

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

MAIARA INGRID CAVALCANTE QUEIROZ

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MERCÚRIO EM PESCADORES DO COMPLEXO LAGUNAR MUNDAÚ-MANGUÁBA (CELMM) E EM MODELO ANIMAL HIPERCOLESTEROLÊMICO

MACEIÓ – AL

2024

MAIARA INGRID CAVALCANTE QUEIROZ

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MERCÚRIO EM PESCADORES DO COMPLEXO LAGUNAR MUNDAÚ-MANGUÁBA (CELMM) E EM MODELO ANIMAL HIPERCOLESTEROLÊMICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Maceió – AL 2024

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

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

Q3e	Queiroz, Maiara Ingrid Cavalcante. Efeitos da exposição crônica ao mercúrio em pescadores do Complexo Lagunar Mundaú-Manguába (CELMM) e em modelo animal hipercolesterolêmico / Maiara Ingrid Cavalcante Queiroz. – 2024. 146 f. : il color.
	Orientadora: Ana Catarina Rezende Leite. Co-orientadora: Helena Coutinho Franco de Oliveira. Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2024.
	Bibliografia: f. 120-146.
	1. Mercúrio - Contaminação. 2. Mitocôndrias. 3. Estresse oxidativo. I. Título.
	CDU: 661.849

Dedico este trabalho a Deus que em todos os momentos esteve comigo. Aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e foram a minha base, sempre me dando amor, carinho e bons conselhos.

"Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro de gigantes." Isaac Newton.

AGRADECIMENTOS

Com mais uma etapa da minha vida acadêmica finalizada, venho agradecer primeiramente a Deus, que sempre me ajudou a ter discernimento nas decisões corretas durante todo o processo do mestrado. Agradeço imensamente aos meus pais, Cristina e Israel, pelos conselhos, apoio, acolhimento e carinho, e por sempre me incluírem em suas intenções. Aos meus irmãos, Manoel e Marcos, por sempre estarem na torcida por mim e pelas minhas conquistas.

Não poderia deixar de agradecer à minha querida orientadora e mãe científica, Ana Catarina, que me proporcionou muitas oportunidades de obter experiências e aprendizados. Não tenho como mensurar a gratidão que tenho por você ter apostado tanto em mim e na minha capacidade. Obrigada por sempre me incentivar e inspirar a ter sonhos grandes, porque para mim, a senhora sempre será minha grande inspiração de professora e pesquisadora, que guardarei por toda a minha vida.

Obrigada também à minha coorientadora, Helena Oliveira, minha avó científica, que me acolheu e deu bons puxões de orelha como toda avó que se preze. E ao meu coorientador, Josué Carinhanha, que sempre me deu boas ideias de como prosseguir com a pesquisa e bons conselhos profissionais.

Agradeço à banca examinadora por ter aceitado participar deste momento tão importante, à Universidade Federal de Alagoas, ao PPGQB, à CAPES, à FAPEAL e à FAPESP, pois foram de extrema importância em minha jornada acadêmica.

Por fim, quero agradecer a todos os meus amigos, começando pelo meu amigo e companheiro, Eudes Peixoto, por sua paciência e cuidado comigo. Às minhas amigas de longa data que sempre torcem por mim, Sara Vivian e Geyse Maria. Ao meu irmão científico, Marcos Sales, que sempre esteve presente em todos os momentos desse processo, compartilhando sonhos, risos, choros e brigas, nossa amizade é muito valiosa para mim e você sabe. À minha amiga Sheila, a quem tenho muito carinho, mesmo sendo muito teimosa. À Carol, que na Unicamp foi minha fiel escudeira e companheira de experimentos, e à Alice e a Prof.^a Dr.^a Nadja, que foram muito prestativas e acolhedoras durante o meu período na USP. E ao pessoal do laboratório que participou de muitos momentos felizes da minha trajetória, tenho muito apreço por Daniel, Ismirna, Leonardo, Marcelo e Victor. Obrigada!

RESUMO

O mercúrio é um metal tóxico que pode causar danos ambientais, e quando ocorre a exposição humana a esses contaminantes pode acarretar estresse oxidativo que pode ou potencializar diversas morbidades. No causar estado de Alagoas, a Lagoa Mundaú, a qual faz parte do Complexo Estuarino Mundaú-Manguaba (CELMM) é uma importante fonte de subsistência para a população local. Porém, segundo dados recentes do nosso grupo, a contaminação por metais pesados, com destaque para o mercúrio (Hg), tem promovido danos em toda cadeia dependente de tal ambiente, incluindo as células sanguíneas dos pescadores de tal localidade. Logo, um dos objetivos do nosso trabalho foi o de avaliar, em pessoas que vivem em torno do CELMM, alterações funcionais e estruturais de células sanguíneas, bem como seu o estado redox. Dentro do mesmo contexto de contaminação por Hg, existe uma relação dos níveis de Hg no sangue e o desenvolvimento de doenças cadiovasculares. No âmbito das doenças cardiovasculares, a aterosclerose é uma das maiores causas de morte em todo o mundo, que pode levar ao infarto agudo do miocárdio. Sendo assim, utilizamos como modelo de estudo, os camundongos knockout para o receptor de LDL (LDLr/), os quais possuem como consequência uma maior circulação de tal lipoproteína rica em colesterol, levando a formação da placa de aterosclerose. Nesses animais LDLr/, avaliamos se o tratamento com HgCl₂ (30 dias, 0,5 mg Kg⁻¹) teria um efeito aditivo sobre os fatores de risco para aterosclerose. No estudo com humanos, avaliamos células sanguíneas de 60 pescadores e 65 controles pareados, onde foi observado maiores níveis de Hg no sangue, diminuição da funcionalidade dos eritrócitos, alteração estrutural na hemoglobina e comprometimento do sistema redox nos pescadores. Ainda nos pescadores, os linfócitos apresentaram uma produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROS). Quanto ao estudo com animais LDLr/ tratados com HgCl₂, estes apresentaram diminuição de funcionalidade dos eritrócitos; alteração na contagem de células da série branca, aumento na atividade fagocitária de macrófagos, elevação de citocinas plasmáticas, acúmulo de Hg em diferentes órgãos, bem como alteração na função renal e hepática. Nas mitocôndrias isoladas de fígado, houve um comprometimento da respiração e integridade de tal organela, e ainda aumento na geração de H₂O₂. Portanto, nossos resultados mostram que, independente do modelo utilizado, a contaminação por Hg leva a danos oxidativos sistêmicos que podem comprometer a saúde do organismo.

Palavras-chave: Contaminação, mercúrio, mitocôndria, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Mercury is a toxic metal that can cause environmental damage, and when human exposure to these contaminants occurs, it can lead to oxidative stress that may cause or exacerbate various morbidities. In the state of Alagoas, Mundaú Lagoon, which is part of the Mundaú-Manguaba Estuarine Complex (CELMM), is an important source of subsistence for the local population. However, according to recent data from our group, contamination by heavy metals, notably mercury (Hg), has been causing damage throughout the chain dependent on this environment, including the blood cells of fishermen from this locality. Therefore, one of the objectives of our work was to evaluate, in people living around the CELMM, functional and structural alterations of blood cells, as well as their redox status. Within the same context of Hg contamination, there is a relationship between blood Hg levels and the development of cardiovascular diseases. In the scope of cardiovascular diseases, atherosclerosis is one of the leading causes of death worldwide, which can lead to acute myocardial infarction. Thus, we used LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}) as a study model, which consequently have increased circulation of such cholesterol-rich lipoprotein, leading to atherosclerotic plaque formation. In these LDLr/ animals, we evaluated whether treatment with HgCl₂ (30 days, 0.5 mg kg⁻¹) would have an additive effect on atherosclerosis risk factors. In the human study, we evaluated blood cells from 60 fishermen and 65 matched controls, where higher blood Hg levels, decreased erythrocyte functionality, structural alteration in hemoglobin, and compromised redox system in fishermen were observed. Furthermore, in fishermen, lymphocytes showed an exacerbated production of reactive oxygen species (ROS). As for the study with LDLr/ animals treated with HgCl₂, they presented decreased erythrocyte functionality; alteration in white blood cell count, increased macrophage phagocytic activity, elevation of plasma cytokines, accumulation of Hg in different organs, as well as alteration in renal and hepatic function. In isolated liver mitochondria, there was impairment of respiration and integrity of such organelle, as well as an increase in H₂O₂ generation. Therefore, our results show that, regardless of the model used, Hg contamination leads to systemic oxidative damage that can compromise organism health.

Key-words: Contamination, mercury, mitochondria, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativas de mortes causadas por poluição
Figura 2. Estimativa das mortes causadas por poluição total no mundo 24
Figura 3. Mapa de Localização do CELMM
Figura 4. Ciclo biogeoquímico do mercúrio
Figura 5. Processo de formação do heme e os eritrócitos
Figura 6. Duas fases da glicólise
Figura 7. Estrutura da molécula de hemoglobina. Estruturas das cadeias
polipeptídicas $\alpha \in \beta$, grupo prostético heme com átomo de Fe ²⁺
Figura 8. A transição T \rightarrow R. A transição do estado T para o estado R altera de modo
considerável os pares de subunidades, afetando determinados pares iônicos.36
Figura 9. Leucócitos agranulócitos (mononucleares) e granulócitos
(polimorfonucleares)
Figura 10. Concentração de mercúrio total no sangue dos voluntários 59
Figura 11. Eritrócitos de pescadores expostos à lagoa Mundaú apresentam baixa
capacidade de captação de oxigênio e alterações estruturais em eritrócitos 59
Figura 12. A exposição ao ambiente contaminado aumenta a produção de oxigênio
reativo em células linfomononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pescadores
expostos em comparação com controles62
Figura 13. A exposição em ambiente contaminado aumenta a rugosidade da
membrana plasmática das células mononucleares dos pescadores expostos em
comparação aos controles 65
Figura 14. Exposição ao ambiente contaminado modifica o sistema antioxidante dos
eritrócitos de pescadores expostos em comparação com os controles
Figura 15. Exposição ao ambiente contaminado aumenta o dano oxidativo de
biomoléculas e diminui o poder redutor celular nos eritrócitos de pescadores expostos
em comparação com os controles
Figura 16. Estrutura racional do NADH e FADH ₂
Figura 17. Figura representativa do funcionamento da cadeia transportadora de
eletrons
Figura 18. Transporte de eletrons pelo complexo I, II, III e IV
Figura 19. Estrutura da AIP-sintase e demonstração experimental da sua rotação.
Figura 20. Funcionamento da cadeia transportadora de eletrons, medida
experimental
Figura 21. Esquema que resume as proteinas envolvidas na abertura do poro
transição de permeabilidade mitocondrial (TPM).
Figura 22. Camundongos LDLr 7 tratados cronicamente com Hg tem nos niveis de
Colesterol, entretanto nao ocorre diferença no desenvolvimento físico
Figura 23. Acumulo de mercurio total em tecidos de camundongos
Figure 24. A expedição o HaCh lovo oo oumente do moreodoreo do donce heráticos
rigura 24. A exposição a rigoriz leva ao aumento de marcadores de danos nepaticos
E remais em plasma de Camunullyus LDLI /
Figura 23. Analises histologicas do baço, coração e pulhoes de camundongos
Figura 26 Apálisos histológicos do fígodo o dos rino do comundongos
hipercolecterolêmicos cronicamente expostos ao HaClana água potávol 101
mpercolesterolemicos cionicamente expositos ao myol2 na agua potavel 101

Figura 27. Análises histológicas do cérebro de camundongos hipercolesterolêmicos Figura 28. As consequências da exposição ao HgCl₂ na função dos eritrócitos em camundongos LDLr^{-/-}......103 Figura 29. Contagem de glóbulos brancos de camundongos LDLr / expostos à Figura 30. Macrófagos peritoneais de camundongos hipercolesterolêmicos cronicamente expostos a HgCl₂ na água de beber mostram maior atividade fagocítica (estimada pela absorção de vermelho neutro zymozan)......105 Figura 31. Níveis plasmáticos de indicadores de inflamação em camundongos LDLr Figura 32. Respiração mitocondrial na presença de substrato complexo I de mitocôndrias isoladas do fígado de camundongos LDLr -/- expostos ao HgCl2.107 Figura 33. Efeito do HqCl₂ sobre o potencial de membrana de mitocôndrias isoladas de camundongos LDLr -/- (0,5 mg de proteína mL-1). 109 Figura 34. Produção de H₂O₂ em mitocôndrias de fígado de camundongos LDLr / expostas ao HgCl₂.....110 Figura 35. Camundongos LDLr / expostos a HgCl₂ cronicamente possuem prejuízo Figura 36. Marcadores secundários do estresse oxidativo em homogenato de fígado

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de elementos encontrados na laguna Mundaú e os limitespreconizados pelo CONAMA ¹ e OMS ²
Tabela 2. Condições operacionais para o CV AFS para determinação de Hg total. 47
Tabela 3. Características demográficos e o tipo de exposição ambiental. Total n =125.54
Tabela 4. Hemograma completo dos grupos controle e exposto
Tabela 5. Parâmetros de bioquímica clínica. 57
Tabela 6. Condições operacionais para o CV AFS para determinação de Hg total.
Tabela 7. Programa de aquecimento para digestão em sistema fechado de amostras
biológicas por radiação de micro-ondas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*HgMe	Metil Mercúrio
'NŌ	Óxido Nítrico
юн	Radical Hidroxila
•UQH	Semiquinona
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
Ca ²⁺	Íon de Cálcio
CAT	Catalase
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil hidrazona
Cl-	Cloreto
CN ⁻	Íon Cianeto
CR	Controle Respiratório
CsA	Ciclosporina A
CTE	Cadeja Transportadora de Elétrons
DNPH	2.4-difenilhidrazona
DTNB	5.5'-ácido ditio-bis-2-nitrobenzóico
DDT	Ditiotreitol
EGTA	Ácido Etilenoglicoltetracético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo Oxidada
FADH ₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo Reduzida
Fe-S	Centros de Ferro / Enxofre
FMN	Flavina Mononucleotídeo Oxidada
FMNH ₂	Flavina Mononucleotódeo Reduzida
GPx	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Dissulfeto de Glutationa ou Glutationa Oxidada
H ⁺	Próton
H ₂ O	Água
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HCO ³⁻	Bicarbonato
Heme	Porfirinogênio coordenado a um Fe ²⁺
Hg⁰	Mercúrio Elementar
Hg ²⁺	Mercúrio Inorgânico
HgS	Cinabário
MĎA	Malonaldeído
NADH	Niconitamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NEM	N-Etilmaleimida
NOX	NADPH Oxidase
O ₂	Oxigênio Molecular
O2*-	Ânion Radical Superóxido
OH-	Íon Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pi	Fosfato Inorgânico

condrial

SUMÁRIO

AGF	RADEC	JMEN I OS	7
RES	UMO.		8
ABS	TRAC	Т	10
LIST	A DE	FIGURAS	11
LIST	A DE	TABELAS	13
LIST	A DE	ABREVIATURAS E SIGLAS	14
1.	INTR	ODUÇÃO GERAL	19
2. LAG		TOS DA EXPOSIÇAO CRONICA AO MERCURIO EM PESCADORES (COMP & MUNDAÚ-MANGUÁBA – CELMM)	LEXO 21
2.1.	Re	visão da literatura	21
2.	1.1.	Poluição ambiental e como atinge a população global	21
2.	1.2.	Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguába (CELMM)	24
2.	1.3.	Mercúrio e sua toxicidade	27
2.	1.4.	Células do sangue (eritrócitos e mononucleares)	31
	2.1.4	1. Eritrócitos e Hemoglobina	31
2.	2.1.4 1.5.	.2. Leucócitos (Célula Polimorfonuclear e Mononuclear) Estresse oxidativo: produção de espécies reativa e sistema antioxidante	37 40
3.	JUST		44
4.	OBJE	ETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	45
	_		
4.	6.	Objetivo geral	45
4. 4.	6. 7.	Objetivo geral Objetivo específico	45 45
4. 4. 5.	6. 7. MAT I	Objetivo geral Objetivo específico ERIAIS E MÉTODOS	45 45 46
4. 4. 5. 5.	6. 7. MAT I 1.	Objetivo geral Objetivo específico ERIAIS E MÉTODOS Amostra populacional	45 45 . 46 46
4. 4. 5. 5.	6. 7. MAT I 1. 2.	Objetivo geral Objetivo específico ERIAIS E MÉTODOS Amostra populacional Coleta do sangue e separação dos eritrócitos	45 45 46 46 46
4. 4. 5. 5. 5.	6. 7. MAT I 1. 2. 3.	Objetivo geral Objetivo específico ERIAIS E MÉTODOS Amostra populacional Coleta do sangue e separação dos eritrócitos Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	45 45 46 46 46 47
4. 4. 5. 5. 5. 5.	6. 7. MAT I 1. 2. 3. 4.	Objetivo geral Objetivo específico ERIAIS E MÉTODOS Amostra populacional Coleta do sangue e separação dos eritrócitos Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) Determinação do nível total de mercúrio no sangue total	45 45 46 46 46 47 47
4. 4. 5. 5. 5. 5. 5.	6. 7. MAT I 1. 2. 3. 4. 5.	Objetivo geral Objetivo específico ERIAIS E MÉTODOS Amostra populacional Coleta do sangue e separação dos eritrócitos Coleta do sangue e separação dos eritrócitos Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) Determinação do nível total de mercúrio no sangue total Avaliação da função da hemoglobina	45 45 46 46 46 47 47 48
4. 4. 5. 5. 5. 5. 5. 5.	6. 7. MAT I 1. 2. 3. 4. 5.	Objetivo geral Objetivo específico ERIAIS E MÉTODOS Amostra populacional Coleta do sangue e separação dos eritrócitos Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) Determinação do nível total de mercúrio no sangue total Avaliação da função da hemoglobina Estimativa da produção das espécies reativas de oxigênio em PBMCs	45 45 46 46 46 47 47 48 49
4. 4. 5. 5. 5. 5. 5. 5.	6. 7. MAT I 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.	Objetivo geral Objetivo específico ERIAIS E MÉTODOS Amostra populacional Coleta do sangue e separação dos eritrócitos Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) Determinação do nível total de mercúrio no sangue total Avaliação da função da hemoglobina Estimativa da produção das espécies reativas de oxigênio em PBMCs Preparação de eritrócitos para ensaios de estresse oxidativo	45 45 46 46 47 47 47 48 49 49
4. 4. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5.	6. 7. MAT I 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.	Objetivo geral Objetivo específico ERIAIS E MÉTODOS Amostra populacional Coleta do sangue e separação dos eritrócitos Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) Determinação do nível total de mercúrio no sangue total Avaliação da função da hemoglobina Estimativa da produção das espécies reativas de oxigênio em PBMCs Preparação de eritrócitos para ensaios de estresse oxidativo Atividade da superóxido dismutase (SOD)	45 45 46 46 46 47 47 47 49 49 49
4. 4. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5.	6. 7. MAT I 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 7.	Objetivo geral Objetivo específico ERIAIS E MÉTODOS Amostra populacional Coleta do sangue e separação dos eritrócitos Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) Determinação do nível total de mercúrio no sangue total Avaliação da função da hemoglobina Estimativa da produção das espécies reativas de oxigênio em PBMCs Preparação de eritrócitos para ensaios de estresse oxidativo Atividade da superóxido dismutase (SOD)	45 45 46 46 46 47 47 48 49 49 49 49 49
4. 4. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5.	6. 7. MAT I 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 7. 10.	Objetivo geral Objetivo específico ERIAIS E MÉTODOS Amostra populacional Coleta do sangue e separação dos eritrócitos Coleta do sangue e separação dos eritrócitos Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) Determinação do nível total de mercúrio no sangue total Avaliação da função da hemoglobina Estimativa da produção das espécies reativas de oxigênio em PBMCs Preparação de eritrócitos para ensaios de estresse oxidativo Atividade da superóxido dismutase (SOD) Atividade da catalase (CAT)	45 45 46 46 46 47 47 48 49 49 49 49 49 49 49 49
4. 4. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5.	6. 7. MAT I 1. 2. 3. 4. 5. 5. 6. 7. 8. 7. 10. 11.	Objetivo geral	45 45 46 46 46 47 47 47 49 49 49 49 49 50 50
4. 4. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5.	6. 7. MAT 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 7. 10. 11. 12.	Objetivo geral	45 45 46 46 46 47 47 47 49 49 49 49 49 49 50 50 50

