (2014) que obteve resultados semelhantes em um estudo em que os autores caracterizaram a atividade mitocondrial de rim em animais SHR onde eles sugerem que existe uma atividade maior nos complexos da CTE, porém a eficiência dessa atividade é prejudicada. Dando continuidade, a V_3 que reflete o funcionamento da ATP sintase, nos animais TM-SHR e nos animais SHR controle está semelhante, ou seja, para ambos os grupos a produção de ATP não é afetada (**Figura 12D**), $p = 0,4059$, corroborando com a ineficiência da CTE mostrada acima. Porém, a V_4 na presença de oligomicina foi estatisticamente diferente no grupo exposto quando comparado com o controle, demonstrando um aumento de 65% (**Figura 12E**), $**p = 0,0037$. Tal efeito pode ser um indicativo de mitocôndrias desacopladas, que ocorre quando os prótons que deveriam passar pela ATP sintase acabam vazando para a matriz mitocondrial através de alguma outra região (Cecatto et al., 2020) ou por danos na membrana da mitocôndria, visto que, o mercúrio já foi associado a danos membranares tanto em células neuronais (Hossain et al., 2020) como também em mitocôndria de espermatozoides (Kushawaha et al., 2021).

Acompanhando a mesma alteração, a V_{cccp} foi maior para o grupo exposto sendo 48% mais elevado que no grupo controle (**Figura 12F**), **** $p < 0,0001$, nessa etapa foi adicionado um desacoplador químico (CCCP) que promove o funcionamento da CTE sem depender da ATP sintase, acelerando a cadeia, deixando em sua velocidade máxima de consumo de oxigênio. Essa função está atrelada a capacidade que o CCCP tem de se ligar aos prótons do espaço intermembranar e transportá-los para matriz mitocondrial atravessando a membrana interna. Em nossos dados, o aumento significativo na etapa de desacoplamento da CTE é um efeito aditivo ao *leak* de prótons visto na V_4 , além de demonstrar uma limitação da ATP sintase no transporte dos prótons para matriz mitocondrial. Para corroborar com nossos achado um estudo realizado por Hickey e colaboradores (2009) caracterizando seu perfil funcional e morfológico de mitocôndria de coração, e perceberam que essas mitocôndrias tinham a V_{cccp} aumentada ao qual eles descrevem que pode ser tanto um problema na ATP sintase como também um problema no ANT, e a via que os autores sugerem é que existe uma diminuição na quantidade de ADP na matriz mitocondrial o que compromete o funcionamento da CTE aumentando a produção de EROs, levando a uma condição de função mitocondrial prejudicada e deterioração do coração hipertensivo.

Figura 12. Respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de animais SHR expostos ao TM. A) Figura representativa do consumo de oxigênio pelas MFR. B-E) Velocidades de consumo de oxigênio nos estados respiratórios. MFR 0,5 mg L⁻¹ (5 mM substrato para complexo I, 200 μM EGTA, 200 μM ADP, 1 μg mL⁻¹, 1 μM CCCP). Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística utilizando Teste t para amostras não pareadas, dados representados como média ± erro, *n* = 10.

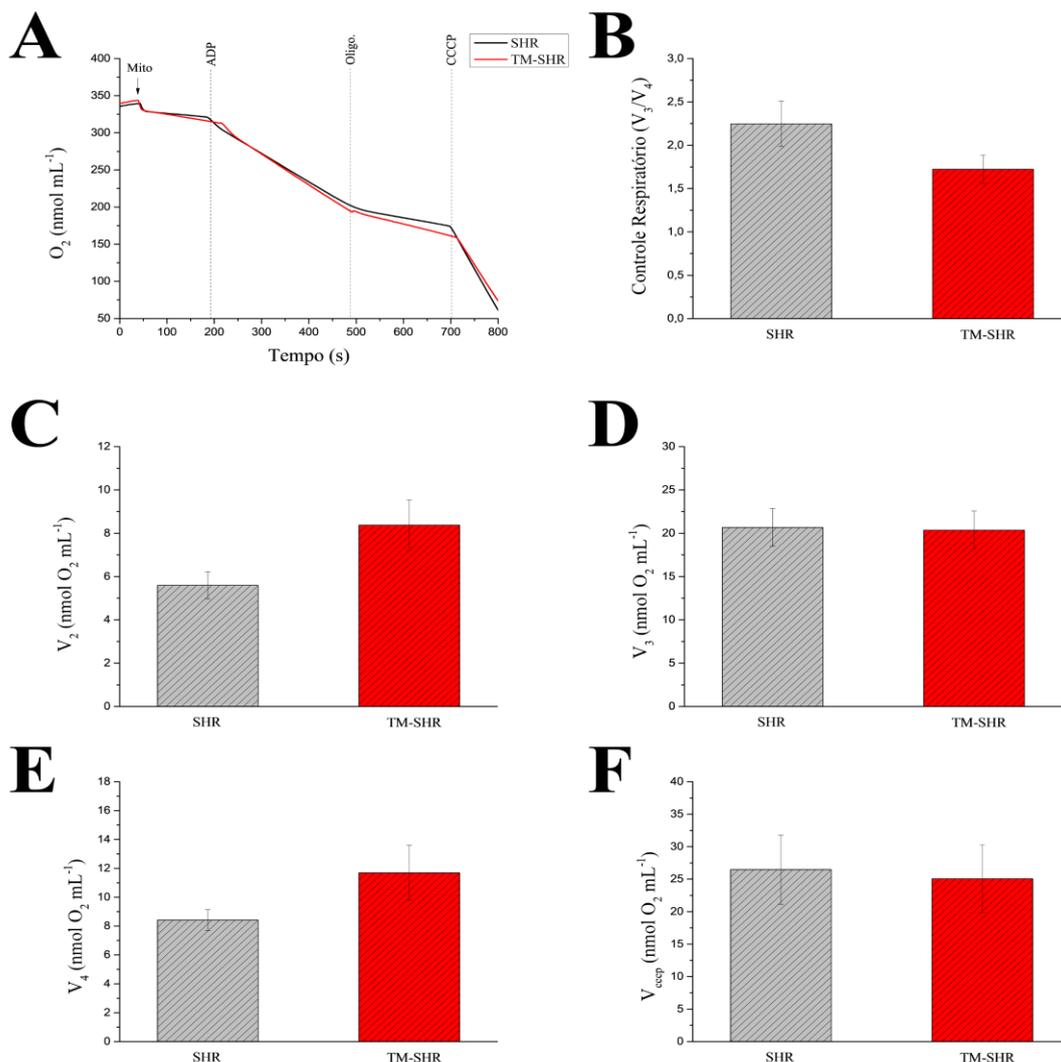


Fonte: Autoral, 2023.

Examinado os dados referentes a respiração das mitocôndrias de cérebro de rato (MCR) os resultados de respiração mitocondrial nos SHR tratados ou não com TM não foram diferentes. O controle respiratório demonstrou uma redução de 23% para o grupo TM-SHR (**Figuras 13A-B**), *p* = 0,1001 quando comparado ao SHR. Ao examinarmos as velocidades de respiração, a V₂ apresentou uma tendência de aumento no grupo exposto em quase 50% quando comparado ao SHR, entretanto não houve diferença estatística

(**Figura 13C**), $p = 0,0506$. Já a média da V_3 é igual para ambos os grupos, exposto e controle (**Figura 13D**), $p = 0,9225$. A V_4 também apresentou uma tendência de aumento no grupo TM-SHR em aproximadamente 39%, quando comparado ao SHR, entretanto não houve diferença estatística (**Figura 13E**), $p = 0,1182$. Por fim, a V_{cccp} apresentou o mesmo perfil que a V_3 , sendo semelhante para ambos os grupos (**Figura 13F**), $p = 0,8527$. Com isso, podemos afirmar que o tratamento agudo não afeta o funcionamento da CTE no cérebro quando expostos ao TM, o que não era esperado, já que todos os estudos publicados na literatura referente a exposição a mercúrio levam a danos na bioenergética mitocondrial em tecido nervoso. Sendo assim, essa ausência no estado da arte referente a exposição aguda a espécies de mercúrio em doses baixas faz com que esses dados sejam inéditos dentro desse âmbito.

Figura 13. Respiração de mitocôndrias isoladas de cérebro de animais SHR expostos ao TM. A) Figura representativa do consumo de oxigênio pelas MCR. B-E) Velocidades de consumo de oxigênio nos estados respiratórios. MCR 0,5 mg L⁻¹ (5 mM substrato para complexo I, 200 μM EGTA, 200 μM ADP, 1 μg mL⁻¹, 1 μM CCCP). Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística utilizando Teste t para amostras não pareadas, dados representados como média ± erro, *n* = 10.



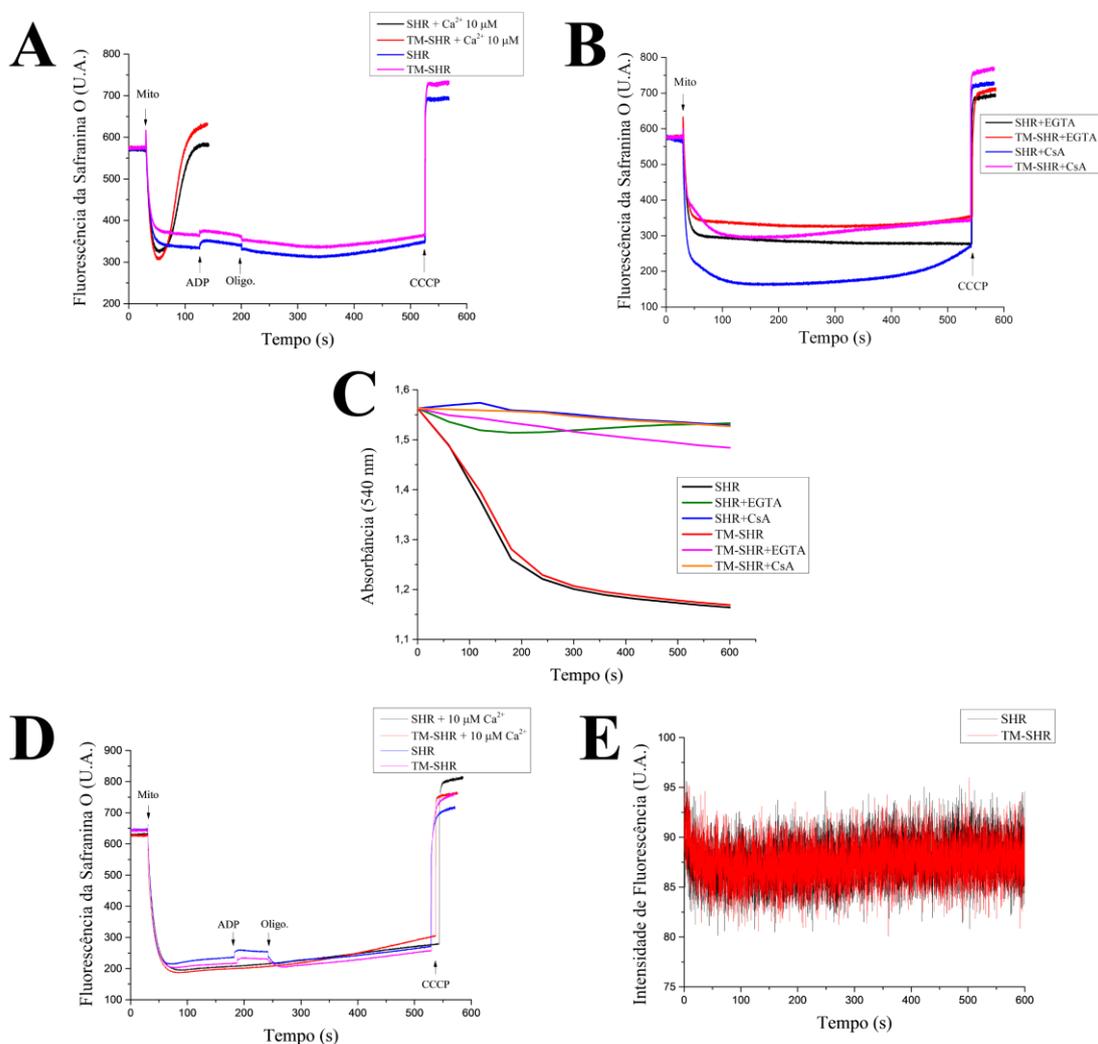
Fonte: Autoral, 2023.

No âmbito de integridade mitocondrial foi medido o potencial de membrana e o inchamento. As MFR demonstraram perda rápida no potencial de membrana, visto que, para ambos os grupos o potencial foi extinguido por volta de 2 min o que não é comum pois ao fazermos um comparativo com dados na literatura de animais normotensos, onde o potencial de membrana MFR geralmente é mantido por pelo menos 10 min até ser perdido (Nunes et al., 2019); além disso, a mitocôndria isolada dos dois grupos também inchou igualmente. Tais processos de perda de potencial de membrana e inchamento

podem ser uma consequência da abertura do poro de TPM, visto que tal evento foi comprovado em nossos achados pela utilização dos inibidores desse poro, como a CsA e o EGTA, que levaram a uma proteção total, porém os dados não foram diferentes estatisticamente quando comparamos os SHR-TM com SHR controle (**Figura 14A-C**). Com isso pode-se afirmar que para as MFR de animais SHR ocorre a perda de integridade. Até onde se sabe, esse é o primeiro relato do envolvimento de TPM em mitocôndrias isoladas de fígado de animais hipertensos, contudo, a exposição ao TM não foi capaz de agravar o quadro de perda de integridade mitocondrial nesses animais, ou seja, a abertura do poro de TPM é proveniente da patologia pré estabelecida.

A integridade mitocondrial do cérebro desses animais também foi avaliada utilizando os métodos de potencial e inchamento, porém os resultados demonstram que a integridade das mitocôndrias assim como no fígado, não foi afetada no grupo controle e nem no grupo exposto ao TM (**Figura 14D-E**). Fazendo uma busca na literatura não foi possível achar estudos com dados semelhantes ao nosso, dessa forma, presumimos que esse é o primeiro relato onde mostra que o mercúrio não afeta a integridade mitocondrial em um tratamento agudo. Além disso, esses dados estão de acordo com os dados de funcionalidade supracitados, ou seja, como o TM não afeta a funcionalidade também não afeta a integridade já que ambos os eventos estão relacionados diretamente.

Figura 14. Marcadores de integridade mitocondrial em animais SHR expostos ao TM. **A)** Potencial de membrana monitorado pela fluorescência da Safranina O para MFR. **B)** Inibidores do poro no potencial de membrana de MFR. **C)** Inchamento mitocondrial para MFR. **D)** Potencial de membrana monitorado pela fluorescência da Safranina O para MCR. **E)** Inchamento mitocondrial para MCR. Foi utilizado MCR 0,5 mg L⁻¹, 5 mM substrato para o complexo I, 5 μM de Safranina O, 1 μM de CsA, 200 μM de EGTA. Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata, *n* = 10.

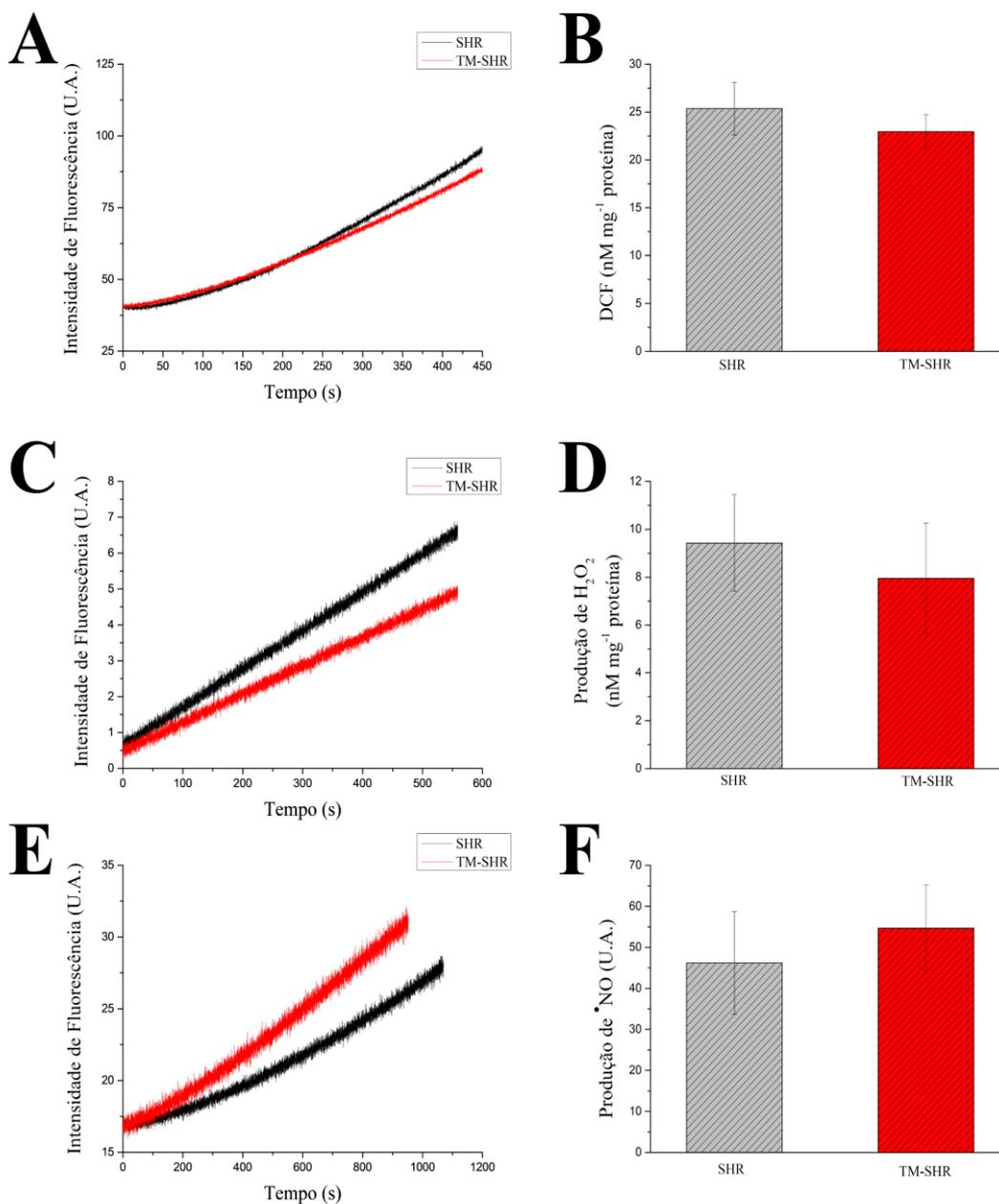


Fonte: Autoral, 2023.