	5.14.	Conteúdo do grupo sufidrila	51
	5.15.	Microscopia de fluorescência	52
	5.16.	Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	52
	5.17.	Espectroscopia Raman	53
	5.18.	Análise de dados	53
6.	RES	ULTADOS E DISCUSSÃO	54
	6.1. 6.2.	Características e exposição ambiental dos voluntários Perfil Bioquímico dos voluntários	54 55
	6.3. 6.4. 6.5. 6.6.	Quantificação de Hg no sangue Avaliação da funcionalidade e alterações estruturais em eritrócitos Produção de ânion radical de superóxido e peróxido de hidrogênio Morfologia de células mononucleares	58 59 62 64
	6.7. 6.8.	Atividade do sistema antioxidante em eritrócitos Marcadores secundários do estresse oxidativo em eritrócitos	65 67
7.	CON	ICLUSÕES	70
8.	PER	SPECTIVAS	70
9. H	EFE	ITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MERCÚRIO EM MODELO ANIMAL	71
9.	<i>1.</i> R	evisão da literatura	71
	9.1.1 A	terosclerose	71
	9.1.2 M	litocôndria	72
	9.1.3 T	ransição de permeabilidade mitocondrial	80
10). JI	JSTIFICATIVA	83
1	1. O	BJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	84
	11.1.	Objetivo Geral	84
	11.2.	Objetivo Específico	84
1:	3. M	ATERIAIS E MÉTODOS	86
	13.1.	Animais	86
	13.2.	Avaliação da função da hemoglobina	86
	13.3.	Determinação do nível total de mercúrio no sangue e órgãos	87
	13.4.	Preparação de eritrócitos para ensaios de estresse oxidativo	89
	13.5.	Atividade da superóxido dismutase (SOD)	89
	13.6.	Atividade da catalase (CAT)	90
	13.7.	Atividade da glutationa peroxidase (GPx)	90
	13.8.	Contagem de glóbulos brancos por citometria de fluxo	90
	13.9.	Ensaio de fagocitose de macrófagos	91
	13.10.	Isolamento de mitocôndrias de fígado	91
	13.11.	Respiração mitocondrial	91

13.	12.	Potencial de membrana mitocondrial	92
13.	13.	Análise bioquímica do plasma	92
13.	14.	Preparação de tecido homogeneizado para marcadores clássicos e secundários	92
13.	15.	Quantificação do estado redox (relação GSH/GSSG)	93
13.	16.	Peroxidação lipídica (teor de malondialdeído – MDA)	93
13.	17.	Teor de carbonil de proteína	93
13.	18.	Conteúdo do grupo sufidrila	94
13.	19.	Análise de dados	94
14.	R	ESULTADOS	. 95
14.	1.	Análises bioquímicas e desenvolvimento corporal	95
14.2	2.	Quantificação de mercúrio no sangue e nos tecidos	97
14.	3.	Prova de função hepática e renal	98
14.4	4.	Imagens histólogicas dos tecidos	99
14.3	5.	Funcionalidade da hemoglobina medida através da captação de oxigênio em eriti 102	rócitos
14.0	6.	Contagem de células brancas do sangue	103
14.	7.	Atividade fagocítica dos macrófagos	105
14.8	8.	Produção de citocinas	105
14.9	9.	Funcionamento da cadeia transportadora de elétrons	107
14.	10.	Poro de transição de permeabilidade mitocondrial	108
14.	11.	Produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial	109
14.	12.	Sistema antioxidante em eritrócitos	110
14.	13.	Marcadores secundários do estresse oxidativo	112
15.	C	ONCLUSÕES	115
16.	RE	EFERÊNCIAS	116

1. INTRODUÇÃO GERAL

O mercúrio (Hg) está entre os dez principais poluentes ambientais em uma lista de 275 elementos tóxicos publicado pela Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças na Divisão de Toxicologia e Ciências da Saúde (ATSDR) e pode causar diversos efeitos adversos nos meios biológico (ATSDR, 2017). Embora o Hg esteja presente na natureza, ele também é liberado no meio ambiente por séculos como resultado de atividades antrópicas (indústrias, mineração, hospitais e lixo doméstico) (ROCHA et al., 2012).

A exposição humana a esses contaminantes inorgânicos (CI) e orgânicos como o metilmercúrio podem levar ao estresse oxidativo que acarreta em disfunções diversas, tais como, neurológicas, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, inflamação, doenças neurodegenerativas, dentre de outras patologias (DO NASCIMENTO et al., 2014, HUGHES et al., 2016, XU et. al, 2018, FLORA et al., 2008). Tal estresse oxidativo pode alterar a atividade de enzimas e depletar o sistema antioxidante. Estudos recentes têm demonstrado relação direta da exposição a CI no meio ambiente (água e alimentos) com suas concentrações em amostras biológicas e biomarcadores de estresse oxidativo (CROTTO et al., 2010, DOBRAKOWSKI et al., 2016, MA et al., 2016)

No estado de Alagoas, a Lagoa Mundaú (que faz parte do Complexo Estuarino Mundaú-Manguaba) é uma importante fonte de peixes e moluscos (especialmente o bivalve sururu, *Mytella charruana*) para a população ribeirinha, sendo uma fonte de renda para o estado de Alagoas (ABR, 2019). Recentemente, o nosso grupo de pesquisa estabeleceu uma possível correlação entre contaminação ambiental e parâmetros bioquímicos associados à qualidade da saúde desta população (SILVA-FILHO et al., 2021). Neste estudo, verificamos que dos 14 elementos monitorados na água do CELMM, sistematicamente por dois anos, os níveis de Hg, Pb, Al, Zn, Fe, Mn, Sn e Bi apresentaram concentrações superiores aos limites estabelecidos pela legislação (DOS SANTOS et al., 2021), com destaque para Hg e Pb. As células mononucleares dos pescadores que vivem em torno de tal ambiente tiveram um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, bem como os eritrócitos apresentaram outras modificações, como no sistema redox e na integridade da membrana.

Na literatura já está bem estabelecido que a exposição ao mercúrio leva a aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esse estresse pode resultar na oxidação de várias biomoléculas, como por exemplo do colesterol presente nas lipoproteína de baixa densidade (LDL-C). Estudos indicaram uma associação direta entre a exposição ao mercúrio e aterosclerose (FARKHONDEH et al., 2020).

Existem cinco classes principais de lipoproteínas plasmáticas (LP) transportadoras de colesterol e outros lípides, sendo a LDL é uma delas (BROWN & GOLDSTEIN, 1986). Uma vez dentro da célula, o colesterol que também pode ser derivado das LP, bem como sintetizado pela própria célula, exerce várias ações regulatórias, incluindo a supressão da expressão da enzima que catalisa a etapa limitante da biossíntese do colesterol (a HMG-CoA redutase) e a supressão da transcrição do gene do receptor da LDL (GOLDSTEIN & BROWN, 1992). Desta forma, não ocorre um acúmulo excessivo da concentração de colesterol dentro da célula.

A concentração elevada de LDL plasmática resulta em um aumento da quantidade de LDL na corrente sanguínea e isso pode ocorrer devido uma mutação que ocorre no receptor de LDL inviabilizando a sua captação nos tecidos. A hipótese de modificação oxidativa da aterogênese propõe que os altos níveis de LDL são o principal alvo da oxidação por EROS no espaço subendotelial arterial, dando início a formação da placa da aterosclerose (QUE et al. 2018, STEINBERG, 2019); pois a LDL oxidada induz a ativação do sistema imune. Na ativação do sistema imune ocorre o recrutamento de monócitos circulantes, que se diferenciam em macrófagos que de uma forma contínua captam essa LDL modificada transformando-se em células espumosas ingurgitadas de colesterol (STEINBERG, 2019). Os camundongos knockout para receptores de LDL desenvolvem à aterosclerose (LDLr⁻/⁻, C57BL/6J background) (BROWN & GOLDSTEIN, 1986). Sendo assim, esse modelo animal é de suma importância para se estudar, uma das doenças que mais mata no mundo, a aterosclerose.

Em suma, este trabalho tem intuito de avaliar os efeitos da contaminação do Hg em sistemas biológicos, seja uma contaminação ambiental, como a que ocorre nos pescadores que habitam o CELMM, seja em um modelo animal com hipercolesterolemia com propensão à aterosclerose.

20

2. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MERCÚRIO EM PESCADORES (COMPLEXO LAGUNAR MUNDAÚ-MANGUÁBA – CELMM)

2.1. Revisão da literatura

2.1.1. Poluição ambiental e como atinge a população global

A poluição ambiental, ou seja, resíduos indesejados provenientes de atividades antrópicas humana liberados no ar, terra, água e oceano sem levar em consideração o custo ou a consequência é uma ameaça existencial à saúde humana e do planeta. A poluição inclui a contaminação do ar por material particulado fino (PM 2.5 µm), por ozônio, óxidos de enxofre e nitrogênio; poluição da água doce e contaminação do oceano por mercúrio, nitrogênio, fósforo, plástico e resíduos de petróleo; e contaminação da terra por chumbo, mercúrio, pesticidas, produtos químicos industriais, lixo eletrônico e lixo radioativo (SLY et al., 2016). A poluição é a maior causa de doenças e mortes em países de baixa e média renda (LANDRIGAN & FULLER, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 13 milhões de mortes em todo o mundo, a cada ano, são resultados de causas ambientais evitáveis (OMS, 2022). De acordo com a OMS, em 2015, cerca de 5,9 milhões de crianças com menos de cinco anos de idade morreram e as principais causas de morte de crianças em todo o mundo foram pneumonia, prematuridade, complicações relacionadas com o parto, sepse neonatal, anomalias congênitas, diarreia, traumatismos e malária. A maioria dessas doenças em tais condições são causadas, ao menos de forma parcial, pelo ambiente (OMS, 2016).

A Comissão Lancet de 2017 sobre poluição e saúde, que usou dados do Estudo Global de Carga de Doenças, Lesões e Fatores de Risco (GBD, 2015), descobriu que a poluição foi responsável por cerca de 9 milhões de mortes (16% de todas as mortes globalmente). A Comissão observou ainda a profunda desigualdade da poluição: 92% das mortes relacionadas à poluição e a maior carga de perdas econômicas da poluição ocorrem em países de baixa e média renda. Em 2019, a poluição foi responsável por aproximadamente 9,0 milhões de mortes prematuras. Uma comparação dos efeitos da poluição na morbidade e mortalidade com os de outros fatores de risco mostra que a poluição continua a ser um dos maiores fatores de risco para doenças e morte prematura globalmente (Figura 1A). O impacto da poluição na saúde continua muito maior do que a violência, lesão em estradas, da malária, do HIV, da tuberculose, das drogas e do álcool, e o número de mortes causadas pela poluição está no mesmo nível das causadas pelo fumo (Figura 1B). Quando subdividimos os tipos de poluição, a poluição do ar continua sendo responsável pelo maior número de mortes, causando 6,7 milhões de mortes em 2019.

Figura 1. Estimativas de mortes causadas por poluição. (A) Número de mortes por 100.000 pessoas que são atribuídas a todos os tipos de poluição. (B) Estimativa de mortes por fatores no mundo.



Fonte: Adaptado de LANDRIGAN & FULLER, 2015; FULLER et al., 2022.

O crescimento populacional desenfreado, industrialização, urbanização descontrolada é uma das causas do aumento da poluição no mundo (ONU, 2022). A

22

poluição é um problema substancial que põe em perigo a saúde de bilhões, degrada os ecossistemas da Terra, mina a segurança econômica das nações e é responsável por uma enorme carga de mortes prematuras, incapacidades e doenças que podem estar ligadas ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DNTs) devido a exposições ambientais precoces incluem distúrbios do desenvolvimento neurocomportamental, asma adulta e pediátrica, hipertensão, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (SLY et al., 2016).

A contaminação ocupacional em ambiente de trabalho foi associada a irritação da membrana mucosa, náusea, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, supressão imunológica, doenças hepáticas agudas e crônicas e câncer (IARC, 2004; IARC, 2015; SELIM, 2010). Um exemplo de problemas ocasionados pela exposição a poluentes no ambiente industrial como, material particulado, hidrocarbonetos, chumbo (Pb), mercúrio (Hg), cádmio (Cd), arsênico (As), cromo (Cr) entre outros contaminantes (KAMAL et al., 2012; HOUESSIONON, 2021).

Estima-se que cerca de 489 mortes por milhão, no Brasil, estão relacionadas com a poluição total (Figura 2). Apesar da importância desses dados, os estudos sobre poluição no Brasil são escassos, sendo assim necessário uma maior exploração de estudos que avaliem o prejuízo causado por diferentes tipos de poluições ao meio ambiente e por consequência na população. Em um levantamento, estimou-se que o Brasil produz em média cerca de 10 artigos por ano sobre poluição do ar, da água e particulados em humanos. Esses estudos sobre contaminação estão ganhando cada vez mais espaço devido à condição ambiental do planeta (FAJERSZTAJN et al., 2013).

Figura 2. Estimativa das mortes causadas por poluição total no mundo. A figura destaca especificamente o número de mortes no Brasil.



Fonte: Adaptado de https://www.pollution.org/. Acessado em abril de 2023, às 17:57h.

A contaminação causa diversas alterações ecológicas afetando diretamente a cadeia alimentar, sendo uma das consequências da atividade antropogênica humana, que polui ambientes que possuem água fresca essencial para a biodiversidade de rios, lagos, lagunas e mares (SARAH et al., 2019). A geração de poluentes leva a deterioração dos ecossistemas e alteram o desenvolvimento de organismos que por sua vez podem servir como bioacumuladores de contaminantes, perpetuando a contaminação na cadeia alimentar (LU et al., 2021), bem como a contaminação aquática pode gerar contaminação dos ecossistemas terrestre (SCHULZ et al., 2015). Assim, é necessário o desenvolvimento de estudos frente aos possíveis contaminantes ambientais bem como os possíveis danos aos organismos vivos.

2.1.2. Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguába (CELMM)

O complexo estuarino lagunar Mundaú-Manguába é um dos mais importantes ecossistemas do Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil, situado na parte central do litoral alagoano localizado entre as latitudes 9°35' e 9°45' Sul e entre as longitudes 35°44' e 35°58' Oeste de Greenwich, possui uma costa de aproximadamente 230 quilômetros abrangendo áreas dos municípios de Maceió, Marechal Deodoro, Pilar, Rio Largo, Satuba, Santa Luzia do Norte e Coqueiro Seco. Estando situado em uma região que se destaca por diversos fatores, como extensão de suas lagunas, proximidade da capital (Maceió), número de pessoas envolvidas em atividades de pesca, produtividade, problemas ambientais e sociais (Figura 3); apresentando uma rica variedade de fauna e flora (SOUZA & REIS, 2004, ARAUJO & CALADO, 2008).

Devido às suas características, as lagunas possuem uma grande importância tanto ambiental quanto econômica, podendo ser utilizadas em diversas atividades humanas, como pesca, alimentação, turismo e lazer, bem como na irrigação e no abastecimento de água. Desta forma, se faz necessário o monitoramento das alterações ambientais e processos naturais que por ventura são provocadas por atividades antrópicas (SILVA et al., 2022, LACERDA, 1994, KJERFVE & MAGILL, 1989).



Figura 3. Mapa de Localização do CELMM.

Fonte: Silva et. al. 2022

O CELMM é um importante ecossistema que possui influência direta ou indireta em aproximadamente 84% da população do estado de Alagoas (ANA, 2004). Tal complexo possui uma grande diversidade de espécies de peixes e moluscos, mas vem sofrendo degradação ambiental acelerada devido as atividades antrópicas que fazem o uso inadequado do solo por práticas agrícolas principalmente a de cana de açúcar juntamente com o crescimento humano, a falta de saneamento, aumento de complexos industriais, extração de matérias primas do solo, bem como dutos para transporte de óleo, gás e produtos químicos. Desta forma, todos esses fatores têm um grande impacto nessa área, afetando cerca de 260 mil habitantes que vivem no seu entorno, 38 colônias de pescadores e 5.000 pescadores (PESCA, 2019). Um exemplo de um alimento oriundo do CELMM é o molusco bivalve sururu (*Mytilopsis charruana*), que é bastante consumido e comercializado. O sururu serve também como bioindicador de poluição ambiental e dos possíveis efeitos tóxicos que podem ser causados à saúde humana. A baixa oxigenação, águas poluídas com carga excessiva de sedimento e metais, e alto índice de salinidade e temperatura levou ao desaparecimento de tal espécie do CELMM entre 2022 até o início de 2023 (UFAL, 2023; SANTOS et al., 2021).

Essas condições descritas anteriormente no que concerne a situação da água da laguna são ideais para o desenvolvimento de uma espécie invasora, o *Mytilopsis sallei*, popularmente conhecido como "sururu branco", que recentemente tem preocupado órgãos ambientais, desafiado pesquisadores e colocado em risco o sururu preto (*Mytilopsis charruana*), pois esse sururu invasor é impróprio para o consumo (UFAL, 2023).

Estudos no CELMM vêm relatando elevados teores de metais potencialmente tóxicos como: cádmio, chumbo e, nos últimos anos, têm se quantificado teores significativos de espécies de mercúrio. Uma vez no ambiente, esses metais podem interagir com a matéria orgânica natural que poderá influenciar na mobilização, degradação e transporte dessas espécies no ambiente (GONÇALVES, 2022). Sabese que os íons metálicos como cobre, ferro, manganês e zinco, são micronutrientes essenciais e fundamentais nos processos de função fisiológica para a maioria dos seres vivos (SILVA & SOUSA, 2009). Já o chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio são elementos considerados mais perigosos para a saúde humana e meio ambiente. Tais elementos têm sido amplamente estudados e os efeitos de tais íons nos seres humanos têm sido regularmente revistos por órgãos internacionais como a OMS (MONTEIRO, 2017).