Dando continuidade aos experimentos sobre as consequências da exposição ao TM, fomos avaliar alguns marcadores de estresse oxidativo, os quais podem ser divididos em produção de EROs e marcadores secundários de oxidação. A produção de EROs é quantificada em tempo real com a organela funcional, ou seja, em mitocôndrias isoladas funcionais; enquanto os marcadores secundários são produtos de oxidação formados a partir da reação entre as EROs e as biomoléculas, esses são quantificados no tecido como um todo. Iniciamos nossa avaliação com a produção de EROs e o óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$).

Encontramos que nas MFR do animal SHR tratado com o TM ocorreu uma tendência de menor produção de EROs totais (**Figura 15A-B**, $p = 0,4591$) e de H_2O_2 (**Figura 15C-D**, $p = 0,6462$) e uma tendência de uma produção maior de $\bullet NO$ (**Figura 15E-F**, $p = 0,6082$). Apesar dos dados não serem significativos, uma possível explicação para esse quadro é que a produção do $\bullet NO$ pode desempenhar um papel de modulador, ou seja, o $\bullet NO$ pode atuar como sinalizador indicando ao organismo do animal como lidar com as condições de estresse (Anavi et al., 2020). Contudo, pode-se afirmar que a exposição a doses baixas de TM não afeta a produção de $\bullet NO$.

Figura 15. Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em mitocôndrias isoladas de fígado de animais SHR expostos ao TM. **A)** Traçado representativo da produção de EROs totais por DCF. **B)** Quantificação de EROs totais em MFR. **C)** Traçado representativo da produção de H₂O₂ por Amplex Red. **D)** Quantificação de H₂O₂ em MFR. **E)** Traçado representativo da produção de [•]NO por DAF. **F)** Quantificação de [•]NO em MFR. Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística utilizando Teste t para amostras não pareadas, dados representados como média ± erro, *n* = 10.

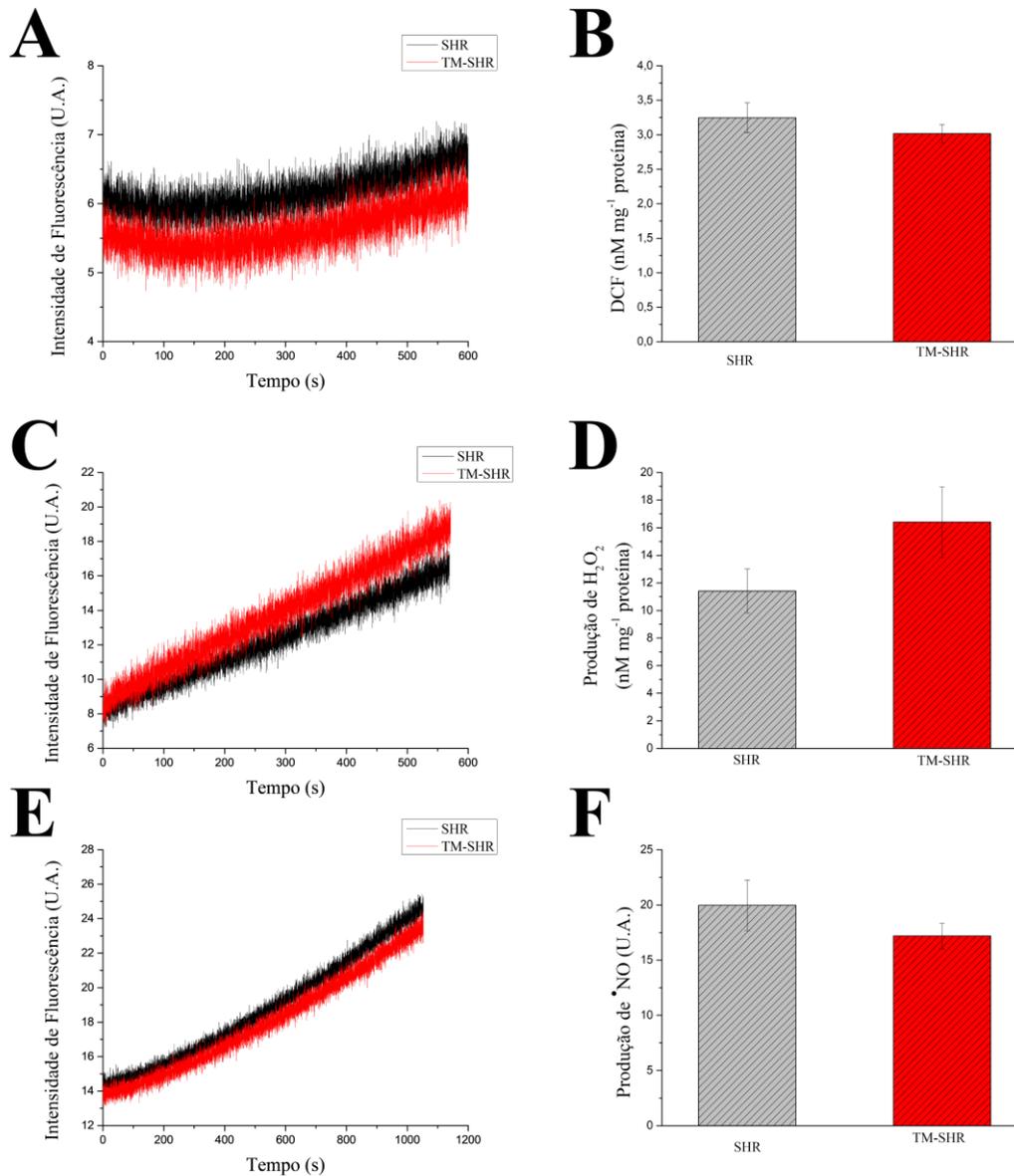


Fonte: Autoral, 2023.

Por outro lado, ao examinarmos a geração mitocondrial de EROS no cérebro temos que a produção de EROs totais foi semelhante para os dois grupos (**Figura 16A-B**, *p* = 0,3762). Nessa mesma linha, ao examinarmos a produção de H₂O₂ foi

tendenciosamente maior em $\approx 44\%$ para o grupo TM-SHR quando comparado ao grupo controle (**Figura 16C-D**, $p = 0,1085$), entretanto não houve diferença estatística. Quando verificamos a produção mitocondrial de $\bullet\text{NO}$, detectamos que tal espécie teve uma tendência de produção diminuída no grupo exposto quando comparado com o grupo controle (**Figura 16E-F**, $p = 0,2969$), entretanto, da mesma forma que na produção de H_2O_2 não houve diferença estatística. Com isso, não dá para considerar que o mercúrio derivado do TM em um tratamento agudo promova a produção exacerbada de espécies reativas, sejam elas de oxigênio ou de nitrogênio. Porém, o $\bullet\text{NO}$ no cérebro tem um papel de neurotransmissor (Chachlaki et al., 2020) então essa tendência na diminuição da produção dessa espécie nos animais TM-SHR pode ser um indicativo de que o TM pode estar causando neurotoxicidade nesse sistema.

Figura 16. Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em mitocôndrias isoladas de cérebro de animais SHR expostos ao TM. **A)** Traçado representativo da produção de EROs totais por DCF. **B)** Quantificação de EROs totais em MCR. **C)** Traçado representativo da produção de H₂O₂ por Amplex Red. **D)** Quantificação de H₂O₂ em MCR. **E)** Traçado representativo da produção de [•]NO por DAF. **F)** Quantificação de [•]NO em MCR. Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística utilizando Teste t para amostras não pareadas, dados representados como média ± erro, *n* = 10.



Fonte: Autoral, 2023.

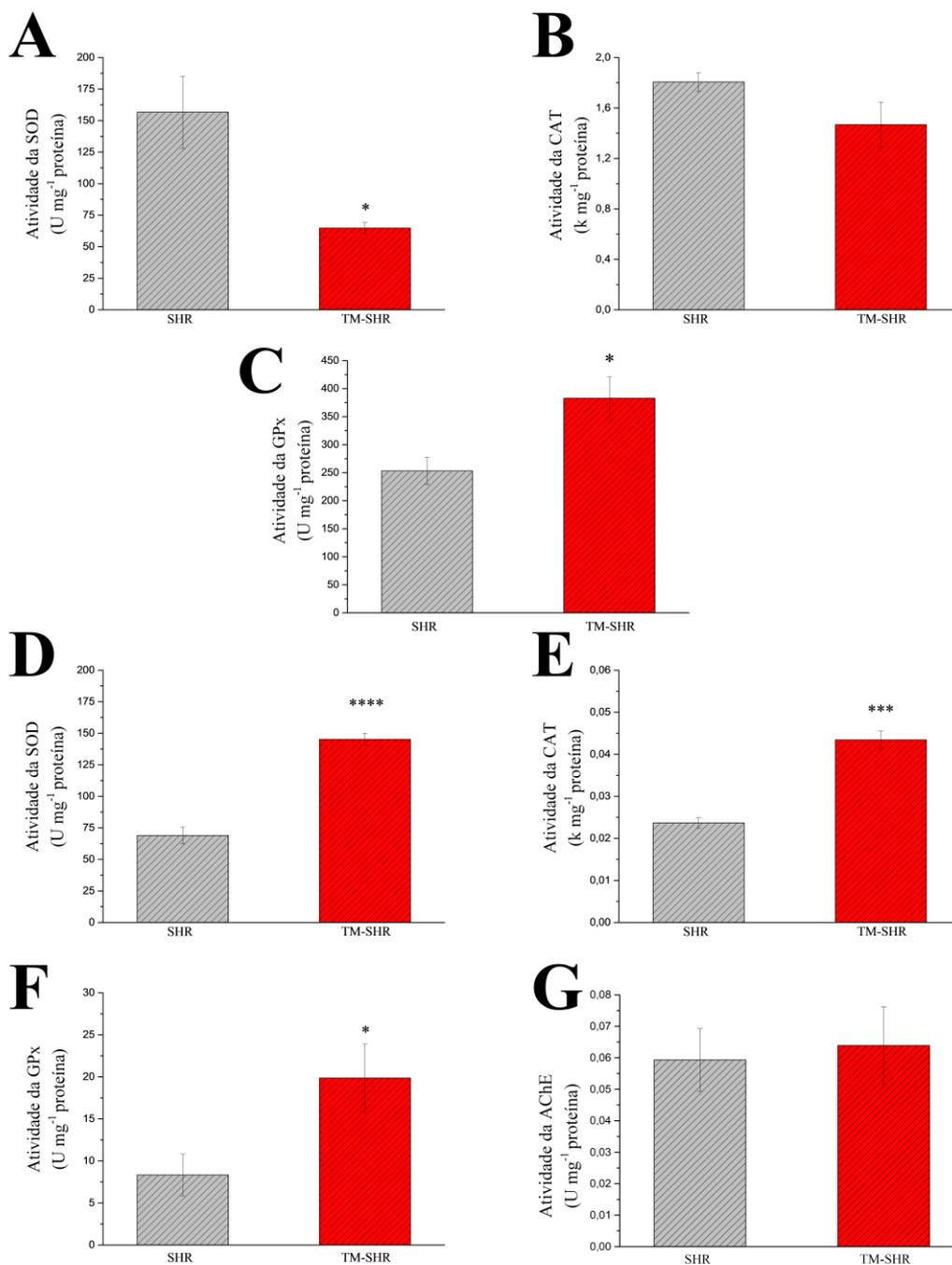
Posteriormente avaliamos as enzimas antioxidantes no fígado dos animais SHR tratados ou não com TM. Verificamos a ocorrência de diminuição nas atividades de tais enzimas, onde a SOD apresentou 59% de redução (**Figura 17A**) bem como a CAT 19% (**Figura 17B**) quando comparado com o controle, no entanto apenas a SOD apresentou

valores de $p < \alpha$ ($*p = 0,0134$). Benov e colaboradores (1990) descreve que a exposição ao mercúrio pode desencadear a inativação das enzimas SOD e CAT em órgãos como fígado e rim, com isso, é possível que a diminuição na atividade dessas enzimas seja decorrente da exposição ao TM. Por outro lado, a atividade da GPx aumentou significativamente no grupo exposto em 51% (**Figura 17C**, $*p = 0,0166$). Nessa temática, Bando e colaboradores (2005) realizaram um estudo crônico expondo ratos Wistar a doses baixas de cloreto de mercúrio, nos resultados utilizando o fígado de tais animais eles descreveram que a atividade da GPx aumentou de forma dependente da dose, como um mecanismo de defesa, corroborando com os nossos dados.

Quando essas enzimas são avaliadas no cérebro, suas atividades são aumentadas tanto para SOD com um aumento de mais de 100% (**Figura 17D**), a CAT aumentando 83% (**Figura 17E**) e a GPx com 100% de aumento (**Figura 17F**) para o grupo TM-SHR comparadas com o grupo SHR; ambas com valores de $p < \alpha$ ($****p < 0,0001$, $***p = 0,0002$, $*p = 0,0370$, respectivamente), nesse caso a atividade aumentada pode ser uma resposta a duas condições. A primeira delas é a sensibilidade aumentada do cérebro ao mercúrio já que as espécies orgânicas de mercúrio conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e se acumulam de forma persistente nesse tecido (Kern et al., 2020), enquanto que a segunda trata-se de uma resposta homeostática das enzimas, ou seja, como a quantidade de mercúrio no tecido foi menor o organismo conseguiu se adaptar e se proteger de possíveis danos que poderia vir surgir com essa exposição e acúmulo de mercúrio.

Ao avaliarmos a neurotoxicidade a partir da atividade da acetilcolinesterase, percebemos que não há diferença entre os grupos (**Figura 17G**, $p = 0,7773$), ou seja, supomos que o período de exposição seja curto para presenciar danos sinápticos no sistema colinérgico. Moraes-Silva e colaboradores (2014) também avaliou a atividade desta enzima no cérebro de ratos Wistar, e relataram que a atividade só é afetada nos animais jovens (13 dias de vida) e não causa alteração nos animais adultos (33 dias de vida) quando expostos ao cloreto de mercúrio, em uma dose 10× maior que a usada nesse estudo, mostrando que essa enzima é mais sensível enquanto os animais ainda estão em desenvolvimento.

Figura 17. Atividade de enzimas de animais SHR expostos ao TM. **A)** Atividade da SOD no fígado (SHR: $156,60 \pm 28,71$; TM-SHR: $64,75 \pm 4,35$). **B)** Atividade da CAT no fígado (SHR: $1,806 \pm 0,073$; TM-SHR: $1,468 \pm 0,179$). **C)** Atividade da GPx no fígado (SHR: $253,1 \pm 24,4$; TM-SHR: $382,8 \pm 37,9$). **D)** Atividade da SOD no cérebro (SHR: $69,01 \pm 6,58$; TM-SHR: $145,20 \pm 4,89$). **E)** Atividade da CAT no cérebro (SHR: $0,024 \pm 0,001$; TM-SHR: $0,043 \pm 0,002$) **F)** Atividade da GPx no cérebro (SHR: $8,33 \pm 2,46$; TM-SHR: $19,85 \pm 4,05$). **G)** Atividade da AChE no cérebro (SHR: $0,059 \pm 0,009$; TM-SHR: $0,063 \pm 0,012$). Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística utilizando Teste t para amostras não pareadas, dados representados como média \pm erro, $n = 10$.



Fonte: Autoral, 2023.

Os outros marcadores secundários como tióis totais, que têm sua importância atrelada à afinidade do mercúrio por enxofre e seus derivados, o MDA que é produto da peroxidação lipídica, e a razão GSH/GSSG que faz parte do sistema da glutatona rico em enxofre, poderiam ser afetados negativamente com a exposição ao TM, como já foi relatado anteriormente (Sales et al., 2022; Öztürk et al., 2022; James et al., 2005). Entretanto a exposição aguda ao TM não foi o suficiente para observar alterações nesses parâmetros. Quando avaliados no fígado, os tióis totais e a razão GSH/GSSG foram iguais para ambos os grupos, enquanto o MDA demonstrou uma tendência de aumento de 15% no grupo exposto, porém nenhum desses parâmetros foi significativo (**Tabela 2**, $p = 0,7911$, $p = 0,5964$, $p = 0,4063$, respectivamente). Estudos da literatura mostram resultados semelhantes aos descritos acima onde derivados de mercúrio em baixas concentrações não são capazes de alterar ou aumentar os níveis desses marcadores de estresse (Kumari et al., 2022).

No cérebro algumas modificações foram encontradas, como uma propensão a redução nos grupos tióis totais de 46% (**Tabela 2**, $p = 0,1887$), que provavelmente é uma consequência da exposição ao TM, visto que o mercúrio tem grande afinidade por enxofre reduzido. Um outro parâmetro avaliado foi a razão GSH/GSSG que reflete a modulação do status redox, a qual foi igual tanto para o grupo TM-SHR quanto para o grupo SHR (**Tabela 2**, $p = 0,7861$), ou seja, uma possível explicação é que a dose baixa de TM não foi capaz de afetar os níveis GSH mantendo um equilíbrio entre sua forma reduzida e oxidada.