Entre junho de 2017 e setembro de 2018, Santos & cols (2019) realizaram coletas na laguna Mundaú identificando as espécies químicas Hg, Pb, As e Cd, as quais estão dentre as 126 substâncias tóxicas indicadas pela Agência para Substâncias Tóxicas e Lista de Prioridades de Registros de Doenças de Substâncias Perigosas. Nessas análises, o As estava com concentrações abaixo do que é estabelecido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (Resolução 357° de 2005) e OMS para águas salobras. Quanto ao Pb, teve cerca de 11 e 123 vezes maior na laguna Mundaú do que foi preconizado pela OMS e CONAMA. A concentração máxima de Hg na água foi 7,8 vezes maior do que o estabelecido pelo

26

CONAMA e 15,6 vezes maior do que o estabelecido pela OMS. Os valores de Cd estiveram abaixo do limite de quantificação (<LOQ).

Tabela 1. Concentrações de elementos encontrados na laguna Mundaú e os limites preconizados pelo CONAMA¹ e OMS².

Elemento	[Mínima] µg/L	[Máxima] µg/L	Valor máx. [µg/L] CONAMA¹	Valor máx. [µg/L] OMS²
Arsênio (As)	0,08	1,80	10	10
Chumbo (Pb)	114,0	1230,0	10	10
Mercúrio (Hg)	0,012	1,56	0,2	0,1
Cadmio (Cd)	<loq< td=""><td>5</td><td>3</td></loq<>		5	3

¹Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para água salobra (classe 1); ²Organização mundial de saúde (OMS) para água própria para consumo. Valores referentes ao elemento total, sem especiação. Fonte: Adaptado de Santos, M.C., 2019. <LOQ: abaixo do limite de quantificação (SANTOS et al., 2021).

Esses dados sugerem que a população de pescadores da laguna Mundaú se encontra em condição de vulnerabilidade, já que dependem da pesca como renda familiar e consumo próprio, além do contato direto com a água contaminada por altos níveis de Hg e Pb. O que se confirmou em pesquisa realizada por Silva-Filho (2019), na qual se mostraram os altos níveis de Hg no sangue 9,59 µg L⁻¹ e urina 2,15 µg L⁻¹ dos pescadores da região

2.1.3. Mercúrio e sua toxicidade

O Mercúrio tem como símbolo o Hg (200,59 g/mol), e é pertencente ao grupo 12 da família IIB da tabela periódica, seu número atômico é 80 – encontrado na natureza na forma de um minério chamado de cinábrio (HgS). Suas propriedades físicas são baixos pontos de ebulição (356,7 °C), fusão (-38,89 °C), e densidade de 13,55 g/cm³. Além disso, também é um metal que, em temperatura ambiente, se encontra no estado líquido e por isso recebeu nomes como prata-viva (MIESSLER et. al. 2014).

O Mercúrio existe em várias formas químicas: mercúrio elementar (Hg⁰), mercúrio inorgânico, que está na forma de íons como o mercúrio mercuroso (Hg⁺). Um exemplo dessa espécie é cloreto mercuroso, onde dois átomos de mercúrio estão ligados para dar a fórmula química Hg₂Cl₂ e o mercúrio mercúrico (Hg²⁺), além da forma orgânica, que o Hg está ligado covalentemente a um ou mais átomos de carbono e são considerados os mais tóxicos, sobretudo os que contêm radicais de cadeia curta metil, etil e propil. A exposição a cada espécie resulta em efeitos toxicológicos específicos e gerais em crianças e adultos (SATOH, 2000; CLARKSON et al., 2003; OMS, 2007).

Em processos de extração de minérios, o mercúrio é liberado no ambiente principalmente a partir do sulfeto de mercúrio. Alguns sais de mercúrio são considerados mais importantes e utilizados, sendo eles: cloreto de mercúrio (HgCl₂); cloreto mercuroso (Hg₂Cl₂), chamado calomelano, que foi empregado como purgativo e vermífugo; fulminato de mercúrio Hg(CNO)₂, utilizado como detonador em explosivos, e sulfeto de mercúrio (HgS), pigmento vermelho muito utilizado até meados do século XX (MIRANDA et al., 2007).

Vale ressaltar que o mercúrio é uma substância presente na natureza, encontrado no ar, solo e na água, por isso realiza o ciclo biogeoquímico natural (Figura 4) proveniente das emissões geradas em atividades vulcânicas, processos geotérmicos e até volatização dos oceanos. O mercúrio presente na atmosfera é predominantemente o mercúrio elementar (Hg⁰), porém sofre reações de oxidação sendo convertido em mercúrio inorgânico (Hg²⁺) e em ambientes aquáticos por ter uma reatividade maior, é capaz de interagir com bactérias e ser convertido em espécies orgânicas como metilmercúrio (⁺HgMe) ou em um ciclo complexo para formação de sais insolúveis (BISINOTI et al., 2004; WASSERMAN et al., 2001).

Figura 4. Ciclo biogeoquímico do mercúrio.



Fonte: BISINOTI et al., 2004.

As atividades antrópicas humanas como mineração e industriais intensificam a contaminação do ambiente, muitas vezes aumentando sua concentração e consequentemente as reações que formam espécies de mercúrio mais agressivas que acumulam nesses ecossistemas, causando riscos a saúde humana (CICEK-SENTURK et al., 2014).

A intoxicação por mercúrio elementar geralmente é causada pela inalação de seu vapor, que pode ocorrer em casa ou no laboratório através dos termômetros quebrados que contêm mercúrio. O Hg atravessa facilmente as membranas celulares, pois possui alta capacidade lipofílica, desta forma atravessa facilmente barreira hematoencefálica, atingindo diretamente o sistema nervoso central e se depositando rapidamente nos tecidos (CICEK-SENTURK et al., 2014).

Quanto ao mercúrio inorgânico, a exposição é ocupacional e essa forma divalente pode reagir com diversas moléculas intracelulares (canais iônicos, transportadores, enzimas, tióis não-proteicos). Isso leva a uma falha em diversas funções celulares e processos de detoxificação são prejudicados (CARMAN et al., 2013). Além do cérebro, os rins também são fortemente afetados pela toxicidade do mercúrio (CARNEIRO et al., 2014).

No caso do mercúrio orgânico, a principal via de exposição humana é o consumo de pescados ou contato com a água contaminados por metilmercúrio (+HgMe), que é uma das formas mais tóxicas e é rapidamente e muito absorvido (cerca de 95%) no trato gastrointestinal, sendo distribuído no corpo e atravessando facilmente as barreiras placentária e hematoencefálica (CARMAN et al., 2013). Cabe ressaltar que os riscos por consumo de pescados e mariscos dependem da quantidade ingerida e dos níveis de mercúrio presentes em tais organismos (CETESB, 2017).

Quando o mercúrio entra na corrente sanguínea, pode estabelecer ligações químicas específicas com proteínas e biomoléculas, acoplando-se covalentemente a grupos sulfidrilícos (NESCI et al., 2016). O Hg tem muita afinidade por grupos sulfidrila (–SH) isso é explicado pela a teoria Pearson que afirma que bases moles, como os grupos tióis, (espécies capazes de doar pares de elétrons) interagem preferencialmente com ácidos moles, como o Hg, (espécies capazes de receber pares de elétrons) (MALONE, 2002). E o mercúrio por ser caracterizado como um ácido mole, tem alta afinidade com benzeno, íons como cianeto, monóxido de carbono e grupos que apresentam tióis em sua estrutura (R-SH), por exemplo, cisteína ou

29

glutationa, formando complexos de ⁺HgMe e cisteína (⁺HgMe-Cys). Portanto, a distribuição do Hg no sangue para os tecidos é lenta e o equilíbrio ocorre aproximadamente quatro dias após a exposição (SYVERSEN et al., 2012; SHRIVER et al., 2008).

Metais tóxicos, em geral, e os compostos mercuriais, em particular, são tóxicos para o sistema imunológico humano. Sendo um potente apoptogênio de células T humanas; além disso, as mitocôndrias é uma organela alvo para a indução da morte celular, pois o papel da mitocôndria em linfócitos está relacionado com a modulação da geração de espécies reativas de oxigênio, status de tiol e ativação de caspases (SHENKER et al., 1993b; POLLARD AND HULTMAN, 1997; CLARKSON, 1997).

A exposição ao mercúrio pode desencadear uma série de eventos celulares prejudiciais. O mercúrio tóxico pode esgotar as reservas de tiol nas células, levando à translocação do citocromo c da mitocôndria para o citosol. Esse esgotamento de tiol aumenta a suscetibilidade das células à apoptose induzida pelo mercúrio (SHENKER et al., 1999; CLOSE et al., 1999). Além disso, a análise molecular revelou uma redução significativa na expressão de genes essenciais para o sistema antioxidante celular, como a glutationa S-transferase e a glutationa peroxidase, após exposição ao mercúrio (SHENKER et al., 2002). A ativação das caspases 8, 9 e 3, juntamente com a modificação da expressão dessas caspases, sugere a ativação de vias de sinalização da morte celular (SHENKER et al., 2002; GUO et al., 1998).

O mercúrio também demonstrou influenciar a expressão gênica, afetando a sobrevivência celular e induzindo apoptose. Esses achados sugerem que a mitocôndria é o principal alvo do mercúrio e que a indução do estresse oxidativo desempenha um papel crítico nesse processo. Estudos prévios destacaram a capacidade do mercúrio de modular a síntese e a atividade das enzimas antioxidantes endógenas, indicando uma resposta fisiopatológica compensatória aos efeitos oxidativos do mercúrio (HIROTA et al., 1980; ERCAL et al., 2001; FURST, 2002).

O potencial bioacumulativo e de toxicidade desse metal é muito preocupante e seus efeitos perduram por um longo tempo. Desta forma, é necessário um alerta para as populações que vivem entorno de lagunas e rios contaminados, já que essas populações apresentam maior vulnerabilidade e tendência a ter mercúrio no organismo quando este está presente no ambiente (BASU et al., 2018).

30

2.1.4. Células do sangue (eritrócitos e mononucleares)

O sangue é constituído por três diferentes linhagens celulares: glóbulos vermelhos, eritrócitos ou hemácias; glóbulos brancos ou leucócitos; e plaquetas ou trombócitos. Possui uma média de 50 à 60% de volume líquido, sendo maior parte constituído de água e os outros componentes incluem íons, glicose, aminoácidos, metabólitos, proteínas e hormônios (MAERTENS DE NOORDHOUT et al. 2017). Os eritrócitos e as células mononucleares serão destacados por serem os tipos celulares utilizados em nosso estudo para avaliar a influência do mercúrio na função, no estado redox, modificações estruturais e morfológicas como modelos de toxicidade celular pelo Hg.

2.1.4.1. Eritrócitos e Hemoglobina

As hemácias, também denominadas eritrócitos ou glóbulos vermelhos, são as células mais numerosas do sangue, cuja forma é de disco bicôncavo com espessura maior da margem (2,6 µm) e espessura menor no centro (0,8 µm) (BEU et al., 2017). Os eritrócitos são produzidos na medula óssea, esse processo possui diversas fases (Figura 5), sendo elas: síntese do DNA e transcrição e tradução, síntese de hemoglobina com incorporação de átomos de ferro, excisão nuclear e perda de organelas, como a mitocôndria, para dar como produto final o glóbulo vermelho que têm vida média estimada em 120 dias. Depois desse período, estes são retirados da circulação pelo sistema mononuclear fagocitário (OLIVEIRA, 2003; ZAGO, 2013).



Figura 5. Processo de formação do heme e os eritrócitos.

Fonte: Adaptado de Princípios de Bioquímica de Lehninger, 8ª edição, 2022.

A membrana eritrocitária bioquimicamente é composta por 19,5% (peso/peso) de água, proteínas (39,6%), lipídeos (35,1%) e carboidratos (5,8%). Apresenta dupla camada de fosfolipídios, essa bicamada possui proteínas de membrana integrais ancoradas através dos domínios hidrofóbicos de suas sequências de aminoácidos. A membrana é semipermeável, possuindo canais para o transporte de íons, ela só é permeável a água e ânions, e relativamente impermeável a cátions (OLIVEIRA, 2003).

O metabolismo dessa célula é limitado à degradação anaeróbica da glicose, o seu transporte é realizado pela GLUT-1, glicoproteína de aproximadamente 55 kDa e ocupa cerca de 2% do conteúdo das proteínas presentes na membrana eritrocitária (NELSON & COX, 2022). Assim que os eritrócitos captam e internalizam a glicose, esta é metabolizada pela via glicolítica (10 reações), gerando o piruvato que é então convertido em lactato pela enzima lactato-desidrogenase (LDH). A redução do piruvato à lactato pela fermentação láctica é dependente de NADH + H⁺, liberando NAD⁺ e como saldo final da glicólise se tem duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato) gerados através da fosforilação ao nível do substrato, na 7^a e 10^a reação onde o 1-3-bifosfoglicerato e o fosfoenolpiruvato, são convertidos a 2-fosfoglicerato e piruvato, pelas enzimas fosfoglicerato mutase e piruvato cinase, respectivamente **(Figura 6)** (NELSON & COX, 2022).

Figura 6. Duas fases da glicólise.



Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 8ª edição, 2022.

A hemoglobina é uma proteína transportadora de oxigênio dos eritrócitos (5,5 nm, M_r 64.500), que contêm quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias do tipo β com 146 aminoácidos e duas cadeias α com 141 aminoácidos (Hb= $\alpha_2\beta_2$) e quatro grupos prostéticos heme, cada uma das cadeias polipeptídicas com um anel protoporfirínico, nos quais os átomos de ferro se apresentam no estado ferroso (Fe²⁺) (Figura 7) (NELSON & COX, 2022; OLIVEIRA, 2003). Estas cadeias não possuem ligações covalentes entre si, estão espacialmente formando um tetrâmero. Sua

estrutura tridimensional só foi desvendada em 1959 por Max Perutz, John Kendrew e seus colaboradores (NELSON & COX, 2022; OLIVEIRA, 2003).

Figura 7. Estrutura da molécula de hemoglobina. Estruturas das cadeias polipeptídicas $\alpha \in \beta$, grupo prostético heme com átomo de Fe²⁺.



Fonte: Adaptado de Bioquímica nas escolas, 1ª edição, 2014.

A função da hemoglobina é de transporte de O₂ dos pulmões para os tecidos, e do CO₂ recolhido ao nível dos capilares teciduais para os pulmões. Quando o oxigênio se liga a hemogobina, isso leva à mudança de cor do sangue venoso na forma de desoxiemoglobina, vermelho-escuro para o vermelho-brilhante do sangue arterial conhecido como oxiemoglobina (NELSON & COX, 2022).

O monóxido de carbono (CO) e o óxido nítrico (*NO) têm uma afinidade maior pelo ferro presente no heme do que o oxigênio (O₂). Isso ocorre devido à forma como essas moléculas interagem com o sítio de ligação do ferro no heme. No entanto, a ligação do CO com o Fe²⁺ não ocorre devido aos fatores de regulação da ligação com o O₂, que são influenciados pela interação proteína-ligante (SCHECHTER, 2008).

Essa interação proteína-ligante cria um impedimento estérico devido ao ângulo de ligação, o que impede que o CO se ligue ao ferro. Para que o heme possa se ligar ao oxigênio, são necessárias mudanças conformacionais que facilitam essa ligação. No estado inicial chamado de T (Tenso) desoxiemoglobina, a porfirina promove um deslocamento do ferro em direção à histidina proximal (His F8). Isso cria um ambiente

propício para a ligação do O₂, pois o ferro é movido para uma posição mais favorável para interagir com a molécula de oxigênio (SCHECHTER, 2008).

Após a primeira molécula de O₂ se ligar, acarreta em mudanças conformacionais facilitando a ligação da próxima molécula de O₂, desta forma, a hemoglobina sai do estado T para o estado R (relaxado) (**Figura 8**) de maior afinidade com o O₂, o que é chamado de ligação cooperativa, que se dá devido a alterações conformacionais na estrutura da hemoglobina que tornam mais facil a ligação do oxigênio com o heme. Um outro fator que influência na ligação cooperativa é o pH, pois em tecidos metabolicamente ativos a produção de dióxidos de carbono é alta e o pH tende a diminuir, o que faz com que a hemoglobina perca a afinidade pelo oxigênio (SCHECHTER, 2008; NELSON & COX, 2022).

Figura 8. A transição T \rightarrow R. A transição do estado T para o estado R altera de modo considerável os pares de subunidades, afetando determinados pares iônicos.





Os prejuízos causados por danos oxidativos em eritrócitos podem levar, além da perda de funcionalidade da Hb, a disfunção na célula. Quando a pressão de oxigênio diminui nos eritrócitos ocorre um aumento de uma possível ligação da Hb na membrana dos eritrócitos, o que facilita a produção de espécies reativas e a oxidação da Hb. Isso leva à geração de estresse oxidativo e por consequência danos na membrana e hipoxia dos tecidos (RIFKIND et al., 2003, REMIGANTE et al., 2021). No plasma são formadas as espécies H₂O₂ e 'NO que causam prejuízos nos eritrócitos afetando sua integridade e estabilidade (EL-MISSIRY & ABOU-SEIF, 2000; NIKOLIĆ-KOKIĆ, BLAGOJEVIĆ e SPASIĆ, 2010). Além disso, há as vias das enzimas

NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, dentre outras, que usam O₂ para formar O₂⁻⁻ em células sanguíneas (NAKAMURA, GOTO e KOYAMA, 1987).

Estudos que avaliam exposição a contaminantes mostram uma influência no sistema redox dos eritrócitos, isso porque o primeiro contato com esses contaminantes é via corrente sanguínea (EL-MISSIRY & ABOU-SEIF, 2000; NIKOLIĆ-KOKIĆ, BLAGOJEVIĆ e SPASIĆ, 2010; NAZIMA, MANOHARAN e MILTONPRABU, 2020). Desta forma, destacam-se estudos que avaliam o prejuízo causado por espécies tóxicas em eritrócitos, como na exposição ao cádmio que causa uma redução do sistema redox de ratos expostos, pois leva a uma diminuição do nível de GSH devido aos danos oxidativos gerados nos eritrócitos. Ainda ocorreu a redução de atividade da SOD, CAT e GPx enzimas importantes na detoxificação de tais espécies reativas (NAZIMA, MANOHARAN e MILTONPRABU, 2020).

Outros trabalhos realizados com espécies tóxicas (Hg, Pb, Cd) mostram alterações nos níveis de tióis e inibição da atividade antioxidante o que afeta a biossíntese do heme inibindo a enzima δ -aminolevulínico-desidratase, resultando no produto ácido δ –aminolevulínico que por sua vez, gera a maior produção de O₂⁻⁻ (JADHAV et al., 2007; KULICZKOWSKI et al., 1981; AHAMED & SIDDIQUI, 2007).

2.1.4.2. Leucócitos (Célula Polimorfonuclear e Mononuclear)

As células brancas denominadas de leucócitos, são células do sistema imune. São divididos em dois grupos: os granulócitos ou polimorfonucleares – leucócitos que contém granulações abundantes no citoplasma e os agranulócitos – leucócitos que são praticamente desprovidos de granulações citoplasmáticas. As células granulares incluem os basófilos, neutrófilos e eosinófilos. Já os agranulócitos são os monócitos e linfócitos que são comumente conhecidos como células mononucleares (Figura 9) (OLIVEIRA, 2003; BALESTIERE, 2006).
Figura 9. Leucócitos agranulócitos (mononucleares) e granulócitos (polimorfonucleares).



Fonte: Autor, 2023.

Da família dos granulócitos, os basófilos possuem núcleo bi ou multilobado, constituem menos de 1% dos leucócitos sanguíneos e é responsável por expressar receptores de IgE. Como o número de basófilos em tecidos é pequeno sua função está mais relacionada com defesa contra reações alérgicas (AROCK, 2022; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2019). Os neutrófilos possuem núcleo segmentado contendo de 2 à 5 lóbulos, o percentual dessas células no sangue é de 55% nos leucócitos e atuam no organismo como sistema imune inato como primeira resposta aos invasores, defesa contra processos infecciosos promovidos por microorganismos, em especial bactérias, isso ocorre devido as suas propriedades de motilidade, quimiotaxia, fagocitose, ação bactericida e digestão de microorganismos (LIEW & KUBES, 2019). Um pouco maiores que os neutrófilos, os eosinófilos caracterizam-se pela presença de núcleo bilobulado, seu percentual no sangue é de 3% e suas granulações contém enzimas do tipo peroxidase, fosfatase ácida, fosfolipases e histaminases, que eliminam os parasitas e algumas células tumorais (ROSENBERG, DYER & FOSTER, 2012).

Da família dos mononucleares, os monócitos estão presentes no sangue em percentuais de 6,5%. Permanecem pouco tempo no sangue (cerca de 8 horas) e passam para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos e células dendríticas fazendo parte do sistema mononuclear fagocitário (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2019). Participam ativamente da fagocitose, onde desempenham um papel importante

no desenvolvimento e na homeostase, em parte através da remoção de células apoptóticas e eliminação de compostos tóxicos, além de integrar a imunidade humoral e celular pois iniciam a resposta imune (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2019; BALESTIERE, 2006; AUFFRAY, 2009). Quando ativados por infecção os monócitos liberam IL-1, TNFα e ativação óxido nítrico sintase induzível (iNOS) para iniciar o processo inflamatório, que estimulam os linfócitos T, células endoteliais e fibroblastos (INGERSOLL et al., 2011; KARLMARK et al., 2012).

Os linfócitos constituem de 20% a 40% dos leucócitos e são divididos em dois subtipos: linfócitos T e B, desempenhando um papel crucial na resposta adaptativa do sistema imunológico. Os linfócitos do tipo B têm atividades relacionadas à imunidade humoral, pois sintetizam anticorpos e os secretam após sua diferenciação em plasmócitos. Estes últimos são células que apresentam imunoglobulinas em sua superfície, adquiridas através do reconhecimento de antígenos, como a IgM, quando respondem à presença de microorganismos. Isso resulta na síntese de anticorpos capazes de neutralizar ou destruir esses antígenos (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2019; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Por sua vez, os linfócitos T (LT) atuam na imunidade mediada por células e na regulação da síntese de anticorpos, através da secreção de interleucinas que estimulam as células B, ou seja quando ativadas elas proliferam afim de aumentar sua quantidade e possam combater uma infecção. As células T auxiliares, também conhecidas como helper, desempenham um papel fundamental como mediadoras das interleucinas, além de regular o sistema imunológico ajustando a produção de células citotóxicas e de linfócitos B (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2019; KERN, 2002).

As células mononucleares, por possuírem mitocôndrias podem gerar espécies reativas, isso é, proveniente da cadeia transportadora de elétrons, ou por enzimas NADPH oxidase, xantina oxidase e a oxido nitrico sitase indutível (iNOS) (SIES, BERNDT & JONES, 2017). Substâncias tóxicas estranhas ao organismo também levam a efeitos de toxicidade nessas células. A exposição a HgCl₂ promove inflamação em células mononucleares e o metilmercúrio em baixas concentrações pode induzir morte de linfócitos e monócitos (PENTA et al., 2015; SHENKER, GUO e SHAPIRO, 1998).

Desta forma, como o papel do sistema imune é combater e eliminar corpos estranhos afim de manter a homeostase celular, estudar as células mononucleares na produção de espécies reativas é importante, porque é possível relacionar essa geração com fatores estressores, como a presença de substâncias químicas tóxicas, o que pode desencadear o estresse oxidativo e promover um mal funcionamento de órgão, além de estar relacionado ao aparecimento de diversas patologias.

2.1.5. Estresse oxidativo: produção de espécies reativa e sistema antioxidante

O estresse oxidativo é um termo que foi utilizado a primeira como uma disparidade entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes que por consequência pode resultar em danos aos sistemas biológicos (SIES, 1985). O estresse oxidativo envolve reações químicas com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Essas espécies possuem participação em processos que afetam a diferenciação celular, inflamação, envelhecimento, combate a agentes infecciosos, ação de drogas e toxicidade de drogas e químicos, desenvolvimento de câncer, dentre outros (SIES, 2015).

As espécies reativas (ERs) são moléculas e radicais livres que podem possuir um ou mais elétrons desemparelhados, sendo conhecidas por sua natureza radicalar ou não-radicalar (YANG, MIN & YU, 2020). Quando no metabolismo celular ocorre a superprodução de espécies reativas que podem ser de oxigênio, nitrogênio dentre outros, podem ocorrer diversos danos celulares e resultar em uma condição de estresse oxidativo, que por sua vez causa prejuízos em biomoléculas como proteínas, lipídeos e DNA, danificando todo o funcionamento celular podendo levar a morte celular (DROGE, 2002). Por isso é necessário que seja mantido as concentrações fisiológicas das espécies reativas e isso ocorre por meio da ação do sistema antioxidante, que promove a manutenção da homeostase redox da célula (DROGE, 2002).

A espécie reativa mais comunmente gerada é a de oxigênio e geralmente a sua reação ocorre quando o oxigênio sofre uma redução monovalente, pela qual um elétron fica desemparelhado em sua camada de valência, gerando o ânion radical superóxido (O₂^{•-}) (BOVERIS, OSHINO e CHANCE, 1972). A maior fonte da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o O₂^{•-}, na célula é via mitocondrial durante o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons (CTE) onde ocorre o vazamento de elétrons da semiquinona (UQH⁻⁻) que pode produzir cerca de 2-5% de ânion radical superóxido [2] (BOVERIS, OSHINO e CHANCE, 1972). Com a produção

de O2⁻ ocorrem diversas reações que formam várias ERs. Em sistemas biológicos o ânion radical superóxido sofre uma reação de dismutação pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD1, 2 ou 3), resultando na formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), espécie reativa não radicalar [3]. A primeira fonte de defesa do organismo é a SOD e ela possui três isoformas a SOD1 que é citosólica e dependente de cobre e zinco (Cu/Zn-SOD1), a SOD2 encontrada nas mitocôndrias, dependente de manganês (Mn-SOD2) e a SOD3 que é extracelular também dependente de Cu/Zn (NICHOLLS & FERGUSON, 2013).

$$UQH + O_2 \rightarrow UQ + O_2^{-}$$
 [2]

$$2O_2^{-} + 2H^+ + SOD \rightarrow SOD + H_2O_2 + O_2$$
 [3]

Como foi visto, a SOD transforma O_2^{--} em H_2O_2 , espécie não-radicalar uma reação rápida com uma constante de velocidade próxima a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ que é acelerada para $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pela superóxido dismutase (DESIDERI & FALCONI, 2003). O peróxido de hidrogênio ainda pode reagir com ferro através da reação de Fenton, onde na presença dos metais Fe²⁺, Cu⁺ e Cu²⁺, gera o radical hidroxil ('OH) [4]. Esse radical está entre as espécies mais tóxica, pois sua meia vida está em torno de 10^{-9} s (DESIDERI & FALCONI, 2003). No entanto, o H₂O₂ pode ser decomposto através de duas enzimas. Sendo uma delas a catalase (CAT) que possui um heme em sua estrutura (ferriprotoporfirina IX, Por–Fe³⁺) localizado no sítio ativo essencial para sua reação catalítica [5]. A reação enzimática da catalase é capaz de decompor moléculas de H₂O₂ em H₂O e O₂ (KIRKMAN e GAETANI, 2007).

$$Fe^{2+}/Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}/Cu^{2+} + OH + OH^{-}$$
[4]
CAT (Por-Fe³⁺ + 2H₂O₂) → Por-Fe⁴⁺ = O + H₂O [reação 1]
Por-Fe⁴⁺ = O + H₂O₂ → CAT + H₂O + O₂ [reação 2] [5]

A outra enzima é a glutationa peroxidase (GPx) que por ser uma selenoproteína tem a capacidade de decompor hidroperóxidos com auxílio do selênio. Essa enzima utiliza o tripepitídeo glutationa reduzida (GSH, formado por glutamato, glutamina e cisteína) em sua reação, para decompor o peróxido de hidrogênio em água [6]. A GPx ainda possui o auxílio indireto da glutationa redutase (GR), que via NADPH, restaura o GSH que é oxidado à GSSG na reação catalítica da GPx [7] (FLOHE et al., 1972; CHANCE, SIES e BOVERIS, 1979). Conjugada na reação da GPx, as glutationas (GSH) são importantes para o funcionamento do sistema redox celular. As glutationas são responsáveis por manter a homeostase redox, pelo qual os grupos tióis de proteínas podem manter seu estado redox ou tióis de proteínas oxidadas podendo ser reconstituido ao seu estado reduzido. As glutationas também podem atuar como doadoras de elétrons, seja para eliminação de oxigênio reativo ou para redução de hidroperóxidos e peróxidos lipídicos (MEYER e HELL, 2005).

$$GPx + 2GSH + 2H_2O_2 \rightarrow Gpx + 2GSSG + 2H_2O$$
[6]
$$NADPH + GR + GSSG \rightarrow GR + NADP^+ + GSH$$
[7]

Outras espécies reativas são as de nitrogênio (ERNs) que tem como a sua principal espécie reativa o óxido nítrico ('NO), uma espécie radicalar que é proveniente de reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase, que faz o uso de arginina um precursor do óxido nítrico liberando a citrulina (VALKO et al., 2007). O 'NO desempenha funções cruciais no sistema biológico, como manutenção da pressão arterial como um vasorelaxador, neurotransmissão, mecanismo de defesa e regulação imune (BERGENDI et al., 1999). Em meio aquoso sua meia vida é muito curta durando poucos segundos, é solúvel em meio aquoso e lipídico, facilitando assim a sua entrada no citoplasma e membranas lipídicas (CHIUEH, 1999). O oxído nítrico pode reagir com o ânion radical superóxido e formar uma ERN que é muito tóxica, o peroxinitrito (ONOO⁻) [8] (KOSHLAND, 1992).

$$\mathsf{'NO} + \mathsf{O}_2 \mathsf{'}^- \to \mathsf{ONOO}^- \qquad [8]$$

Quando protonado o peroxinitrito forma o ácido peroxinitroso (ONOOH), que é muito instável e acaba sendo decomposto espontaneamente formando subprodutos nitrato (NO³⁻) e nitrito ('NO₂) (RADI et al., 1991a). As ERN e especialmente o peroxinitrito reage com grupos tióis e causando oxidação além de reagir oxidando lipídeos. Em um estudo realizado por Rubbo e cols (1984) mostrou-se que a oxidação de lipídeos como o ácido linolênico e lipossomas ocorre por um mecanismo envolvendo EROs para formar o radical hidroxil (OH[•]), alcoxil (LO[•]) e peroxil (LOO[•]) (RUBBO et al., 1994). A partir disso o 'NO reage com (LO[•]) e (LOO[•]) formando produtos lipídicos derivados do 'NO (PADMAJA e HUIE, 1993). Assim como o peroxinitrito, os nitrito e nitrato também podem reagir com GSH como as cisteínas e

grupos sulfidrilas formando nitrosotióis e desregulando a função das proteínas (RADI et al., 1991b).

Ressalta-se ainda outras fontes de produção de espécies reativas são as vias xantina dani oxidase. A xantina oxidase catalisa a hidroxilação oxidativa da hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico e NADPH para que seja formado o radical superóxido e peróxido de hidrogênio. A NADPH oxidase geralmente é estimulada quando há sítios de inflamação na célula produzindo radical superóxido (WOLIN, 2000). A NADPH oxidase, por sua vez, é uma enzima que produz ânion superóxido, transportando os elétrons do NADPH para dentro da célula através da membrana celular e acoplando-os ao oxigênio (FILIP-CIUBOTARU et al., 2016).

O estresse oxidativo pode levar a peroxidação lipídica provocando alterações significativas na montagem, composição, estrutura e dinâmica das membranas lipídicas. Devido à sua natureza altamente reativa, os peróxidos lipídicos também têm a capacidade de desencadear a geração adicional de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou se degradar em compostos reativos que podem danificar o DNA e as proteínas (GASCHLER & STOCKWELL, 2017).

Outra consequência do estresse oxidativo na célula é a formação de proteínas carboniladas. A oxidação proteíca é uma modificação covalente induzida diretamente pelas espécies reativas (DALLE-DONNE et al., 2006). Quando os lipídeos são atacados por um radical hidroxil, ocorre formação de várias moléculas lipofílicas reativas, tais como os aldeídos (acroleina e malondialdeído), 4-hidroxi trans-2,3-nonenal (4-HNE) e 4-oxo trans-2,3-nonenal (4-ONE). Nos aldeídos reativos o grupo carbonil resulta em torno da dupla ligação 2,3. Logo, a reação de carbonilação da proteína, ocorre no carbono C3 do aldeído reativo ficando susceptível a receber um ataque nucleofílico pelas cadeias laterais das proteínas que possuem resíduos de histidina, lisina ou cisteína. O resultado disso é um aminoácido alquilado com um grupo carbonila livre. Proteínas carboniladas são resultados de uma série de reações provenientes do estresse oxidativo e produção de espécies reativas que estão presentes em várias patologias como diabetes, doenças cardíacas e neuropatias (SCHAUR, 2003, DALLE-DONNE et al., 2006).

3. JUSTIFICATIVA

O CELMM abrange um dos sistemas estuarinos mais importantes do nordeste e vem sofrendo um processo de degradação ambiental, afetando seus habitantes. Neste sentido, apesar do nosso grupo de pesquisa ter conseguido anteriormente avaliar uma série de parâmetros relacionados ao ambiente referente ao CELMM e a população residente no seu entorno (município de Maceió – AL), algumas questões ainda não foram completamente esclarecidas em relação ao sistema investigado.

Neste contexto, uma série de questões precisam ser investigadas quanto aos diferentes parâmetros bioquímicos, a saber: (i) uma vez que se observou redução da atividade de algumas enzimas antioxidantes e capacidade de ligação da hemoglobina ao oxigênio para um grupo residente do CELMM, será que tais modificações existem na população residente em diferentes locais da mesma lagoa? (ii) será que outros marcadores de estresse das células sanguíneas, como por exemplo a morfologia celular, também estão alterados? (iii) é possível por meio de estudos de espectroscopia Raman dos eritrócitos identificar potenciais marcadores da exposição a contaminação ambiental do CELMM? Assim, tais questões precisam ser esclarecidas e ampliadas, o que justifica os estudos descritos nesta dissertação. Os estudos envolveram quatro instituições, sendo duas em Alagoas [UFAL: proponente e USP: colaboradora] e duas em São Paulo [UNICAMP: proponente e USP: colaboradora], a fim de estabelecer o efeito da contaminação ambiental nesta população vulnerável e assim, apresentar para sociedade dados que possam subsidiar e direcionar políticas públicas efetivas.

4. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

4.6. Objetivo geral

Associar parâmetros de contaminação ambiental (contaminantes inorgânicos), específicamente o mercúrio, com indicadores de toxicidade da população circunvizinha ao Complexo Lagunar Mundaú-Manguaba (Maceió-AL).

4.7. Objetivo específico

- Compreender as características demográficas dos voluntários expostos ao ambiente do CELMM e do grupo controle;
- Determinar a concentração total de Hg em amostras de sangue e urina de voluntários que residam próximo do entorno do CELMM e no grupo controle;
- Verificar a funcionalidade e integridade dos eritrócitos através da captação de oxigênio e espectroscopia Raman;
- > Quantificar geração de EROs em células mononucleares;
- Mensurar, através de imagem, a produção de EROS por microscópia de fluorescência, e a morfologia por microcopia eletrônica de varredura (MEV) em células mononucleares;
- Determinar a atividade de enzimas antioxidantes nos eritrócitos: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx);
- Avaliar biomarcadores clássicos e secundários do estresse oxidativo nos eritrócitos: glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG) e razão GSH/GSSG, grupos sufidrilas livres, lipídeos oxidados, e proteínas carboniladas;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Amostra populacional

Os voluntários considerados como expostos são os pescadores, marisqueiras e pessoas que vivem em condições de vulnerabilidade nas proximidades do CELMM (Maceió, AL) que possuem contato constante com a água e consomem alimentos provenientes da laguna, como sururu e pescados em geral. Já a população controle são voluntários que não tenham contato sistemático com o local de análise, entende-se que não tenha contato com a água e se alimente continuamente de sururu ou peixes do CELMM. Um questionário para determinar as caracteríticas demográficas dos grupos foi aplicado para se obter informações sobre o perfil dos voluntários como condição socioeconomica, idade, peso, escolaridade, hábitos e possíveis patologias pré-existentes. Foram considerados homens e mulheres acima de 18 anos. As amostras de urina e sangue foram obtido por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (MAZZARON BARCELOS et al., 2012; LEMIRE et al., 2012; NYLAND et al., 2011). Foram avaliados 60 voluntários expostos e 65 voluntários controles. O projeto está aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL (CAAE 57998116800005013).

5.2. Coleta do sangue e separação dos eritrócitos

As amostras de sangue venoso foram obtidas através de punção de veia usando tubo de vácuo (BD Vacutainer) contendo EDTA (198 µg mL⁻¹) quando necessário ou tubo seco para a obtenção de soro para as análises de bioquímica clínica. Os eritrócitos foram separados por centrifugação à 220x*g* por 30 min à 28°C, posteriormente foram quantificados o teor total de proteínas pelo método de Bradford (1976), uma solução de BSA (2 mg mL⁻¹) foi usada como padrão de proteína. Os eritrócitos foram imediatamente utilizados nos ensaios de captação de oxigênio e espectroscopia Raman. Para os demais ensaios (atividade de enzimas antioxidantes e marcadores secundários de estresse oxidativo) tais amostras foram congeladas a - 20°C até realização dos ensaios.