Indo nessa linha, o conteúdo de MDA também apresentou uma tendência de redução em torno de 41% quando comparado com o controle (**Tabela 2**, $p = 0,2209$), tal achado pode ser decorrente de respostas adaptativas do cérebro, as mesmas que foram citadas anteriormente, corroborando com os dados de produção de EROs e aumento na atividade das enzimas antioxidantes, entretanto nos dois casos não diferem estatisticamente entre os grupos exposto e controle. Por fim, o teor de LPO também não teve diferença nem para o fígado e nem para o cérebro quando comparamos o grupo SHR exposto com o grupo SHR controle (**Tabela 2**, $p = 0,2619$ e $p = 0,8529$ respectivamente). Artigos de revisão como os do Garvarino e colaboradores (2015) descrevem como o cérebro é capaz de neutralizar substâncias que os autores chamam de estressores oxidativos, ou seja, produtos de oxidação gerados pela reação das EROs e as biomoléculas; isso se dá pela própria sinalização das EROs quando produzidas moderadamente estimulando a produção de antioxidantes, regulando positivamente a atividade das enzimas antioxidantes e indução da autofagia.

Tabela 4. Quantificação em $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína dos marcadores secundários nos tecidos de animais SHR expostos a TM de forma aguda.

Marcadores secundários	Fígado		Cérebro	
	SHR	TM-SHR	SHR	TM-SHR
Tióis totais	$32,3 \pm 2,8$	$33,4 \pm 2,8$	$21,0 \pm 3,9$	$11,3 \pm 5,3$
GSH/GSSG	$0,70 \pm 0,07$	$0,79 \pm 0,08$	$1,02 \pm 0,12$	$1,09 \pm 0,21$
MDA	$1,41 \pm 0,20$	$1,63 \pm 0,34$	$2,87 \pm 0,84$	$1,68 \pm 0,32$
LPO	129 ± 11	$98,5 \pm 20,4$	$152,6 \pm 47,7$	168 ± 62

Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística utilizando Teste t para amostras não pareadas, dados representados como média \pm erro, $n = 10$. Fonte: autoral, 2023.

7. CONCLUSÃO

Em resumo, nossos achados sugerem que a exposição aguda ao TM em animais pré hipertensos contribui negativamente para os danos de funcionalidade da CTE sendo responsável pelo desacoplamento da mesma. Contudo, o TM não causa danos sistêmicos no metabolismo energético de animais SHR e nem perda de integridade mitocondrial. Porém, em tratamentos agudos é comum observar uma resposta adaptativa em animais principalmente quando são expostos a concentrações baixas de um contaminante e por curto período.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas temos os experimentos relacionados ao tratamento crônico de 30 dias com o TM que vem sendo realizada nesse semestre de 2023.1 em animais pré hipertensos com 37 dias de idade, nessa etapa será realizado os mesmos experimentos feitos nesse trabalho. Além disso, será feita também a medição da pressão arterial desses animais, a metabolômica no plasma e, para finalizar, os eritrócitos serão coletados e utilizados para avaliar a parte funcional e estrutural da hemoglobina, proteína mais abundante nesse tipo de célula, como também toda a parte de marcadores de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.

Ahmad S, Mahmood R. Mercury chloride toxicity in human erythrocytes: enhanced generation of ROS and RNS, hemoglobin oxidation, impaired antioxidant power, and inhibition of plasma membrane redox system. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019 Feb;26(6):5645-5657. doi: 10.1007/s11356-018-04062-5.

Anavi S, Tirosh O. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. *Free Radic Biol Med.* 2020 Jan; 146:16-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.411.

Arefieva AS, Kamaeva AG, Krasilshchikova MS. Low doses of mercuric chloride cause the main features of anti-nucleolar autoimmunity in female outbred CFW mice. *Toxicol Ind Health.* 2016 Sep; 32(9):1663-74. doi: 10.1177/0748233715573691.

Assis CR, Castro PF, Amaral IP, Carvalho EV, Carvalho LB Jr, Bezerra RS. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. *Environ Toxicol Chem.* 2010;29(10):2243-8. doi: 10.1002/etc.272.

Assis LHP, Dorighello GG, Rentz T, de Souza JC, Vercesi AE, de Oliveira HCF. In Vivo Pravastatin Treatment Reverses Hypercholesterolemia Induced Mitochondria-Associated Membranes Contact Sites, Foam Cell Formation, and Phagocytosis in Macrophages. *Front Mol Biosci.* 2022 Mar 15;9:839428. doi: 10.3389/fmolb.2022.839428.

Bando I, Reus MI, Andrés D, Cascales M. Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercury chloride oral intoxication. *J Biochem Mol Toxicol.* 2005;19(3):154-61. doi: 10.1002/jbt.20067.

Barregard L, Rekić D, Horvat M, Elmberg L, Lundh T, Zachrisson O. Toxicokinetics of mercury after long-term repeated exposure to thimerosal-containing vaccine. *Toxicol Sci.* 2011 Apr;120(2):499-506. doi: 10.1093/toxsci/kfr009.

Benov LC, Benchev IC, Monovich OH. Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. *Chem Biol Interact.* 1990;76(3):321-32. doi: 10.1016/0009-2797(90)90099-9.

Berne R.M., Levy M.N., Koeppen B.M., Stanton B.A. *Fisiologia*. 5^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, (2004).

Bianchini MC, Gularte COA, Nogara PA, Krum BN, Gayer MC, Bridi JC, Roos DH, Roehrs R, Fachineto R, Pinton S, Ávila DS, Hirth F, Rocha JBT, Puntel RL. Thimerosal inhibits *Drosophila melanogaster* tyrosine hydroxylase (DmTyrH) leading to changes in dopamine levels and impaired motor behavior: implications for neurotoxicity. *Metallomics*. 2019 Feb 20;11(2):362-374. doi: 10.1039/c8mt00268a.

Bisinoti M.C., Jardim W.F. Behavior of methylmercury in the environment. *Química Nova*, 2004; 27(4): 593-600.

Boettcher LB, Abou-Al-Shaar H, Ravindra VM, Horn J, Palmer CA, Menacho ST. Intracranial Epidural Metastases of Adrenal Pheochromocytoma: A Rare Entity. *World Neurosurg*. 2018 Jun;114:235-240. doi: 10.1016/j.wneu.2018.03.126.

Brook RD, Weder AB, Rajagopalan S. "Environmental hypertensionology" the effects of environmental factors on blood pressure in clinical practice and research. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011 Nov; 13(11):836-42. doi: 10.1111/j.1751-7176.2011.00543.x.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6.

Candelise N, Salvatori I, Scaricamazza S, Nesci V, Zenuni H, Ferri A, Valle C. Mechanistic Insights of Mitochondrial Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update on a Lasting Relationship. *Metabolites*. 2022 Mar 9;12(3):233. doi: 10.3390/metabo12030233.

Carneiro MF, Morais C, Small DM, Vesey DA, Barbosa F Jr, Gobe GC. Thimerosal induces apoptotic and fibrotic changes to kidney epithelial cells in vitro. *Environ Toxicol*. 2015 Dec;30(12):1423-33. doi: 10.1002/tox.22012.

Carneiro MF, Oliveira Souza JM, Grotto D, Batista BL, de Oliveira Souza VC, Barbosa F Jr. A systematic study of the disposition and metabolism of mercury species in mice after exposure to low levels of thimerosal (ethylmercury). *Environ Res*. 2014 Oct;134:218-27. doi: 10.1016/j.envres.2014.07.009.

Carocci A, Rovito N, Sinicropi MS, Genchi G. Toxicidade do mercúrio e efeitos neurodegenerativos. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2014;229:1-18. DOI: 10.1007/978-3-319-03777-6_1.

Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*. 2000 Jan 25;101(3):329-35. doi: 10.1161/01.cir.101.3.329.

Cecatto C, Amaral AU, Roginski AC, Castilho RF, Wajner M. Impairment of mitochondrial bioenergetics and permeability transition induction caused by major long-chain fatty acids accumulating in VLCAD deficiency in skeletal muscle as potential pathomechanisms of myopathy. *Toxicol In Vitro*. 2020 Feb;62:104665. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104665.

Chachlaki K, Prevot V. Nitric oxide signalling in the brain and its control of bodily functions. *Br J Pharmacol*. 2020 Dec; 177(24):5437-5458. doi: 10.1111/bph.14800.

Chan SHH, Chan JYH. Mitochondria and Reactive Oxygen Species Contribute to Neurogenic Hypertension. *Physiology (Bethesda)*. 2017 Jul;32(4):308-321. doi: 10.1152/physiol.00006.2017.

Chang HT, Liu CS, Chou CT, Hsieh CH, Chang CH, Chen WC, Liu SI, Hsu SS, Chen JS, Jiann BP, Jan CR. Thimerosal-induced cytosolic Ca²⁺ elevation and subsequent cell death in human osteosarcoma cells. *Pharmacol Res*. 2005 Oct;52(4):328-33. doi: 10.1016/j.phrs.2005.05.006.

Chinopoulos C, Adam-Vizi V. Mitochondria as ATP consumers in cellular pathology. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1802(1):221-7. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.08.008.

Choi JY, Won NH, Park JD, Jang S, Eom CY, Choi Y, Park YI, Dong MS. From the Cover: Ethylmercury-Induced Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagic Cell Death: Involvement of Autophagosome-Lysosome Fusion Arrest. *Toxicol Sci*. 2016 Nov;154(1):27-42. doi: 10.1093/toxsci/kfw155.