5.3. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Após a centrifugação do sangue, o plasma foi colocado em tubo falcon contendo 2 mL de solução de Histopaque 1077, e o isolamento das células mononucleares seguiu o protocolo estabelecido por Malaguti e cols (2014). A viabilidade celular foi avaliada no microscópio óptico Leica DM500, usando o azul Trypan como método de exclusão, que se liga as membranas dessas células, considerando satisfatório quando for maior que 95%.

5.4. Determinação do nível total de mercúrio no sangue total

5.4.1. Instrumentação e procedimentos

A determinação de mercúrio total foi realizada 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 2**.

Paramêtro	Condição
Comprimento de onda (nm)	253.7
Modo de medição	Peak height
Replicatas	3
Tempo de atraso (s)	15
Tempo de analise (s)	40
Tempo de lavagem da memória (s)	40
Ganho	10
Vazão de gás do arraste (mL min ⁻¹)	250

Tabela 2.	Condições d	peracionais	para o CV AFS	para determinad	ção de Ho	g total.
-----------	-------------	-------------	---------------	-----------------	-----------	----------

Vazão de gás do secador (L min ⁻¹)	2.5
Taxa de fluxo transportador (mL min ⁻¹)	9
Taxa de fluxo da amostra (mL min ⁻¹)	9
SnCl ₂ taxa de fluxo (mL min ⁻¹)	4.5
SnCl ₂ % (m/v)	2
HCI % (v/v)	20
KBr / KBrO ₃ (mM)	100 / 17
Ácido ascorbico % (m/v)	12

5.4.2. Preparação da amostra

As amostras de sangue foram submetidas a um procedimento de extração ácida (ZIMMER et al., 2002; SOUZA et al., 2013), seguido de análise direta da solução sem etapa de digestão. Para determinação de mercúrio total por CV AFS, 250 μ L de cada amostra de sangue (controle e exposto), 1 mL de água deionizada e 4 mL de HNO₃ (14 M) foram adicionados a um béquer de 25 mL e mantidos em repouso por 1h. Após esse período, o sobrenadante foi filtrado e 2,50 mL desse sistema foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, foram adicionados 500 μ L da mistura (1:1) de KBr/KBrO₃ (100/17 mM), 3 mL de água deionizada e a reação foi agitada por 5 min. Após esse período, foram adicionados 50 μ L de solução de ácido ascórbico 12% (p/v) e 250 μ L de antiespumante B 0,1% (v/v). Por fim, completou-se o volume até a marca de medição do frasco com água deionizada. As curvas analíticas foram preparadas de forma semelhante às amostras.

5.5. Avaliação da função da hemoglobina

A hemoglobina presente nos eritrócitos (Eri) tem a capacidade de ligação do oxigênio o que foi medido utilizando-se um eletrodo para O₂, em uma câmara de vidro de 1,0 mL equipada com agitador magnético e termostato à 28°C, Hansatech, Oxigraph, England, UK. A concentração de proteínas totais utilizadas nos experimentos foi de 0,325 mg mL⁻¹. O eletrodo foi calibrado diariamente utilizando ditionito de sódio, e a concentração de oxigênio inicial foi fixada a 225 nmol mL⁻¹ (ROBINSON & COOPER, 1970). A capacidade máxima de captação de oxigênio dos eritrócitos foi determinada após 10s.

5.6. Estimativa da produção das espécies reativas de oxigênio em PBMCs

A produção de espécies reativas de oxigênio foi determinada usando 1 × 10⁶ de células mL⁻¹, e o meio de reação utilizado foi o PBS (138,8 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 0,9 mM de KH₂PO₄ e 6,4 mM de Na₂HPO₄). A geração de espécies reativas de oxigênio (O₂⁻⁻, H₂O₂, OH, ONOO⁺) foi monitorada utilizando a sonda fluorescente DHE (3µM) (Ex: 520 nm / Em: 610 nm) com slit de 5nm por 20 min (DEGASPERE et al., 2006). Já a produção de H₂O₂ foi monitorada utilizando a sonda fluorescente Amplex Red (10 µM), tal experimento foi realizado na presença da enzima peroxidase (HPR, 1 U/mL) (λ_{ex} = 563 nm, λ_{em} = 587 nm e o *slit* de 3nm para excitação e emissão) (NUNES et al., 2019). Ambos experimentos foram realizados a 28°C, utilizando espectrofluorímetro Shimatsu RF5300.

5.7. Preparação de eritrócitos para ensaios de estresse oxidativo

Após a separação do plasma, aproximadamente 150 μ L de eritrócitos foram adicionados a 5 mL de tampão de extração contendo 50 mM Tris-HCl (pH = 7,4) e 1 mM EDTA, homogeneizados em gelo em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e centrifugados a 1180xg e 4°C por 10 min. O sobrenadante foi coletado e submetido à quantificação de proteína total (BRADFORD, 1976).

5.8. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido desmutase (SOD) foi medida através de uma reação iniciada pela adição de 20 μ L de epinefrina (150 mM) em ácido acético (0,5% v/v) em um volume final de 1,0 mL. O homogenato de sangue (80 μ g de proteína) foi incubado em 50 mM de tampão carbonato de sódio (NaCO₃/NaHCO₃, pH = 10,2 com 0,1 mM EDTA) à 37 °C. 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 auto-oxidação de 1 μ mol de epinefrina por minuto. Os resultados foram expressos em proteína U mg⁻¹ (MISRA & FRIDOVICH, 1972).

5.7. Atividade da catalase (CAT)

A catalase (CAT) é baseada no princípio da determinação da decomposição do H_2O_2 . Um total de 40 µg de proteína (do homogeneizado de sangue) foi adicionado em tampão fosfato 50 mM (KH₂PO₄ + Na₂HPO₄, pH = 7,0) à 25°C. A reação foi iniciada

adicionando H_2O_2 10 mM em um volume final de 1,0 mL. O decaimento da absorbância foi monitorada 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 H_2O_2 em H_2O e O_2 por minuto. Os resultados foram expressos como K mg⁻¹ proteína (AEBI, 1984).

5.10. Atividade da glutationa peroxidase (GPx)

A atividade da glutationa peroxidase (GPx) foi monitorada através da diminuição da absorbância de NADPH à 340 nm em um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1900i) por 3 min à 20°C. O meio continha 80 μ g de proteína (do sangue homogeneizado), 50 mM de Na₂HPO₄ (pH = 7,0), 5 mM EDTA, 84 μ M NADPH, 1,1 mM azida de sódio, 1,5 mM GSH, 0,1 U mL⁻¹ de glutationa redutase (GR) e 90 μ M H₂O₂ em um volume final de 1,0 mL. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade necessária para a oxidação de 1 μ mol de NADPH min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Os resultados foram expressos como U mg⁻¹ (PAGLIA & VALENTINE, 1967).

5.11. Quantificação do estado redox (relação GSH/GSSG)

A relação GSH/GSSG foi avaliada pela quantificação do teor de glutationa reduzida (GSH) e glutationa oxidada (GSSG) (HISSIN & HILF, 1976). Na reação de GSH e GSSG foram utilizados homogenato de sangue (50 e 100 µg de proteína, respectivamente) e oftalaldeído (1 mg mL⁻¹; sonda fluorescente). Para o ensaio GSH o tampão usado continha 100 mM NaH₂PO₄ (pH = 8,0) e 5 mM EDTA, já para o ensaio de GSSG foi utilizado 100 mM NaOH junto com N-etilmaleimida (NEM) que é um bloqueador de SH para tirar a interferência do GSH. A fluorescência foi monitorada em um leitor de placa (Tecan Infinite 200 pro) com λ_{ex} = 350 nm e λ_{em} = 420 nm. Uma curva analítica baseada em concentrações conhecidas de GSH e GSSG foi empregada para determinar as concentrações dessas biomoléculas nas amostras.

5.12. Peroxidação lipídica (teor de malondialdeído – MDA)

A técnica colorimétrica foi utilizada para determinar substâncias reativas tiobarbitúricas (LUCAS et al., 2019). Resumidamente, uma alíquota de 0,3 mL de homogenato de sangue foi misturada com 600 µl de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,6% e 600 µL de Solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Em seguida,

as amostras foram vórtex, incubados por 15 minutos a 95°C e resfriados em gelo por 5 min. As amostras foram então centrifugadas a 2.500 × g por 5 min. O sobrenadante resultante foi lido usando um espectrofotômetro à 540 nm. TBARS foram calculados usando um molar coeficiente de extinção para malondialdeído de 1,56 x 10^5 M⁻¹ cm⁻¹ e expresso como µmols de TBARS por mg de proteína.

5.13. Teor de carbonil de proteína

A quantificação desses produtos (formação de grupos carbonilas) 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 usa 100 µL do homogenato de sangue. A diferença entre os grupos é que para grupo controle usa 400 µL de HCI 2,5 M e para o grupo reação usa 400 µL de DNPH 10 mM (solubilizado em HCI 2,5 M), a partir daqui o procedimento é igual para todos. Foi incubado os dois tubos em temperatura ambiente por 1h (agitar a cada 15 min), em seguida foi adicionado 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) à 2 M, para homogeneizar foi utilizado um vortex e deixamos 5 min no gelo, depois as amostras foram centrifugadas a 10000x g por 10 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionado 500 µL de TCA (1 M) para ressuspender o pellet gerado para repetir a centrifugação anterior, essa etapa serve para separar as proteínas da amostra. Novamente o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas usando uma mistura de etanol e acetato de etila (1:1 v/v) três vezes repetindo o mesmo processo de centrifugação, por fim ressuspensas em guanidina (6 M) e centrifugada a 10000x g por 10 min à 4 °C, em seguida, o sobrenadante foi recolhido para fazer a leitura. A absorbância foi medida a 370 nm por um leitor de placa e normalizada pela quantidade de proteína (Tecan Infinite 200 pro) e os resultados foram expressos em pmol mg⁻¹ proteína (REZNICK & PACKER, 1994).

5.14. Conteúdo do grupo sufidrila

O teor de sulfidrila foi determinado a partir da reação com DTNB (5,5'-ácido ditio-bis-2-nitrobenzóico). O homogeneizado de sangue (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-HCI 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 como padrão contendo SH para determinar a concentração de tal grupo nas amostras em µM.

5.15. Microscopia de fluorescência

Preparação de leucócitos mononucleares de sangue periférico humano (PBMLs) foi adaptado de (REIS et al., 2007; GANDINE et al., 2011), que utilizou 3 mL de Ficoll-Paque[™] Plus (GE Healthcare) para promover o isolamento celular mais 5 mL de sangue diluído com 5 mL de PBS. Após a coleta de sangue, cada amostra foi imediatamente centrifugada (MIKRO 220R) a 900 × g (temperatura ambiente) por 30 minutos para separar o plasma e os eritrócitos. A nuvem de mononucleares foi transferida para um Falcon com 10 mL de PBS (pH = 7,4, contendo 138,8 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,9 mM anidro KH₂PO₄ e 6,4 mM Na₂HPO₄) e centrifugada a 136 × g por 10 min e foi descartado o sobrenadante e lavado novamente com PBS. O pellet foi ressuspenso com RPMI. A viabilidade celular foi verificada pelo método de exclusão com azul de tripan em câmara de Neubauer e considerando a viabilidade satisfatória quando >95%. A adesão das células nas lamínulas foi realizada com fibronectina, colocando 1×10⁶ de células por 2h a 37°C e 5% de CO₂ e as marcações foram feitas com H₂DCF-DA 20 µM, DHE 30 µM e Mitosox 5 µM, por 30 min a 37 °C e por fim fixado com PFA 4% e marcado com DAPI (PAKHOMOVA et al., 2012).

5.16. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

As células linfomononucleares foram preparadas para a caracterização ultraestrutural usando SEM, conforme descrito anteriormente. Resumidamente, as células foram fixadas em tampão glutaraldeído à 5% e lavado duas vezes com PBS. Em seguida, as lamínulas foram colocadas em um dessecador contendo gel de sílica para remover a umidade por 24 h. Subseqüentemente, células foram revestidas com ouro e examinadas sob um microscópio eletrônico de varredura (Super Scan SSX-550, Shimadzu, Japão). O procedimento de preparo e fixação das células com glutaraldeído (SOUZA et al., 2014).

5.17. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman para eritrócitos foram registrados usando um microscópio confocal de fluorescência (LabRam HR Evolution, Horiba, EUA). As medidas foram realizadas usando uma lente objetiva de $50 \times (NA = 0,80)$ e um laser de diodo de onda contínua (CW) de 785 nm que é o mais próximo da janela biológica, focando na amostra com um tamanho de ~ 2 µm. Essa mesma lente objetiva foi usada para o espalhamento luz Raman logo após a interação de retroespalhamento da amostra. A potência do laser fornecida às amostras foi de cerca de 20 mW, e 10 espectros (tempo de aquisição de 30 s e tempo de acumulação de 30 s) de cada amostra foram coletados em 10 posições de diferentes pontos. Todos os experimentos foram realizados utilizando 40 µL de eritrócitos, purificados com Na₂HPO₄ (0,2 M), colocados (~107 mg mL⁻¹) em uma placa de silício, e as medidas foram registradas de 300 a 1730 cm⁻¹ (22 °C). O processamento dos dados foi baseado na análise de componentes principais (PCA), usando um algoritmo de correção de fundo do LabSpec 6 e suavização. Os espectros individuais foram então normalizados com base na área total sob a curva Raman para comparar melhor as formas espectrais e as intensidades relativas da banda Raman das amostras. Por fim, os gráficos bidimensionais foram construídos com pontuações diferentes para os dois primeiros componentes principais. O instrumento Raman foi calibrado usando a banda fônon do silício (520 cm⁻¹) como referência (SALES et al., 2022).

5.18. Análise de dados

Os resultados são apresentados como a média ± Erro. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste t de Student_não pareado utilizando o software Graph Pad Prism versão 8.0.1, OriginPro 9.0 e no Raman foi realizado análise de componentes PCA. O nível de significância adotado foi p≤ 0,05.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Características e exposição ambiental dos voluntários

Realizamos os experimentos com 60 voluntários expostos ao ambiente contaminado por Hg e 65 voluntários controles. Tivemos voluntários expostos que habitam em três regiões distintas da lagoa Mundaú: Colônia de pescadores do Pontal da Barra (Colônia de Pescadores - Vieira Lima Z3), Colônia de pescadores do Bebedouro (Colônia de Pescadores - Santo Antônio Z4) e na Comunidade Espírita Nosso Lar que abrange a região do Vergel. O grupo controle se constituiu de voluntários que não vivem nas proximidades do CELMM, sendo assim, este grupo foi obtido dos bairros, Cidade Universitária, Jacintinho e Barro Duro pareados em relação ao sexo e idade que foram obtidos d grupo exposto.

Nossos voluntários têm uma média de idade em torno de 43 e 45 anos, dentre as comorbidades, a hipertensão é mais prevalente, sendo 20% nos controles e 18% no grupo exposto. Ainda foi relatado nas comorbidades, o diabetes tipo 2 no grupo controle (9%) e nos voluntários expostos (10%). Nos hábitos de consumo de bebidas alcoólicas, encontramos que 52% do grupo controle e 45% do grupo exposto consomem bebidas alcoólicas. Em relação aos hábitos de tabagismo foi relatado 22% e 18% no grupo controle e exposto, respectivamente. Quanto à exposição ambiental, 93% dos voluntários expostos têm contato com a água, seja tomando banho ou pescando, e 95% consomem alimentos provenientes do ambiente lagunar: sururu ou pescado. Estes dados estão apresentados na **Tabela 3** e foram retirados do questionário que foi aplicado em todos os voluntários, sejam expostos ou controle.

Característica		Controle (n= 65)	Exposto (n= 60)
Idade, média ± DP		43 ± 15	45 ± 14
Sexo, número %			
	Homem	31 (48)	28 (47)
	Mulher	34 (52)	32 (53)
Altura (m), média ± DP		1,65 ± 0,11	1,66 ± 0,07
Massa (Kg), média ± DP		74 ± 17	72 ± 13
Índice de massa corporal (IMC)		28 ± 7	26 ± 5
Comorbidades, número %			

Tabela 3. Características demográficos e o tipo de exposição ambiental. Total n = 125.

	Hipertensão	13 (20)	11 (18)
	Diabetes	6 (9)	6 (10)
	Cardiopatia	0 (0)	1 (2)
Hábitos, número%			
	Fumar	13 (22)	11 (18)
	Beber	34 (52)	27 (45)
Exposição ambiental a lagoa Mundaú ^a			
	Contato com água	0 (0)	54 (93)
_	Consumo de comida	0 (0)	57 (95)

^aBanho e/ou pesca

6.2. Perfil Bioquímico dos voluntários

Afim de comparar possíveis alterações na contagem de células vermelhas, brancas e no metabolismo entre o grupo controle e exposto, foram realizadas análises de bioquímica clínica. Nos parâmetros hematológicos no grupo exposto foi identificado aumento de eritrócitos (15%), de hemoglobina (26%) e do hematócrito (17%), contudo todos os parâmetros estão dentro dos valores normais de referência **(Tabela 4)**.

Ainda, o volume corpuscular médio (VCM) que indica o tamanho dos eritrócitos está diminuído (9%), a amplitude da distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) está aumentada em 33% e as plaquetas aumentadas em 56% no grupo exposto **(Tabela 4)**. Esses dados em conjunto nos indica um possível quadro de anemia por deficiência de ferro.

Estudos mostraram que o Hg²⁺ é capaz de se ligar aos grupos tióis, como os presente na hemoglobina (Hb), o que por sua vez leva ao aumento dos níveis de Hb no plasma. Isso ocorre devido a plasticidade fenotípica do organismo para minimizar os danos gerados pelo mercúrio (CLARKSON, 1997; CUSTÓDIO et al., 2005; JANZEN et al., 2011; AMARA et. al., 2012). Desta forma, essa plasticidade foi constatada nos resultados do hemograma, onde ocorreu o aumento da produção de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, contudo não foi suficiente, pois o tamanho dessas células está reduzido e com alterações de distribuição, sendo assim possível a progressão para um desenvolvimento de anemia.

	Média ± D.P.			
Parâmetros	Controle (<i>n</i> =65)	Exposto (<i>n=60</i>)	Valor referência >16 anos	Valor de p
Eritrócitos	$4,7 \pm 0,5$	5,6 ± 2,8	4,30 – 5,70 milhões de cél mm ⁻³	0,0092*
Hemoglobina (HB)	13,6 ± 1,2	17,2 ± 9,8	13,5 – 17,5 g dL ⁻¹	0,0044*
Hematócrito (HT)	41,4 ± 3,7	48,7 ± 19,5	39,0 – 50,0 mL Erit dL ⁻¹	0,0037*
Volume Corpuscular Médio (VCM)	89,1 ± 5,7	81,3 ± 24,2	80 - 100 fL	0,0137*
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	29,4 ± 1,9	29,7 ± 2,2	27 - 32 pg	0,4400
ConcentraçãodeHemoglobinaCorpuscularMédia (CHCM)	32,8 ± 1,2	32,3 ± 1,7	31 – 36 g dL ⁻¹	0,0720
Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (RDW)	13,8 ± 0,7	18,4 ± 8,6	10 - 16%	0,0001*
Plaquetas	261.000 ± 71,8	407.000 ± 247,5	150.000 - 450.000 mm ⁻³	0,0001*
Leucócitos	6727 ± 1722	6590 ± 3459	5000 - 10000 mm ⁻³	0,7802
Linfócitos	2410 ± 788	2260 ± 1066	900 – 2900 mm ⁻³	0,3724
Monócitos	466 ± 174	407 ± 170	300 - 900 mm ⁻³	0,0594
Segmentados	3398 ± 1441	3577 ± 1914	3000 - 8000 mm ⁻³	0,5595
Eosinófilos	238 ± 171	489 ± 505	0 – 660 mm ⁻³	0,0003*

Tabela 4. Hemograma completo dos grupos controle e exposto.

Basófilos

*Estatisticamente significante comparado com o grupo controle. Análise estatística: Teste t de Student. Total de voluntários n = 125.

Quanto aos dados de bioquímica clínica, encontramos alterações em metabólitos e aminotransferases que são dados importantes para compreender alterações que podem levar ao desenvolvimento de patologias tendo uma possível correlação com exposições a ambiente contaminados. Os níveis de triglicerídeos totais se mostraram aumentados em 37% no grupo exposto, assim como relatado por Hong et al. (2013), contudo dentro dos limites de referência. Os exames da função renal, como uréia e creatinina, deram aumentados (36% e 57%, respectivamente) (**Tabela 5**) no grupo exposto, porém ainda dentro dos valores de referência, mas que podem progredir para um quadro preocupante.

Quando analisamos os resultados sobre as aminotransferases, que são marcadores para identificar a função hepática, através da ALT e AST, verificamos que aumentaram (107% e 16%, respectivamente) no grupo exposto. Vale ressaltar que a ALT está acima dos valores de referência, destacando o dano hepático no grupo exposto. Em pesquisa realizada com ratos albinos expostos a HgCl₂ foi relatado disfunção renal e hepática (IJAZ et al., 2021).

	Média ± D.P.			
Parâmetros	Controle (<i>n</i> =38-65)	Exposto (<i>n</i> =50-60)	Valor referência	Valor de p
	((>16 anos	
Metabólitos				
Glicose	95,1 ± 24	99,5 ± 27	60 - 99 mg dL ⁻¹	0,3420
Triglicerídeos totais	97,9 ± 37	134,4 ± 62	< 150 mg dL ⁻¹	0,0003*
Colesterol total	174 ± 39	173 ± 65	< 200 mg dL ⁻¹	0,8831
HDL	55 ± 11	52 ± 14	40 - 60 mg dL ⁻¹	0,3206
LDL	116,6 ± 36	109,5 ± 41	< 100 mg dL ⁻¹	0,4015

Tabela 5. Parâmetros de bioquímica clínica.

Uréia	28 ± 9	38 ± 23	10 – 45 mg dL ⁻¹	0,0137*
Ácido urico	4,7 ± 1,6	4,8 ± 1,1	3,7 - 8 mg dL ⁻¹	0,7161
Creatinina	$0,7 \pm 0,2$	1,1 ± 0,6	0,6 -1,3 mg dL ⁻¹	0,0002*
Aminotransferases				
Aminotransferases ALT	24,6 ± 15	50,9 ± 34	10,0 – 41,0 U L ⁻¹	0,0001*

*Estatisticamente significante comparado com o grupo controle. Análise estatística: Teste t de Student.

6.3. Quantificação de Hg no sangue

A exposição a um ambiente contaminado, que pode levar a uma contaminação sistêmica, como no caso dos pescadores, foi confirmada pela análise de mercúrio total no sangue (**Figura 10**). Nos pescadores, o valor máximo de mercúrio encontrado no sangue foi 19,02 µg L⁻¹, e de acordo com a OMS, a concentração de mercúrio no sangue pode variar de 5-10 µg L⁻¹, já de acordo com a agência de proteção ambiental o nível tolerável de Hg no sangue dos voluntários controle foi de 0,9 ± 0,18, enquanto nos expostos foi 3 vezes maior: $3,4 \pm 0,6 \mu$ g L⁻¹. Na urina, os níveis de Hg foram de 0,02 ± 0,01 para os controles e 0,17 ± 0,1 µg L⁻¹ nos expostos, ou seja 8,5 vezes maior nos expostos. A recomendação de concentração média total de mercúrio na urina em populações não expostas a ambientes contaminados é de 4 µg L⁻¹ (WHO & IPCS, 1991). Os resultados obtidos mostram uma maior concentração de mercúrio no sangue e na urina do grupo exposto em relação ao controle, mesmo estando dentro dos limites permitido pelas agências regulamentadoras.

Figura 10. Concentração de mercúrio total no sangue dos voluntários. (**A**) Gráfico de dispersão dos níveis de mercúrio no sangue. (**B**) Gráfico de dispersão dos níveis de mercúrio na urina. Média \pm Erro Padrão, sangue/urina *n*=65/20 (controle) e *n*=60/20 (exposto). Valor de *p<0.05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

O sangue é um dos tecidos que reflete o contato com o ambiente externo e seus possíveis contaminantes, além de sofrer com os danos gerados, exibindo estresse oxidativo. Tal tecido é também a forma mais rápida de carrear e difundir metais tóxicos, como o mercúrio, para todos os outros órgãos. O mercúrio é um metal que bioacumula em grandes quantidades em diversos tecidos, no sangue destacamos um tipo celular, os eritrócitos, onde tal metal se liga na hemoglobina. Tal metal ainda se liga em diversos outros alvos biológicos como rins, cérebro, fígado, pulmões e baço. Diante da toxicidade de tal metal, muitos são os estudos que quantificam o mercúrio total no sangue e urina afim de estimar os níveis de contaminação de uma forma geral nas populações (BERGLUND et al., 2005).

6.4. Avaliação da funcionalidade e alterações estruturais em eritrócitos

A hemoglobina nos eritrócitos é a proteína responsável por transportar o oxigênio para os tecidos. O mercúrio bioacumula e tem meia vida no sangue de aproximadamente 9 dias (CARNEIRO et al., 2014). Quantificamos a capacidade da hemoglobina em captar o oxigênio através de um eletrodo específico para o oxigênio. Nossos resultados mostraram que o grupo de pescadores expostos apresentou uma diminuição de 39% na capacidade de ligação ao O₂ em comparação com o grupo controle **(Figura 11 A-B)**.

Figura 11. Eritrócitos de pescadores expostos à lagoa Mundaú apresentam baixa capacidade de captação de oxigênio e alterações estruturais em eritrócitos.: (A)

Gráfico representativo da captação de oxigênio pelos eritrócitos humanos (Eri). (**B**) Quantificação da captação de oxigênio durante 10 s. (**C**) Gráfico representativo da média dos espectros Raman medidos na faixa espectral de 300-1750 cm⁻¹. (**D**) Análise de componentes principais PC1 vs. PC2 aplicada aos espectros Raman. (**E**) Carregamento positivo do gráfico PC1 para eritrócitos de controle e expostos. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média ± Erro Padrão, *n*=65 (controle) e *n*=60 (exposto) para o consumo de oxigênio controle. *n*=16 (controle) e *n*=16 (exposto) para o Raman. Valor de **p*<0.05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

Para identificar modificações em biomoléculas geradas pela contaminação ambiental promovida pelo mercúrio usamos a técnica da espectroscopia Raman, onde foi possível mensurar alterações vibracionais na estrutura do heme da hemoglobina dos eritrócitos dos pescadores, bem como em lipídeos e proteínas de membrana de tal célula. Na região inicial do espectro (411 à 570 cm⁻¹) que se refere a ligação Fe-O₂ foi possível observar uma diminuição da intensidade e alargamento dos picos, ou seja, demonstrando uma menor quantidade da ligação Fe-O₂, confirmando o que foi observado na determinação da captação de oxigênio.

Ainda, foi constatado na região 675 cm⁻¹ e 752 cm⁻¹ a deformação do anel porfirínico da hemoglobina e essa deformação gera uma distorção nos anéis de pirrol (1400 - 1300 cm⁻¹) o que leva a dificuldade da ligação do Fe-O₂. Verificamos ainda que nas regiões em torno de 1100 à 1200 cm⁻¹ uma maior intensidade do sinal, que é uma região referente a lipídeos na conformação trans. Também foram observados alterações nos modos vibracionais referentes ao marcador de estado spin da hemoglobina, assim como deformação CH₂/CH₃ principalmente das cadeias laterais de aminoácidos, de lipídios ou de proteína de membrana (1500-1700 cm⁻¹) e ainda no aminoácido fenilalanina (proteínas ~1003 cm⁻¹) (**Figura 11 C**).

Para comprovar as alterações entre os espectros dos grupos, usamos metódos multivariados, como o PCA (análise dos componentes principais), que gera um gráfico de disperção, onde é possível discriminar dois componentes principais, considerando duas dimensões do domínio transformado (PC1 e PC2). O PC1 é o principal contribuinte (59,25%) e o PC2 o secundário (12,39%) (Figura 11 D). O carregamento do PC1 é um recurso importante do Raman, pois ele tem a capacidade de distinção não direcionada do PCA mostrando influências negativas e positivas da contaminação sob o espectro e quando esta diferença é maior que 50% é dito como preditiva e relevante para tal análise. Neste caso, tivemos uma diferença relevante entre os grupos quando feita a relação dos espectros dos controles em relação ao exposto (Figura 11 E).

O mercúrio tem diversos mecanismos de toxicidade que foram descritos para elucidar como esse elemento interage com a célula sanguínea e está bem documentado que as espécies de mercúrio têm fortes efeitos tóxicos nos sistemas biológicos. No corpo humano, esse metal e seus compostos mostraram afinidade por certos tecidos e órgãos, como cérebro, músculos, rins e coração. É relatado na literatura que o mercúrio pode interferir na atividade da anidrase carbônica pois ao se ligar em um dos seus resíduos de cisteína prejudica a capacidade da enzima de controlar o pH do sangue (HOGEBACK et al., 2016). Em uma pesquisa realizada por Magalhães & cols. (2020), foi demonstrado que o mercúrio pode interagir com a cisteína 93 (Cys93), devido aos seus grupos sufidrilas estarem mais acessíveis ao ataque deste metal. Vale ressaltar que o Hg tende a se ligar ao enxofre pois possui alta afinidade por este elemento. Ainda foi revelado que a exposição ao Hg leva a alterações na membrana dos eritrócitos diminuindo a elasticidade de tal componente celular (SALES et al., 2022).

6.5. Produção de ânion radical de superóxido e peróxido de hidrogênio

Dando continuidade na investigação sobre a contaminação de mercúrio no sangue dos pescadores, seguimos verificando se tal metal estaria induzindo estresse oxidativo via produção de espécies reativas de oxigênio aumentada. Trabalhando com células isoladas da série branca do sangue (PBMCs) encontramos que tais células nos pescadores produziram 2 vezes mais ânion radical superóxido EROs e ainda ~2 vezes mais peróxido de hidrogênio que as PBMCs do grupo controle, o que pode afetar a função de tais células e causar danos nas respostas imunes (**Figura 12**).

Afim de investigar o papel da exposição ao mercúrio na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células mononucleares, usamos primeiramente o probe fluorescente dihidroetídeo (DHE) (Figura 12 A) para quantificar EROs. No grupo exposto, a fluorescência de DHE foi 87% maior do que no grupo controle (Figura 12 B). Foi analisado também, a produção de H₂O₂, usando o probe fluorescente Amplex Red (Figura 12 C). A produção de tal espécie foi 116% maior no grupo exposto em comparação com o controle (Figura 12 D). Quanto as microscopias de fluorecência (Figura 12 E-F) com o probe fluorescente H₂DCF-DA, o qual detecta a produção de várias espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (O₂⁻⁻, H₂O₂, 'OH, ROO', ONOO'), os resultados mostraram que a produção de EROS está maior no grupo exposto. Contudo, quando analisado a produção de ânion radical superoxido mitocondrial, utilizando o probe Mitosox, não foi encontrado diferença entre os grupos.

Figura 12. A exposição ao ambiente contaminado aumenta a produção de oxigênio reativo em células linfomononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pescadores expostos em comparação com controles. (A) Gráficos representativo da geração de de EROs usando DHE (B) Quantificação da intensidade de fluorescência de DHE (C) Gráfico representativo da produção de H₂O₂ com Amplex Red (D) Quantificação da geração de geração de H₂O₂. Os experimentos foram realizados em duplicata. (E) Microscopia de fluorescência usando os probes H₂DCF-DA e DHE. (F) Microscopia de fluorescência

usando o probe Mitosox. Média ± Erro Padrão, n=65 (controle) e n=60 (exposto). Valor de *p<0.05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

Os efeitos tóxicos do mercúrio são conhecidos, sendo um deles a promoção do estresse oxidativo, o que acaba alterando a função das células gerando danos patológicos ou fisiológicos de várias células, podendo levar inclusive à morte celular. Outrossim, a toxicidade do mercúrio ao promover alteração no estado redox está relacionada a superprodução de EROs ou a uma redução do sistema de defesa antioxidante (LI et al., 2019; ZHAO et al., 2021). O aumento de EROs também está relacionado com o aumento da oxidação de: lipídios, proteínas, DNA, e leva a diminuição da concentração eritrocitária e dos níveis de GSH, gerando danos nos

linfócitos (HAN et al., 2005; FIDAN et al., 2005; IARMARCOVI et al., 2005). Shenker & cols (1993) mostraram em um estudo *in vitro*, que compostos mercúricos em baixas concentrações (0,6 - 5 μM) levam à morte celular de monócitos e linfócitos.

As células T estão continuamente em interação com células fagocíticas, que são conhecidas por gerar quantidades significativas de espécies reativas durante o fenômeno denominado "burst respiratório" (BELIKOV, SCHRAVEN e SIMEONI, 2015). Esse processo envolve uma rápida e acentuada produção de espécies reativas de oxigênio, desempenhando um papel crucial na dinâmica intercelular entre as células T e fagocíticas e o contato com elas pode auxiliar na ativação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), potencialmente resultando em estresse oxidativo (ZHANG et al., 1992).

Nas células do sistema imunológico, a enzima NADPH oxidase 2 (NOX-2), localizada na membrana de fagócitos e linfócitos, desempenha um papel crucial na geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Essa produção de H2O2 possui a capacidade de oxidar a glutationa presente nos linfócitos, além de sinalizar a formação do ânion radical superóxido nas mitocôndrias. Adicionalmente, induz a expressão de proteínas pró-apoptóticas, ativando assim a via de sinalização que conduz à morte celular (JACKSON et al., 2004; BELIKOV, SCHRAVEN e SIMEONI, 2015).

6.6. Morfologia de células mononucleares

Avaliar a morfologia das células mononucleares é uma forma de mensurar possíveis danos a estas células, a fim de estimar possíveis diferenças na membrana dessas célula. Foi possível constatar um maior nível de rugosidade na superfície membranar das células do grupo exposto quando comparado ao controle (Figura 13).

Figura 13. A exposição em ambiente contaminado aumenta a rugosidade da membrana plasmática das células mononucleares dos pescadores expostos em comparação aos controles.



Fonte: Autor, 2023.

A formação de superfícies rugosa ou também conhecidas como microvilosidades, pode refletir alterações funcionais em células mononucleares (Yang et al. 1989). As mudanças estruturais em linfócitos estão ligadas a um aumento do estresse oxidativo (LIOI et al., 1998). Além disso, nosso grupo, em estudos realizados com pescadores em anos anteriores, mostrou que a exposição ao mercúrio resulta em maior produção de espécies reativas de oxigénio (EROs) nas células mononucleares, relacionado com um comprometimento das atividades de enzimas antioxidantes, assim como no sistema redox da glutationa (SHARPE, GIST e BASKIN, 2013; JAMES et al., 2009; SILVA-FILHO et al., 2021).

6.7. Atividade do sistema antioxidante em eritrócitos

Para compreender como funciona o sistema antioxidante nos eritrócitos frente à exposição a contaminantes como o mercúrio, avaliamos a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx (Figura 14). A superóxido dismutase, tem como função catalisar a reação de conversão do radical ânion superóxido em H₂O₂ e a catalase (CAT) de converter H₂O₂ em H₂O e O₂. Observamos nos voluntários expostos um aumento de 159% e 22% respectivamente na atividade de tais enzimas (Figura 14 A-B). No entanto, quando avaliamos a atividade da glutationa peroxidase, que assim como a catalase, decompõe H₂O₂ em H₂O, encontramos sua atividade diminuida em 33% no grupo exposto quando comparado com o grupo controle (Figura 14 C). Provavelmente tal evento ocorreu porque o mercúrio pode se ligar ao selênio em enzimas como a GPx dependentes de selênio que vai servir de cofator, formando um complexo, o que pode resultar na diminuição da atividade catalítica de tal enzima (SPILLER, 2018). Ainda existem estudos que apontam que a diminuição de GPx pode ser proveniente da diminuição dos níveis de GSH, já que tal enzima é dependente da glutationa para realizar a sua atividade normalmente (BARCELOS et al., 2011; GROTTO et al., 2009).

Figura 14. Exposição ao ambiente contaminado modifica o sistema antioxidante dos eritrócitos de pescadores expostos em comparação com os controles. (**A**) Atividade de superóxido dismutase (SOD, 251.8 ± 10.87 vs. 653.1 ± 29.26 U mg⁻¹ de proteína. (**B**) Atividade da catalase (CAT, 0.4124 ± 0.011 vs. 0.502 ± 0.018 K mg⁻¹ proteína). (**C**) Atividade da glutationa peroxidase (GPx, 31672 ± 967.3 vs. 21266 ± 968.2 U mg⁻¹ de proteína). Os experimentos foram realizados em duplicata. Média \pm Erro Padrão, *n*=65 (controle) e *n*=60 (exposto). Valor de **p*<0.05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

A produção de EROs pode levar a ativação de cascatas de sinalização de proteção contra estresse, os quais são gerados por fatores abióticos como a exposição de metais. As enzimas superóxido dismutase e catalase são enzimas indutíves que tendem a aumentar suas atividades quando ocorre o aumento de EROs afim de retornar a homeostase celular (MITTLER, 2002; CALGAROTO et al., 2010).

Contudo tal mecanismo não foi o suficiente, já que as produções de espécies reativas continuam altas no grupo exposto.