Cordier W, Yousaf M, Nell MJ, Steenkamp V. Underlying mechanisms of cytotoxicity in HepG2 hepatocarcinoma cells exposed to arsenic, cadmium and mercury individually and in combination. *Toxicol In Vitro*. 2021 Apr;72:105101. doi: 10.1016/j.tiv.2021.105101.

Cui C, Xu P, Li G, Qiao Y, Han W, Geng C, Liao D, Yang M, Chen D, Jiang P. Vitamin D receptor activation regulates microglia polarization and oxidative stress in

spontaneously hypertensive rats and angiotensin II-exposed microglial cells: Role of renin-angiotensin system. *Redox Biol.* 2019 Sep; 26:101295. doi: 10.1016/j.redox.2019.101295.

Dikalov SI, Ungvari Z. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Nov 15;305(10):H1417-27. doi: 10.1152/ajpheart.00089.2013.

Dórea JG. Integrating experimental (in vitro and in vivo) neurotoxicity studies of low-dose thimerosal relevant to vaccines. *Neurochem Res.* 2011 Jun;36(6):927-38. doi: 10.1007/s11064-011-0427-0.

Dorighello GG, Paim BA, Leite ACR, Vercesi AE, Oliveira HCF. Spontaneous experimental atherosclerosis in hypercholesterolemic mice advances with ageing and correlates with mitochondrial reactive oxygen species. *Exp Gerontol.* 2018 Aug;109:47-50. doi: 10.1016/j.exger.2017.02.010.

Dornas WC, Silva ME. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci.* 2011; 36 (4): 731-7.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959 May;82(1):70-7. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.

Esler M. Mental stress and human cardiovascular disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017 Mar;74(Pt B):269-276. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.10.011.

Facundo, Héberty di Tarso Fernandes. Efeitos redox e protetores do pré-condicionamento isquêmico e da abertura do canal mitocondrial de potássio sensível a ATP contra morte celular por isquemia e reperfusão cardíaca. 2007. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. doi:10.11606/T.46.2007.tde-27052008-091351. Acesso em: 2022-12-27.

Fazan, V. P. S. et al. Ratos espontaneamente hipertensos e neuropatias periféricas. *X Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular. Medicina, Ribeirão Preto, (1): 39-50, jan./mar. 2006.*

Fernandes MP, Leite AC, Araújo FF, Saad ST, Baratti MO, Correia MT, Coelho LC, Gadelha FR, Vercesi AE. The *Cratylia mollis* seed lectin induces membrane permeability transition in isolated rat liver mitochondria and a cyclosporine a-insensitive permeability

transition in *Trypanosoma cruzi* mitochondria. *J Eukaryot Microbiol.* 2014 Jul-Aug;61(4):381-8. doi: 10.1111/jeu.12118.

Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JC, Kowaltowski AJ, Sluse FE, Souza-Pinto NC, Vercesi AE. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jun 1;18(16):2029-74. doi: 10.1089/ars.2012.4729.

Figueira TR, Castilho RF, Saito A, Oliveira HC, Vercesi AE. The higher susceptibility of congenital analbuminemic rats to Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition is associated with the increased expression of cyclophilin D and nitrosothiol depletion. *Mol Genet Metab.* 2011 Dec;104(4):521-8. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.08.031.

Fillion M, Mergler D, Sousa Passos CJ, Larribe F, Lemire M, Guimarães JR. A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. *Environ Health.* 2006 Oct 10;5:29. doi: 10.1186/1476-069X-5-29.

Gangwisch JE. A review of evidence for the link between sleep duration and hypertension. *Am J Hypertens.* 2014 Oct;27(10):1235-42. doi: 10.1093/ajh/hpu071.

Gao J, Akbari A, Wang T. Green tea could improve elderly hypertension by modulating arterial stiffness, the activity of the renin/angiotensin/aldosterone axis, and the sodium-potassium pumps in old male rats. *J Food Biochem.* 2022 Dec;46(12):e14398. doi: 10.1111/jfbc.14398.

Garbarino VR, Orr ME, Rodriguez KA, Buffenstein R. Mechanisms of oxidative stress resistance in the brain: Lessons learned from hypoxia tolerant extremophilic vertebrates. *Arch Biochem Biophys.* 2015 Jun 15;576:8-16. doi: 10.1016/j.abb.2015.01.029.

Garfinkle MA. Salt and essential hypertension: pathophysiology and implications for treatment. *J Am Soc Hypertens.* 2017 Jun;11(6):385-391. doi: 10.1016/j.jash.2017.04.006.

Gerber JS, Offit PA. Vacinas e autismo: um conto de hipóteses em mudança. *Clin Infect Dis.* 2009 Fev 15;48(4):456-61. DOI: 10.1086/596476.

Ginès P, Krag A, Abraldes JG, Solà E, Fabrellas N, Kamath PS. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2021 Oct 9;398(10308):1359-1376. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01374-X.

Griendling KK, Camargo LL, Rios FJ, Alves-Lopes R, Montezano AC, Touyz RM. Oxidative Stress and Hypertension. *Circ Res.* 2021 Apr 2;128(7):993-1020. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318063.

Hagele TJ, Mazerik JN, Gregory A, Kaufman B, Magalang U, Kuppusamy ML, Marsh CB, Kuppusamy P, Parinandi NL. Mercury activates vascular endothelial cell phospholipase D through thiols and oxidative stress. *Int J Toxicol.* 2007 Jan-Feb;26(1):57-69. doi: 10.1080/10915810601120509.

Haleckova A, Benek O, Zemanová L, Dolezal R, Musilek K. Small-molecule inhibitors of cyclophilin D as potential therapeutics in mitochondria-related diseases. *Med Res Rev.* 2022 Sep;42(5):1822-1855. doi: 10.1002/med.21892.

Harrison DG. The mosaic theory revisited: common molecular mechanisms coordinating diverse organ and cellular events in hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2013 Jan-Feb;7(1):68-74. doi: 10.1016/j.jash.2012.11.007.

Hickey AJ, Chai CC, Choong SY, de Freitas Costa S, Skea GL, Phillips AR, Cooper GJ. Impaired ATP turnover and ADP supply depress cardiac mitochondrial respiration and elevate superoxide in nonfailing spontaneously hypertensive rat hearts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009 Sep;297(3):C766-74. doi: 10.1152/ajpcell.00111.2009.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976 Jul;74(1):214-26. doi: 10.1016/0003-2697(76)90326-2.

Hossain KFB, Hosokawa T, Saito T, Kurasaki M. Melhoria do hidroxitolueno butilado contra citotoxicidade induzida por mercúrio inorgânico e apoptose mitocondrial em células PC12 através de efeitos antioxidantes. *Alimento Chem Toxicol.* 2020 Dez;146:111819. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111819.

Humphrey ML, Cole MP, Pendergrass JC, Kinningham KK. Mitochondrial mediated thimerosal-induced apoptosis in a human neuroblastoma cell line (SK-N-SH). *Neurotoxicology.* 2005 Jun;26(3):407-16. doi: 10.1016/j.neuro.2005.03.008.

James SJ, Slikker W 3rd, Melnyk S, New E, Pogribna M, Jernigan S. Thimerosal neurotoxicity is associated with glutathione depletion: protection with glutathione precursors. *Neurotoxicology.* 2005 Jan;26(1):1-8. doi: 10.1016/j.neuro.2004.07.012.

Jezeq P, Engstová H, Záčková M, Vercesi AE, Costa AD, Arruda P, Garlid KD. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Jun 10;1365(1-2):319-27. doi: 10.1016/s0005-2728(98)00084-x.

Kabra, P. A. *Renovascular Disease. Medicine*, 2015; 43: 419-424.

Kern JK, Geier DA, Homme KG, Geier MR. Examinando a evidência de que o etilmercúrio atravessa a barreira hematoencefálica. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2020 Fev;74:103312. DOI: 10.1016/j.etap.2019.103312.

Kim G, Kim J, Lim YL, Kim MY, Baik SK. Renin-angiotensin system inhibitors and fibrosis in chronic liver disease: a systematic review. *Hepatol Int*. 2016 Sep;10(5):819-28. doi: 10.1007/s12072-016-9705-x.

Kowaltowski AJ, Turin J, Indig GL, Vercesi AE. Mitochondrial effects of triarylmethane dyes. *J Bioenerg Biomembr*. 1999 Dec;31(6):581-90. doi: 10.1023/a:1005421112345.

Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*. 2001 Apr 20;495(1-2):12-5. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02316-x.

Kowaltowski AJ, Vercesi AE, Fiskum G. Bcl-2 previne a transição da permeabilidade mitocondrial e a liberação do citocromo c através da manutenção de nucleotídeos de piridina reduzidos. *A morte celular é diferente*. 2000 Out;7(10):903-10. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400722.

Kumar V, Abbas A, Fausto N. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 7ª edição. Rio de Janeiro: elsevier, 2005.

Kumari M, Bajad SM, Kshirsagar SR, Chinde S, Balaji AS, Jerald Mahesh Kumar M, Saxena S, Kumari SI. Sub-chronic oral toxicity evaluation of herbo-metallic formulation Arshakuthar rasa in rats. *J Ethnopharmacol*. 2022 Nov 15;298:115306. doi: 10.1016/j.jep.2022.115306.

Kushawaha B, Yadav RS, Swain DK, Kumari P, Kumar A, Yadav B, Anand M, Yadav S, Singh D, Garg SK. Cristas mitocondriais colapsadas em espermatozoides de cabra devido ao mercúrio resultam em letalidade e motilidade comprometida, juntamente com padrões cinemáticos alterados. *Sci Rep*. 2021 Jan 12;11(1):646. DOI: 10.1038/s41598-020-80235-y.

Lahera V, de Las Heras N, López-Farré A, Manucha W, Ferder L. Role of Mitochondrial Dysfunction in Hypertension and Obesity. *Curr Hypertens Rep.* 2017 Feb;19(2):11. doi: 10.1007/s11906-017-0710-9.

Lee H, Abe Y, Lee I, Shrivastav S, Crusan AP, Hüttemann M, Hopfer U, Felder RA, Asico LD, Armando I, Jose PA, Kopp JB. Increased mitochondrial activity in renal proximal tubule cells from young spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int.* 2014 Mar;85(3):561-9. doi: 10.1038/ki.2013.397.

Leite AC, Oliveira HC, Utino FL, Garcia R, Alberici LC, Fernandes MP, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jun-Jul;1797(6-7):1210-6. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.01.034.

Li H, Xiao Y, Tang L, Zhong F, Huang G, Xu JM, Xu AM, Dai RP, Zhou ZG. Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Promotes Palmitate-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in Macrophages. *Front Immunol.* 2018 Jan 30;9:81. doi: 10.3389/fimmu.2018.00081.

Liu W, Yang T, Xu Z, Xu B, Deng Y. Methyl-mercury induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptosis pathways activation in rat cortical neurons. *Free Radic Res.* 2019 Jan;53(1):26-44. doi: 10.1080/10715762.2018.1546852.

Lohren H, Bornhorst J, Fitkau R, Pohl G, Galla HJ, Schwerdtle T. Efeitos e transferência através da barreira hematoencefálica in vitro-Comparação de espécies de mercúrio orgânico e inorgânico. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2016 Dez 15;17(1):63. DOI: 10.1186/s40360-016-0106-5.

Lopez-Campistrous A, Hao L, Xiang W, Ton D, Semchuk P, Sander J, Ellison MJ, Fernandez-Patron C. Mitochondrial dysfunction in the hypertensive rat brain: respiratory complexes exhibit assembly defects in hypertension. *Hypertension.* 2008 Feb;51(2):412-9. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.102285.

Malaguti C, La Guardia PG, Leite AC, Oliveira DN, de Lima Zollner RL, Catharino RR, Vercesi AE, Oliveira HC. Oxidative stress and susceptibility to mitochondrial permeability transition precedes the onset of diabetes in autoimmune non-obese diabetic mice. *Free Radic Res.* 2014 Dec;48(12):1494-504. doi: 10.3109/10715762.2014.966706.

Mercúrio (Hg). QUALI segurança alimentar. Disponível em: <<https://www.quali.pt/contaminantes/1558-mercurio-hg>>. Acesso em: 27 de dezembro de 2022.

Metzler DE. Biochemistry: the chemical reactions of living cells. 2ª edição. Michigan: Academic Press, 2003.

Ministério da Saúde. Diabetes, hipertensão e obesidade avançam entre os brasileiros, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2020/abril/diabetes-hipertensao-e-obesidade-avancam-entre-os-brasileiros-2>>. Acesso em: 27 de dezembro de 2022.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972 May 25;247(10):3170-5.

Mitchell P. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science*, 206: 1148-59, 1979.

Mittler R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci*. 2017 Jan;22(1):11-19. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002.

Mohammadi MT, Dehghani GA. Acute hypertension induces brain injury and blood-brain barrier disruption through reduction of claudins mRNA expression in rat. *Pathol Res Pract*. 2014 Dec;210(12):985-90. doi: 10.1016/j.prp.2014.05.007.

Young CN, Davisson RL. Angiotensin-II, the Brain, and Hypertension: An Update. *Hypertension*. 2015 Nov;66(5):920-6. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.03624.

Moraes-Silva L, Siqueira LF, Oliveira VA, Oliveira CS, Ineu RP, Pedrosa TF, Fonseca MM, Pereira ME. Preventive effect of CuCl₂ on behavioral alterations and mercury accumulation in central nervous system induced by HgCl₂ in newborn rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2014 Jul;28(7):328-35. doi: 10.1002/jbt.21569.

Münzel T, Miller MR, Sørensen M, Lelieveld J, Daiber A, Rajagopalan S. Reduction of environmental pollutants for prevention of cardiovascular disease: it's time to act. *Eur Heart J*. 2020 Nov 1;41(41):3989-3997. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa745.

Murphy MP. Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Mar 15;16(6):476-95. doi: 10.1089/ars.2011.4289.

Nascimento SN, Barth A, Göethel G, Baierle M, Charão MF, Brucker N, Moro AM, Bubols GB, Sobreira JS, Sauer E, Rocha R, Gioda A, Dias AC, Salles JF, Garcia SC. Cognitive deficits and ALA-D-inhibition in children exposed to multiple metals. *Environ Res*. 2015 Jan;136:387-95. doi: 10.1016/j.envres.2014.10.003.

Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger principles of biochemistry*. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, (2019).

Nesci S, Trombetti F, Pirini M, Ventrella V, Pagliarani A. Mercury and protein thiols: Stimulation of mitochondrial F1FO-ATPase and inhibition of respiration. *Chem Biol Interact*. 2016 Dec 25;260:42-49. doi: 10.1016/j.cbi.2016.10.018.

Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol*. 2007 Aug 15;583(Pt 1):9-24. doi: 10.1113/jphysiol.2007.135871.

Nicholls, D. G.; Ferguson, S. J. *Bioenergetics*. 4ª edição. United Kingdom: academic press, 2013.

Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*. 1984 Jan;64(1):1-64. doi: 10.1152/physrev.1984.64.1.1.

Nunes ÁM, da Silva KRM, Calado CMS, Saraiva KLA, Q Figueiredo RCB, Leite ACR, Meneghetti MR. Evaluation of gold nanorods toxicity on isolated mitochondria. *Toxicology*. 2019 Feb 1;413:24-32. doi: 10.1016/j.tox.2018.12.002.

OKAMOTO K, AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963 Mar;27:282-93. doi: 10.1253/jcj.27.282. PMID: 13939773

Olczak M, Duszczuk M, Mierzejewski P, Majewska MD. Neonatal administration of a vaccine preservative, thimerosal, produces lasting impairment of nociception and apparent activation of opioid system in rats. *Brain Res*. 2009 Dec 8;1301:143-51. doi: 10.1016/j.brainres.2009.09.003.

Oliveira C., Joshee L., Bridges C.C. MRP2 and the Transport Kinetics of Cysteine Conjugates of Inorganic Mercury. *Biol Trace Elem Res.* 2018 Jul;184(1):279-286. doi: 10.1007/s12011-017-1163-3.

Oliveira KA, Zecchin KG, Alberici LC, Castilho RF, Vercesi AE. Simvastatin inducing PC3 prostate cancer cell necrosis mediated by calcineurin and mitochondrial dysfunction. *J Bioenerg Biomembr.* 2008 Aug;40(4):307-14. doi: 10.1007/s10863-008-9155-9.

Oliveira, M.J., Silva, F.A.C., Santos, J.C.C. Determination of mercury (thimerosal) in vaccines using different oxidants and cold vapor atomic fluorescence spectrometry in dilute acids. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2021, 36, 740-746. DOI: 10.1039/D1JA00041A

Orct T., Blanusa M., Lazarus M., Varnai V.M., Kostial K. Comparison of organic and inorganic mercury distribution in suckling rat. *J Appl Toxicol.* 26(6):536-9, 2006. doi: 10.1002/jat.1167.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Hypertension, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/hypertension#tab=tab_1>. Acesso em: 27 de dezembro de 2022.

Organização Mundial da Saúde. Mercury: Assessing the environmental burden of disease at national and local levels. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241596572>>. Acesso em: 27 de dezembro de 2022.

Os riscos do mercúrio. Ministério do Meio Ambiente, 15 de janeiro de 2013. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/noticias/os-riscos-do-mercurio>>. Acesso em: 27 de dezembro de 2022.

Öztürk ME, Yirün A, Erdemli-Köse SB, Balcı-Özyurt A, Çakır DA, Oral D, Erkekoğlu P. Evaluation of the toxic effects of thimerosal and/or aluminum hydroxide in SH-SY5Y cell line. *Hum Exp Toxicol.* 2022 Jan-Dec;41:9603271221136206. doi: 10.1177/09603271221136206.

Page IH. The mosaic theory of arterial hypertension--its interpretation. *Perspect Biol Med.* 1967 Spring;10(3):325-33. doi: 10.1353/pbm.1967.0031.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967 Jul;70(1):158-69. PMID: 6066618.