6.8. Marcadores secundários do estresse oxidativo em eritrócitos

Em sistema biológico o estresse oxidativo pode ser avaliado através da quantificação de marcadores secundários como possíveis danos celulares em biomoléculas diversas (peroxidação lipídica, proteínas carboniladas, conteúdo tiol livre, GSH, GSSG e a razão GSH/GSSG) (Figura 15). Quando verificamos a formação de um dos produtos de peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA), o grupo exposto ao mercúrio aumentou em 89% a produção de tal composto se comparado com o grupo controle (Figura 15 A). A quantificação de proteínas carboniladas demonstrou um aumento em torno de 300% nos voluntários expostos (Figura 15 B). Além disso, foi possível observar uma redução do conteúdo tiólico reduzido (SH) em 41% nos eritrócitos dos pescadores em relação ao controle (Figura 15 C). Tais resultados refletiram de forma negativa na modulação do sistema da glutationa, visto que houve uma redução no conteúdo de GSH (15%) e um aumento do GSSG (29%), e quando calculado a razão GSH/GSSG houve uma redução em torno de 37%, no grupo de pescadores em relação ao controle (Figura 15 D-F).

Figura 15. Exposição ao ambiente contaminado aumenta o dano oxidativo de biomoléculas e diminui o poder redutor celular nos eritrócitos de pescadores expostos em comparação com os controles. (A) Teor de malondialdeído. (B) Proteína Carbonilada. (C) Teor total de tiol. (D) Teor de GSH. (E) Conteúdo de GSSG. (F) Razão GSH/GSSG. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média ± Erro Padrão, *n*=65 (controle) e *n*=60 (exposto). Valor de **p*<0.05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

Uma maior produção de espécies reativas de oxigênio pode reagir com lipídeos formando produtos de peroxidação lipídica como o malondialdeído, o 4-hidroxinonenal e espécies reativas de lipídeos como alcoxil e peroxil que por sua vez reagem com as proteínas oxidando-as (CURTIS et al., 2012). Ademais, em situações de estresse oxidativo, os grupos tióis livres podem ser oxidados afetando a proteção das células

contra mais estresse oxidativo. Em um estudo com comunidades da Amazônia no Brasil foi demonstrado que o mercúrio causa redução dos grupos sulfidrilas na população ribeirinha que consumia do peixe local contaminado com tal metal (GROTTO et al. 2010). Além do tiol total, a glutationa é um antioxidante importante, principalmente o tripeptídeo, GSH. A reatividade do GSH com o Hg é devido aos grupos SH provenientes do resíduo do aminoácido Cisteína, no qual o mercúrio se liga a esses grupos por possuir alta afinidade, desta forma ocorre um desequilíbrio em sua forma oxidada e reduzida (GOGOI et al. 2018).

7. CONCLUSÕES

Esses resultados nos levam a acreditar que existe uma possível influência da contaminação ambiental com mercúrio na indução do estresse oxidativo, visto que os PBMCs dos pescadores apresentaram alterações morfológicas e alterações no estado redox. Além disso, devemos levar em conta que o Hg contaminante está comprometendo a funcionalidade dos eritrócitos, levando à diminuição da capacidade de captação de oxigênio e ainda alterações estruturais na hemoglobina e outras biomoléculas que compõem tal célula.

Em suma, nosso estudo mostra que a contaminação por mercúrio no CELMM afeta diretamente a população que habita em torno de tal Laguna, onde mostramos os efeitos da toxicidade de tal contaminação em células sanguíneas. Sabemos que no Brasil, bem como no estado de Alagoas, são escassos os estudos que realizem o monitoramento de uma população extremamente vulnerável, que é submetida a poluição ambiental que tem relação direta com danos à saúde humana.

8. PERSPECTIVAS

Como perspetivas pretendemos finalizar a análise de lesão no DNA nuclear e mitocondrial e finalizar a quantificação de mercúrio na urina.

9. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MERCÚRIO EM MODELO ANIMAL HIPERCOLESTEROLÊMICO

9.1. Revisão da literatura

9.1.1 Aterosclerose

As lipoproteínas que têm como função transportar o colesterol e outros lípides estão classificadas em cinco classes, sendo diferenciadas pela densisdade: alta, intermédiária, baixa e muito baixa (HDL, IDL, LDL e VLDL respectivamente) e os quilomícrons. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é responsável principalmente pelo transporte de colesterol no sangue e são removidas da circulação por meio de receptores que são expressos em tecidos esteroidogênicos, principalmente pelo fígado e tecidos em proliferação (BROWN & GOLDSTEIN, 1986). Depois de ser captado pelas celulas, o colesterol derivado das lipoproteínas realiza diversas funções regulatórias e isso inclui a supressão da HMG-CoA redutase, enzima que catalisa a etapa limitante da biossíntese do colesterol, e a supressão da transcrição do gene do receptor da LDL (GOLDSTEIN & BROWN, 1992). Em contrapartida, quando se tem um excesso de LDL-colesterol no plasma, pode ocorrer aterosclerose.

A aterosclerose é considerada uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo de colesterol e células inflamatórias nas paredes das artérias. O estresse oxidativo proveniente da produção de espécies reativas leva a oxidação da LDL (ox-LDL), que por sua vez causa disfunção endotelial e recrutamento dos monócitos circulantes que ao chegarem na íntima das artérias se diferenciam em macrófagos e internalizam lipoproteínas modificadas (ox-LDL). Esses macrófagos sobrecarregadoscom colesterol são chamados de células espumosas devido à sua aparência. A evolução da placa de ateroma leva também a uma maior proliferação do músculo liso, que secretam colágeno, transformando assim a placa aterosclerótica gordurosa em uma placa mais fibrosa e mais estável. O crescimento da placa ou seu rompimento podem precipitar os eventos clínicos, tais como trombose, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. (GOLDSTEIN & BROWN, 1992; TALEB, 2016; OLIVEIRA & VERSESI, 2019; BROWN E GOLDSTEIN, 1983).

A hipercolesterolemia familiar tipo 1 ou homozigótica, é uma doença metabólica hereditária que que provoca aterosclerose prematura letal. A forma homozigótica é rara, porém a heterozigótica é muito frequente, cerca de 1/500 a 1/250. O defeito está

no funcionamento do gene do receptor de LDL (LDL_R) ou na apolipoproteína B (apo B; um ligante para LDL-C) ou na proproteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), uma proteína que controla o número de LDL_R nos tecidos (DEFESCHE et al., 2017, AUSTIN et al., 2004).

Desta forma, como a aterosclerose é a principal responsável pelas doenças cardiovasculares, e segundo a OMS, o aumento da poluição química está relacionada com o desenvolvimento de problemas cardiovasculares, nossa pergunta neste trabalho foi se a exposição a metais como mercúrio pode acentuar os fatores de risco para aterosclerose.

Os mecanismos principais que se relacionam com a gênese da aterosclerose são o estresse oxidativo e a inflamação. Estes também estão presentes na intoxicação por metais pesados. Vercesi e colaboradores mostraram que as mitocôndrias são fontes importantes de EROs na condição de hipercolesterolemia relevantes para o desenvolvimento de aterosclerose (OLIVEIRA & VERCESI, 2020).

9.1.2 Mitocôndria

Eugene Kennedy e Albert Lehninger descobriram em 1948 que as mitocôndrias são os locais da fosforilação oxidativa. As mitocôndrias são similares a bactérias tanto no seu tamanho e também por possuírem seu próprio genoma (na forma de uma molécula de DNA circular), seus próprios ribossomos e tRNAs. Atualmente, é amplamente reconhecido que as mitocôndrias tem sua origem em um evento de endossimbiose, uma origem eubacteriana, no qual procariontes aeróbicos foram internalizados por células eucarióticas anaeróbicas. Esse processo, que se repetiu com procariontes capazes de fotossíntese, deu origem aos cloroplastos. A mitocôndria possui duas membranas, sendo elas: uma externa livremente permeável a pequenas moléculas e íons, e uma interna impermeável à maioria das pequenas moléculas e íons incluindo H⁺, sendo necessário transportadores específicos ou canais para passagem de todas as biomoléculas necessárias para o pleno funcionamento de tal organela (ALBERTS et al., 2010, NELSON & COX, 2022, NUNNARI & SUOMALAINEN, 2012).

A matriz mitocondrial possui o complexo piruvato-desidrogenase, algumas enzimas do ciclo de Krebs, a via da β-oxidação de ácidos graxos e ainda a via de oxidação de aminoácidos, ou seja, praticamente todas as reações de oxidação (exceto a glicólise) ocorrem na matriz mitocondrial, e todas essas vias possuem

transportadores para que os substratos possam entrar na mitocôndria O ciclo Krebs gera as coenzimas reduzidas Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida (NADH) e Flavina Adenina Dinucleotídeo Reduzida (FADH₂) (METZLER, 2001), sendo responsáveis por transportar elétrons que ficam localizados em ligações com hidrogênios (H), na região dos anéis aromáticos **(Figura 16).**

Figura 16. Estrutura racional do NADH e FADH₂.



Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 8ª edição, 2022.

Esses carreadores transportam os elétrons para a cadeia transportadora de elétrons (CTE), onde ocorre a conversão do O₂ em H₂O e formação de ATP através da ATP sintase. A CTE possui quatro complexos e algumas desidrogenases acoplados a membrana interna mitocondrial, onde os complexos I e II fazem a
transferência dos elétrons para a ubiquinona, que é uma quinona lipossolúvel, também conhecida como coenzima Q10, capaz de aceitar elétrons a partir de dois doadores, o NADH (complexo I) e FADH₂ (complexo II). O complexo III transporta os elétrons que recebeu da ubiquinona para o citocromo *c*, e por fim, o complexo IV transfere os elétrons recebidos do citocromo *c* para o O₂ sendo em última instância reduzido à água (NELSON & COX, 2022).

A teoria quimiosmótica de Mitchell explica a força motriz transformada em energia para síntese de ATP. Cada complexo respiratório possui um substrato específico ao qual ele irá reagir gerando um fluxo de elétrons através da CTE e acompanhado de transferência de prótons da matriz para o espaço intermembranas, o que gera tanto um gradiente químico (Δ pH) quanto um gradiente elétrico ($\Delta \Psi$). Esta diferença de potencial eletroquímico de membrana é a fonte de energia para síntese de ATP, quando os prótons retornam para a matriz através da ATP sintase, dissipando este potencial de membrana e fornecendo energia para conversão do ADP+Pi em ATP. (Figura 17) (MITCHELL, 1979). Vale ressaltar que a impermeabilidade da membrana interna, inclusive ao H⁺, é a responsável pelo retorno praticamente obrigatório de prótons apenas pela ATP-sintase, ou seja, um acoplamento completo entre o funcionamento da cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa.



Figura 17. Figura representativa do funcionamento da cadeia transportadora de elétrons.

Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 8ª edição, 2022.

O Complexo I ou NADH desidrogenase, é uma enzima com peso molecular de 980 kDa, possui 42 cadeias diferentes de polipeptídios, uma flavoproteína, a Flavina Mononucleotídeo (FMN) e ao menos seis centros de ferro-enxofre (Fe-S). Nele ocorre a catálise onde a transferência de um íon hidreto e dois elétrons do NADH, proveniente do ciclo de Krebs, para FMN que é reduzido para FMNH₂. Em seguida os elétrons são-carreados pelos centros de Fe-S para a Ubiquinona (UQ) que é reduzida em ubiquinol (UQH₂), enquanto isso ocorre ao mesmo tempo a transferência de quatro prótons da matriz para o espaço intermembranar **(Figura 18)**. Quando os prótons são bombeados, provenientes da dissociação da água, a matriz se torna carregada negativamente e o espaço intermembrana fica carregado positivamente (NICHOLLS & FERGUSON, 2013, NELSON & COX, 2022, METZLER, 2001). É importante destacar que o fluxo dos elétrons no sentido mencionado é a diferença de potencial de redução (E) existente entre todos os componentes da cadeia, que começa com um potencial negativo e termina com um potencial positivo.

O complexo II ou succinato desidrogenase, possui peso molecular de 140 kDa, quatro subunidades proteicas diferentes, duas delas são transmembranares sendo elas a C e D contendo grupo heme b e um sítio de ligação para a ubiquinona. As subunidades A e B são extensões citoplasmáticas, contêm três centros de 2Fe-2S, com Flavina Adenina Dinucleotídeo oxidada (FAD) ligada covalentemente e um sítio de ligação para o seu substrato, succinato. Desta forma, a sequência de transferência é do sítio de ligação do succinato que é reduzido a fumarato e carreia dois elétrons para FAD que por sua vez é reduzido a FADH₂ e depois para os centros de Fe-S, e por fim, para a UQ que é reduzida a UQH₂. Este complexo é o único que tem o compartilhamento entre o ciclo de Krebs e a cadeia transportadora de elétrons. **(Figura 18)** (NICHOLLS & FERGUSON, 2013, NELSON & COX, 2022, METZLER, 2001).

Vale ressaltar que o UQH₂ se direciona para o complexo III ou ciclo Q, o qual possui peso molecular de 240 kDa, e transfere um elétron para os centros de Fe-S que por sua vez carreia tal elétron para o citocromo *c*, que faz a comunicação do complexo III e IV através do transporte de elétrons (Figura 18). Quando o UQH₂ doa um elétron, ele assume a sua forma de radial que é a semiquinona ('UQH) e se desloca para o final do complexo, logo depois outro radical semiquinona 'UQH reage com o primeiro e volta ao seu estado inicial de UQH₂, onde é reutilizado para doar outro elétron e essa reação libera uma UQ livre que vai para o início da CTE. Em conjunto com essas reações ocorre o bombeamento de quatro prótons, para o espaço

intermembranar (NICHOLLS & FERGUSON, 2013; NELSON & COX, 2022; METZLER, 2001).

Por último, tem-se o complexo IV ou citocromo oxidase, que é uma enzima que pode ter sua ação inibida por Cianeto (CN⁻), monóxido de carbono (CO) e azida sódica (NaN₃), possui peso molecular de 160 kDa, 4 subunidades dessa proteína. A subunidade I tem dois heme $a \in a_3$, além de um íon cobre (Cu_B). O heme a₃ faz um centro binuclear com o Cu_B, onde aceita elétrons do heme a.-A subunidade II possui dois íons cobre complexados com dois SH provenientes de duas cisteínas em um centro que também é binuclear (Cu_A). A citocromo c oxidase aceita até quatro elétrons, sendo um por vez do citocromo c. Desta forma, a transferência de elétrons ocorre do citocromo a_3 – centro Cu_B, onde a redução de O₂ ocorre (Figura 18). A redução do O₂ em 2H₂O necessita de quatro elétrons e quatro prótons que são bombeados através da membrana a cada ciclo catalítico [1] (NICHOLLS & FERGUSON, 2013, NELSON & COX, 2022, METZLER, 2001).

$$4 e^- + 8 H^+ + O_2 \rightarrow 2 H_2O + 4 H^+$$
 [1]



Figura 18. Transporte de elétrons pelo complexo I, II, III e IV.



Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 8ª edição, 2022.

A transferência de elétrons pelos complexos e seus mecanismos foram descritos também por Henry Taube, que dividiu em três processos, sendo eles esfera externa, esfera interna e mecanismo químico. A esfera externa é quando os níveis de energia do doador e receptor de elétrons se equiparam tornando a transferência de elétrons mais favorável mantendo a composição química e modificando apenas o estado de oxidação isso porque eles ressonam. Isso ocorre com enzimas que possuem centros metálicos. A esfera interna é quando moléculas com sistema π conjugado, como ocorre por exemplo com a UQ, onde os elétrons ocupam os orbitais vazios de simetria π , formando uma ligação geralmente com hidrogênio. No mecanismo químico, nos centros de Fe-S ocorre o carreamento dos elétrons devido a localização em diferentes níveis que essas estruturas promovem para os elétrons (TAUBE et al., 1953; TOMA, 2015).

A membrana mitocondrial interna tem um potencial eletroquímico que varia de -150 a 180 mV. Isso acontece porque há passagem de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar através de complexo I, III e IV. O potencial elétrico gerado se dá pela diferença de cargas, um lado mais positivo com mais prótons (H+) e o outro mais negativo com mais hidroxilas (OH⁻), advindos da H₂O presente na matriz mitocondrial. O potencial químico vem da variação de pH que ocorre devido a compartimentalização de H⁺ e OH⁻, podendo variar em cerca de 0,75 unidades, sendo o espaço intermembranar um pH mais ácido, e na matriz mitocondrial um pH mais básico. Contudo, a formação de potencial não é uma reação favorável energeticamente, por isso os prótons tendem a retornar para a matriz, através da enzima ATP-sintase (MITCHELL, 1979).

O peso molecular da ATP-sintase de 448,85 kDa. Esta enzima converte a energia proveniente da dissipação do potencial eletroquímico de protons para a síntese de Adenosina Trifosfato (ATP), isso quer dizer que a mitocôndria está acoplada e isso se deve a conexão obrigatória da síntese de ATP e o fluxo de elétrons pela CTE que gera o gradiente de protons **(Figura 19)**. A medida que essa reação ocorre, os prótons entram na matriz novamente através da subunidade F₀ proteica transmembranar (o, porque ela é sensível a oligomicina, droga que inibe a entrada de prótons) gerando a força próton-motriz que fornece energia cinética para que a subunidade F₁ (proteína periférica de membrana) que gira e funde a Adenosina difosfato (ADP) com o fosfato inorgânico (Pi) formando ATP (NELSON & COX, 2022).



Figura 19. Estrutura da ATP-sintase e demonstração experimental da sua rotação.

Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 8ª edição, 2022.

Ao estudar as mitocôndrias, é essencial avaliar sua funcionalidade e integridade para reproduzir experimentos com precisão. Para avaliar a funcionalidade das mitocôndrias, o primeiro experimento a ser realizado é a medição do consumo de O₂ pela cadeia de transporte de elétrons (CTE), o que pode ser feito com tecido permeabilizado, células ou mitocôndrias isoladas. Esse experimento visa fornecer substratos para os complexos da CTE, estimulando o funcionamento das mitocôndrias. Inicialmente, as mitocôndrias são expostas a uma mistura de substratos.

Para estimular o complexo I (glutamato, malato, piruvato e α -cetoglutarato) ou o complexo II (succinato), adicionam-se os respectivos indutores da geração das coenzimas reduzidas NADH ou FADH2. Esse estágio é denominado estado basal (V2). Em seguida, ADP é adicionado para iniciar a fosforilação oxidativa, aumentando a taxa de consumo de oxigênio devido à síntese de ATP – este estágio é chamado de estado de fosforilação (V₃). Quando todo o ADP é consumido, a mitocôndria entra em estado de repouso, que pode ser induzido pela adição de um inibidor como a oligomicina, que bloqueia a ATP sintase, resultando na redução ou possível inibição do consumo de oxigênio – este é o estado de repouso (V₄). Finalmente, para avaliar a velocidade máxima de consumo de oxigênio, um desacoplador químico (por exemplo, DNP, CCCP ou FCCP) é adicionado, transportando prótons do espaço intermembranar para a matriz sem utilizar a ATP-sintase – este estágio é conhecido como estado de desacoplamento (V_{cccp}). Este estado está associado à capacidade máxima de respiração, pois não é limitado pelo funcionamento da enzima que promove a síntese de ATP. Ao término do experimento, todas as velocidades de consumo de O₂ em cada estado mitocondrial são calculadas, fornecendo uma avaliação do funcionamento da CTE. Um dos parâmetros mais importantes é a razão entre V₃ e V₄, chamada Controle Respiratório (CR), que reflete a integridade das mitocôndrias. Quanto maior o valor dessa razão, melhor a qualidade/eficiência da mitocôndria (NELSON & COX, 2022).