Park MW, Cha HW, Kim J, Kim JH, Yang H, Yoon S, Boonpraman N, Yi SS, Yoo ID, Moon JS. NOX4 promotes ferroptosis of astrocytes by oxidative stress-induced lipid peroxidation via the impairment of mitochondrial metabolism in Alzheimer's diseases. *Redox Biol.* 2021 May;41:101947. doi: 10.1016/j.redox.2021.101947.

Peng B, Che D, Hao Y, Zheng Y, Liu R, Qian Y, Cao J, Wang J, Zhang Y, He L, Geng S. Thimerosal induces skin pseudo-allergic reaction via Mas-related G-protein coupled receptor B2. *J Dermatol Sci.* 2019 Sep;95(3):99-106. doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.07.007.

Ramalingam L, Menikdiwela K, LeMieux M, Dufour JM, Kaur G, Kalupahana N, Moustaid-Moussa N. The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017 May;1863(5):1106-1114. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.019.

Robinson J., Cooper J.M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal. Biochem.* 1970; 33:390-399.

Rodrigo R, González J, Paoletto F. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertens Res.* 2011 Apr;34(4):431-40. doi: 10.1038/hr.2010.264.

Rodrigues J.L., Serpeloni J.M., Batista B.L., Souza S.S., Barbosa F. Jr. Identification and distribution of mercury species in rat tissues following administration of thimerosal or methylmercury. *Arch Toxicol.* 84(11):891-6, 2010. doi: 10.1007/s00204-010-0538-4.

Ronchi JA, Vercesi AE, Castilho RF. Reactive oxygen species and permeability transition pore in rat liver and kidney mitoplasts. *J Bioenerg Biomembr.* 2011 Dec;43(6):709-15. doi: 10.1007/s10863-011-9384-1.

Sales MVS, da Silva Filho RC, Silva MM, Rocha JL, Freire RO, de L Tanabe EL, Silva ECO, Fonseca EJS, Figueiredo IM, Rocha U, Santos JCC, Leite ACR. Consequences of thimerosal on human erythrocyte hemoglobin: Assessing functional and structural protein changes induced by an organic mercury compound. *J Trace Elem Med Biol.* 2022 Jan 10;71:126928. doi: 10.1016/j.jtemb.2022.126928.

Santos JCN, da Silva IM, Braga TC, de Fátima Â, Figueiredo IM, Santos JCC. Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). *Int J Biol Macromol.* 2018 Jul 1;113:1032-1040. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.116.

Santos MC, Silva-Filho RC, Leite ACR, Nascentes CC, Botero WG, Santos JCC. Evaluation of Potentially Toxic Elements in Mundaú Lagoon (Maceió, AL-Brazil): Systematic Environmental Monitoring of Water and Food Quality. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2021 No; 32:1762-1772. doi: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210067>.

Satou R, Penrose H, Navar LG. Inflammation as a Regulator of the Renin-Angiotensin System and Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep.* 2018 Oct 5;20(12):100. doi: 10.1007/s11906-018-0900-0.

Shim KY, Eom YW, Kim MY, Kang SH, Baik SK. Role of the renin-angiotensin system in hepatic fibrosis and portal hypertension. *Korean J Intern Med.* 2018 May;33(3):453-461. doi: 10.3904/kjim.2017.317.

Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med.* 2010 Jun;31(3):227-85. doi: 10.1016/j.mam.2010.03.002.

Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017 Jun 20;86:715-748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.

Silva-Filho R, Santos N, Santos MC, Nunes Á, Pinto R, Marinho C, Lima T, Fernandes MP, Santos JCC, Leite ACR. Impact of environmental mercury exposure on the blood cells oxidative status of fishermen living around Mundaú lagoon in Maceió - Alagoas (AL), Brazil. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021 Aug;219:112337. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112337.

Silva, F.A.C., Oliveira, M.J., Florez-Rodriguez, P.P., Santos, J.C.C. Mercury speciation in estuarine water using dithiol-based magnetic solid-phase extraction and cold vapor atomic fluorescence spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 2022, 192, 106412. DOI: 10.1016/j.sab.2022.106412

Simões RP, Fardin PBA, Simões MR, Vassallo DV, Padilha AS. Long-term Mercury Exposure Accelerates the Development of Hypertension in Prehypertensive Spontaneously Hypertensive Rats Inducing Endothelial Dysfunction: the Role of Oxidative Stress and Cyclooxygenase-2. *Biol Trace Elem Res.*196(2):565-578, 2019. DOI: 10.1007/s12011-019-01952-8.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. Combate à hipertensão e política públicas é tema de evento promovido pela SBC, 2021. Disponível em: <<https://www.portal.cardiol.br/post/combate-%C3%A0-hipertens%C3%A3o-e>

pol%C3%ADticas-p%C3%BAblicas-%C3%A9-tema-de-evento-promovido-pela-sbc>.

Acesso em: 27 de dezembro de 2022.

Stock T, Lohs K. The challenge of old chemical munitions and toxic armament wastes. Oxford: Oxford University Press on Demand; 1997. ISBN 0-19-829190-6.

Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2013 Jul-Aug;106-107:17-32. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.004.

Svoboda DS, Kawaja MD. Changes in hepatic protein expression in spontaneously hypertensive rats suggest early stages of non-alcoholic fatty liver disease. *J Proteomics.* 2012 Mar 16;75(6):1752-63. doi: 10.1016/j.jprot.2011.12.011.

Teixeira FB, de Oliveira ACA, Leão LKR, Fagundes NCF, Fernandes RM, Fernandes LMP, da Silva MCF, Amado LL, Sagica FES, de Oliveira EHC, Crespo-Lopez ME, Maia CSF, Lima RR. Exposure to Inorganic Mercury Causes Oxidative Stress, Cell Death, and Functional Deficits in the Motor Cortex. *Front Mol Neurosci.* 2018 May 15;11:125. doi: 10.3389/fnmol.2018.00125.

Toma HE. 5 coleção de química conceitual: química bioinorgânica e ambiental. 1ª edição. Brasil: Blucher, 2015.

Toth P, Tucsek Z, Sosnowska D, Gautam T, Mitschelen M, Tarantini S, Deak F, Koller A, Sonntag WE, Csiszar A, Ungvari Z. Age-related autoregulatory dysfunction and cerebrovascular injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013 Nov;33(11):1732-42. doi: 10.1038/jcbfm.2013.143.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res.* 1981 Mar;48(3):309-19. doi: 10.1161/01.res.48.3.309.

Tu AT. Chemical weapons abandoned by the Imperial Japanese Army in Japan and China at the end of World War II. *toxin Reviews,* 2011; 30(1): 1–5. doi: 10.3109/15569543.2011.542111.

Ungvari Z, Toth P, Tarantini S, Prodan CI, Sorond F, Merkely B, Csiszar A. Hypertension-induced cognitive impairment: from pathophysiology to public health. *Nat Rev Nephrol.* 2021 Oct;17(10):639-654. doi: 10.1038/s41581-021-00430-6.

Ungvari Z, Bailey-Downs L, Sosnowska D, Gautam T, Koncz P, Losonczy G, Ballabh P, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic

failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Aug;301(2):H363-72. doi: 10.1152/ajpheart.01134.2010.

Vercesi AE, Castilho RF, Kowaltowski AJ, de Oliveira HCF, de Souza-Pinto NC, Figueira TR, Busanello ENB. Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. *Free Radic Biol Med*. 2018 Dec;129:1-24. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.034.

Vigitel brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Disponível em: <

Wasserman J.C., Hacon S.S., Wasserman M.A. O ciclo do mercúrio o ambiente Amazônico. *Mundo e Vida*, 2001; 2(1/2): 46-53.

World Health Organization (WHO). Cardiovascular Diseases, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1>. Acesso em: 27 de dezembro de 2022.

World Health Organization (WHO). Hypertension, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2023.

Wu KLH, Wu CW, Chao YM, Hung CY, Chan JYH. Impaired Nrf2 regulation of mitochondrial biogenesis in rostral ventrolateral medulla on hypertension induced by systemic inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2016 Aug;97:58-74. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.012.

Xin X, He J, Frontini MG, Ogden LG, Motsamai OI, Whelton PK. Effects of alcohol reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertension*. 2001 Nov;38(5):1112-7. doi: 10.1161/hy1101.093424.

Young CN, Davisson RL. Angiotensin-II, the Brain, and Hypertension: An Update. *Hypertension*. 2015 Nov;66(5):920-6. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.03624.

Zareba G., Cernichiari E., Hojo R., Nitt S.M., Weiss B., Mumtaz M.M., Jones D.E., Clarkson T.W. Thimerosal distribution and metabolism in neonatal mice: comparison with methyl Mercury. *J Appl Toxicol.* 27(5):511-8, 2007. doi: 10.1002/jat.1272.

Zhao YC, Zhao GJ, Chen Z, She ZG, Cai J, Li H. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Emerging Driver of Hypertension. *Hypertension.* 2020 Feb;75(2):275-284. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13419.

Zong WX, Rabinowitz JD, White E. Mitocôndrias e Câncer. *Célula Mol.* 2016 Mar 3;61(5):667-676. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.02.011.