Figura 20. Funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, medida experimental. A V₂ está representada pela adição do substrato succinato, a V₃ pela

adição de ADP +Pi, a V4 com adição de oligomicina ou venturicidina e por fim a Vcccp pela adição de DNP ou algum outro desacoplador.





Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 8ª edição, 2022.

9.1.3 Transição de permeabilidade mitocondrial

Em um experimento realizado com mitocôndrias, adicionando altas concentrações de Ca²⁺ foi possível observar que o inchamento mitocondrial era parcialmente revertido por complexação de cálcio usando EGTA (CROFTS & CHAPPELL, 1965). Foi sugerido que o inchamento poderia representar uma permeabilização da membrana interna da mitocôndria por meio do acúmulo de íons de Ca²⁺, mas um estudo posterior forneceu evidências de que o aumento da permeabilidade foi o resultado da abertura de um poro que ficou conhecido como poro de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). Uma das causas que levam a abertura do poro é que o Ca²⁺ pode interagir com o complex I, o que promove uma diminuição do fluxo de elétrons, maior entrada de água, inchamento da organela, perda de potencial de membrana interna e liberação de moléculas sinalizadores de morte celular, como por exemplo o citocromo *c* (HAWORTH & HUNTER, 1979; CROMPTON, 1987; KOWALTOWSKI et al., 2001).

A abertura do poro de TPM envolve diversas proteínas que sofrem influência de diversos e variados fatores que levam a abertura de tal poro. Uma das proteínas incluídas nesse processo é o transportador de nucleotídeo de adenina (ANT) que é reponsável por fazer a troca ADP por ATP através da membrana mitocondrial interna envolvendo diferença de cargas. Outra proteína é a ciclofilina D (CypD), que é uma isomerase com função catalítica vinculado ao envelopamento proteíco (RASOLA et al., 2010). Ainda são citados como participantes desse processo a hexoquinase, aspartato-glutamato e transportadores de fosfato (PiC), e a proteína paraplegia espástica 7 (SPG 7) que interage diretamente com a CypD (HALESTRAP et al., 1997, SHANMUGHAPRIYA et al., 2015). Um dos pontos mais importantes na abertura de tal poro é a oxidação de grupos tióis (SH) formando formando pontes dissulfeto e agregados proteicos na membrana (KOWALTOWSKI et al., 2001) **(Figura 21).**

Figura 21. Esquema que resume as proteínas envolvidas na abertura do poro transição de permeabilidade mitocondrial (TPM).



Fonte: FIGUEIRA et al., 2013.

Vale ressaltar que uma das forma de se avaliar integridade da mitocôndria é verificar sua suscetibilidade à TPM. Sempre que houver estresse oxidativo a mitocôndria será mais susceptível a apresentar TPM. Pode-se utilizar altas concentrações de Ca²⁺ ou outras moléculas potencialmente oxidantes que induzem o estresse oxidativo (LEITE et al., 2010; KOWALTOWSKI et al., 2000). Deve-se usar inibidores de TPM conhecidos, como fosfato de dinucleotideo de nicotinamida e adenina (NADPH), que contribui para a reconstituição dos sistemas antioxidantes da glutationa e da tioredoxina. Um dos agentes clássicos usado como inibidor da TPM é

a ciclosporina A (CsA), que é um fármaco imunossupressor que inibe a ciclofilina D de participar do agregado proteico que forma o poro. Um outro inibidor que pode ser usado é o EGTA, que é um quelante de Ca²⁺. Alguns outros redutores de nucleotídeos de piridina, redutores tiólicos, ditiotreitol e N-etilmaleimida (DDT e NEM) e catalase (varredora de H₂O₂) também são usados como inibidores da TPM (FACUNDO et al., 2007; KOWALTOWSKI et al., 1999; FERNANDES et al., 2014).

10. JUSTIFICATIVA

Achados recentes indicam que o Hg e suas espécies (inorgânicas e/ou orgânicas) estão envolvidos em diversas patologias tais quais: aterosclerose, disfunção endotelial e dislipidemias. O papel do Hg na aterosclerose ocorre de forma indireta por aumentar o colesterol total, triglicerídeos e LDL-C. Metais como cádmio (Cd), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) foram propostos como possíveis fatores que influenciam o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e os níveis de metais no sangue foram positivamente associados a escores de risco de aterosclerose (HARARI et al, 2019; CHOI et al., 2020). Como o estresse oxidativo é um mecanismo desencadeador da aterosclerose, nossa hipótese é que a toxicidade do Hg potencializa o desequilíbrio redox e disfunção metabólica de forma sistêmica contribuindo assim para um cenário aterogênico.

11.OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

11.1. Objetivo Geral

Avaliar marcadores e fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose no modelo de camundongo knockout do receptor de LDL hipercolesterolêmico exposto cronicamente ao Hg (30 dias 0,5 mg kg⁻¹ bw) na água potável.

11.2. Objetivo Específico

- Acompanhar possíveis alterações no peso dos camundongos LDLr ^{-/-} tratados ou não com HgCl₂;
- Quantificar mercúrio total em tecidos (fígado, cérebro, rim, pulmão e baço) e no sangue de camundongos LDLr^{-/-} tratados ou não com HgCl₂;
- Avaliar as imagens histológicas do fígado, coração, cérebro, rim, pulmão e baço.
- Medir os níveis de colesterol, triglicerídeos e glicemia dos animais LDLr/tratados ou não com HgCl₂, no plasma;
- Estimar a função dos eritrócitos através da captação de oxigênio nos camundongos LDLr/- tratados ou não com HgCl₂;
- Mensurar a quantidade de células da série de glóbulos brancos, bem como a atividade fagocitária dos macrofágos peritoniais de camundongos LDLr/tratados ou não com HgCl₂;
- Verificar o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, integridade mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos LDLr^{-/-} tratados ou não com HgCl₂;
- Avaliar, através de marcadores específicos, possíveis danos na função hepática e renal (AST, ALT, GGT e Ureia) em plasma de camundongos LDLr⁻ /⁻ tratados ou não com HgCl₂;
- Medir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF-a e PCR) em plasma de camundongos LDLr/⁻ tratados ou não com HgCl₂;
- Avaliar marcadores clássicos e secundários do estresse oxidativo em plasma, eritrócitos e homogenato de tecidos (rim e fígado) de camundongos LDLr/tratados ou não com HgCl₂.

Investigar a atividade de enzimas antioxidantes nos eritrócitos de camundongos LDLr^{-/-} tratados ou não com HgCl₂.

13.MATERIAIS E MÉTODOS

13.1. Animais

Camundongos knockout para o receptor de LDL (LDLr-/-) foram adquiridos do Centro Multidisciplinar de Pesquisas Biológicas em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/Unicamp, Brasil) proveninentes de uma colônia derivada de criadores do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê Universitário de Ética em Experimentação Animal, protocolo nº 5745-1 (CEUA/UNICAMP). Coortes de camundongos fêmeas n=8/grupo (4 semanas de idade) foram alojadas a 22 ± 2°C em um ciclo claro/escuro de 12 h e tiveram livre acesso a uma dieta aterogênica por um período de 8 semanas (22 g% de gordura saturada e 0,2% de colesterol, PragSoluções, Jaú, SP, Brasil). Camundongos fêmeas foram escolhidos porque são conhecidos por desenvolver aterosclerose mais grave do que os machos. HgCl₂ foi administrado na água de beber (3 mg L⁻¹) (grupo Hg) nas últimas 4 semanas do período experimental e comparado com água pura (grupo Controle). A dose de Hg (0,5 mg Kg⁻¹ BW) é cerca de 10 vezes maior que a dose mínima tolerável para humanos, segundo a OMS (AREFIEVA et al., 2016), entretanto é 10 vezes menor que a dose geral empregada para estudos de toxicidade em camundongos (5 mg Kg⁻¹) (LI et al., 2019). Ao final do período experimental, os camundongos foram anestesiados com isofluorano e decapitados para coleta de sangue.

13.2. Avaliação da função da hemoglobina

A capacidade de ligação do oxigênio na hemoglobina presente nos eritrócitos (Eri) dos camundongos LDLr ^{-/-}, foram avaliados utilizando um respirômetro de alta resolução (Oroboros Oxygraphy-2k, Innsbruck, Austria) com câmara de 2,0 mL, agitador magnético e termostato a 28°C. A concentração de proteínas totais utilizadas nos experimentos foi de 0,325 mg mL⁻¹. O eletrodo foi calibrado diariamente utilizando ditionito de sódio, e a concentração de oxigênio inicial foi fixada a 225 nmol mL⁻¹ (ROBINSON & COOPER, 1970). A capacidade máxima de captação de oxigênio foi determinada após 10s.

13.3. Determinação do nível total de mercúrio no sangue e órgãos

13.3.1. Instrumentação e procedimentos

Darâmotro

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). A s 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 6**.

T arametro	Condição
Comprimento de onda (nm)	253.7
Modo de medição	Altura máxima
Replicatas	3
Tempo de atraso (s)	15
Tempo de análise (s)	40
Tempo de lavagem da memória (s)	40
Ganho	10
Vazão de gás do arraste (mL min-1)	250
Vazão de gás do secador (L min ⁻¹)	2.5
Taxa de fluxo transportador (mL min ⁻¹)	9
Taxa de fluxo da amostra (mL min-1)	9
SnCl ₂ taxa de fluxo (mL min ⁻¹)	4.5
SnCl ₂ % (m/v)	2
HCI % (v/v)	20
KBr / KBrO ₃ (mM)	100 / 17

Tabela 6. Condições operacionais para o CV AFS para determinação de Hg total.

Condição

13.3.2. Amostras de órgãos

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 órgãos (de animais controle e expostos), a massa de cada órgão previamente liofilizado foi adicionada a um recipiente de digestão (cérebro, fígado, pulmão e rim: 220 - 250 mg e baço: 100 mg), 3,5 mL de HNO₃ (14 M), 1,0 mL de solução de peróxido a 30% (m/m) 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 7** 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).

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

Tabela 7. Programa de aquecimento para digestão em sistema fechado de amostrasbiológicas por radiação de micro-ondas.

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.

13.3.3. Amostra de sangue

As amostras de sangue foram submetidas a um procedimento de extração ácida (ZIMMER et al., 2002; SOUZA et al., 2013), seguido de análise direta da solução sem etapa de digestão. Para determinação de mercúrio total por CV AFS, 250 µL de cada amostra de sangue (dos animais controle e exposto), 1 mL de água deionizada e 4 mL de HNO₃ (14 M) foram adicionados a um béquer de 25 mL e mantidos em repouso por 1h. Após esse período, o sobrenadante foi filtrado e 2,50 mL desse sistema foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, foram adicionados 500 µL da mistura (1:1) de KBr/KBrO₃ (100/17 mM), 3 mL de água deionizada e a reação foi agitada por 5 min. Após esse período, foram adicionados 50 µL de solução de ácido ascórbico 12% (p/v) e 250 µL de antiespumante B 0,1% (v/v). Por fim, completou-se o volume até a marca de medição do frasco com água deionizada. As curvas analíticas foram preparadas de forma semelhante às amostras.

13.4. Preparação de eritrócitos para ensaios de estresse oxidativo

Após a separação do plasma, aproximadamente 150 μ L de eritrócitos foram adicionados a 1,5 mL de tampão de extração contendo 50 mM Tris-HCl (pH = 7,4) e 1 mM EDTA, homogeneizados em gelo em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e centrifugados a 1180xg e 4°C por 10 min. O sobrenadante foi então coletado e submetido à quantificação de proteína total. Uma solução de BSA (2 mg mL⁻¹) foi usada como concentração padrão de proteína.

13.5. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

O homogenato de sangue (80 µg de proteína) foi incubado em 50 mM de tampão carbonato 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) em 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 auto-oxidação de 1 µmol de epinefrina por minuto. Os resultados foram expressos em proteína U mg⁻¹ (MISRA & FRIDOVICH, 1972).

13.6. 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 sangue) 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 monitorada 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).

13.7. Atividade da glutationa peroxidase (GPx)

Foi monitorada a atividade da GPx 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 sangue 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 glutationa 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 1µmol de NADPH min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Os resultados foram expressos como U mg⁻¹ (PAGLIA & VALENTINE, 1967).

13.8. Contagem de glóbulos brancos por citometria de fluxo

O sangue total foi coletado em tubos contendo 100 µL EDTA, onde 100 µL de sangue total foi lisado duas vezes com tampão de lise de glóbulos vermelhos (150 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃ e 0,1 mM EDTA) por 10 min à temperatura ambiente seguido de lavagens com PBS e centrifugação a 300 *g* por 5 min a 4° C. As células brancas foram então suspensas na mistura de coloração e incubadas por 20 min a 4°C protegidas da luz. As células coradas foram lavadas e suspensas com PBS para aquisição de imagem. A aquisição foi realizada utilizando um citômetro de fluxo BD FACS Symphony (BD Biosciences) e os dados foram analisados com o software FlowJo (BD Biosciences). Em todos os casos, os parâmetros de dispersão direta e lateral foram empregados para a seleção da população e para a remoção de artefatos. As populações de leucócitos foram identificadas pela coloração com CD45+CD3+ (linfócitos), CD45+CD11b+Ly6G+ (neutrófilos), CD45+CD11b+Ly6C+Ly6G-

(monócitos) e CD45+CD11b+SiglecF+ (eosinófilos). Uma outra população das mesmas células não coradas foram usadas como controle em todos os experimentos (MCFARLAND et al., 2006, AGUIAR et al., 2023).

13.9. Ensaio de fagocitose de macrófagos

Macrófagos peritoneais (1 x 10⁵) retirados do peritonio dos animais com PBS esteril foram incubados por 30 min com 100 µL de zymosan corado de vermelho neutro (1 x 10⁷ partículas mL⁻¹) e fixado com solução de Baker (4% de formaldeído, 2% de cloreto de sódio, 1% de acetato de cálcio) por 30 minutos adicionais à 37°C. As células foram então lavadas duas vezes com tampão PBS e o corante vermelho-neutro foi solubilizado com 0,1 mL de álcool acidificado (10% ácido acético, 40% etanol em água destilada) por 30 min. A absorbância foi então detectada à 550 nm no equipamento Molecular Divices SpectraMax M3 (GOMES et. al 2016).

13.10. Isolamento de mitocôndrias de fígado

As mitocôndrias foram isoladas do fígado de camundongos por centrifugação diferencial (KAPLAN & PEDERSEN, 1983). O conteúdo mitocondrial foi calculado de acordo com o conteúdo de proteínas totais determinadas pelo método de Bradford, onde usamos em todos os experimetos 0,5 mg mL⁻¹. Os ensaios foram conduzidos em um meio de reação padrão contendo 250 mM de sacarose, 10 mM de Hepes, 2 mM K₂HPO₄, KCI 65 mM, MgCl₂ 1 mM (pH 7,2) à 28°C. Um pool de 5 mM substratos ligados a NAD contendo glutamato, malato, a-cetoglutarato e piruvato foram usado como substrato para o complexo I da cadeia transportadora de elétrons (MALAGUTI et al., 2014).

13.11. Respiração mitocondrial

O oxigênio consumido pela mitocôndria foi medido utilizando respirômetro de alta resolução (Oroboros Oxygraphy-2k, Innsbruck, Austria). Foi adicionado ao meio de reação o substrato para o complexo I (glutamato, malato, a-cetoglutarato e piruvato) e 200 µM de EGTA, a fosforilação foi iniciada com a adição de 300 µM de ADP. Após todo o ADP ser consumido e o estado de repouso ser iniciado foi adicionado 1 µg mL⁻¹ de oligomicina para forçar o estado de repouso, para o bloqueio

da ATP-sintase. Por fim, foi adicionado 1 µM de FCCP, um desacoplador químico, na tentativa de chegar ao estado máximo (ROBINSON & COOPER, 1970).

13.12. Potencial de membrana mitocondrial

A determinação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada utilizando uma sonda fluorescente chamada safranina O (5 μ M) em um espectrofluorímetro (Hitachi F-7000) à 28°C. A reação foi realizada em uma cubeta de 1 mL com 0,5 mg mL⁻¹ de proteína e um mix de substratos para o complexo I, o mesmo descrito acima. O comprimento de onda de excitação é de 495 nm, a emissão é de 586 nm e o slit de 5 mm (NUNES et al., 2019). Para os testes de TPM foi utilizado ciclosporina A (1 μ M) e EGTA (200 μ M) como inibidores do poro.

13.13. Análise bioquímica do plasma

Amostras de sangue foram coletadas após eutanásia por meio da decapitação do animal no estado alimentado com camundongos anestesiados, foi usado EDTA como anticoagulante. Os níveis de glicose foram medidos usando um glicosímetro portátil com o sangue total (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Suíça). O colesterol total e os triglicerídeos do plasma foram medidos no plasma usando kits comerciais padrão (Randox Laboratories Ltd). As funções hepática (ALT, AST e GGT) e renal (Ureia), do plasma, foram determinadas usando kits Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Os níveis plasmáticos de citocinas (IL-6, TNF-α e CRP) foram medidos com kits ELISA comerciais (R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos ou eBioscience, Estados Unidos). Todos os experimentos foram determinados em uma leitora de placas (Molecular Devices, SpectraMaxM3).

13.14. Preparação de tecido homogeneizado para marcadores clássicos e secundários

Aproximadamente 0,1 g de tecido (fígado ou rim) foram adicionados a 1,5 mL de tampão de extração contendo 50 mM Tris-HCI (pH = 7,4) e 1 mM EDTA, homogeneizado em gelo usando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e centrifugado a 1180 x g e 4°C por 10 min (SILVA-FILHO et al., 2021). Com o homogenato pronto foi determinado a proteína total pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

13.15. Quantificação do estado redox (relação GSH/GSSG)

A relação GSH/GSSG foi avaliada pela quantificação do teor de GSH e GSSG (HISSIN & HILF, 1976). Na reação de GSH e GSSG foram utilizados homogenato de tecido e de sangue (50 e 100 µg de proteína, respectivamente) e oftalaldeído (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 com N-etilmaleimida (NEM), um bloqueador de SH para tirar a interferência do GSH. A fluorescência foi monitorada em um leitor de placa (Tecan Infinite 200 pro) com λ_{ex} = 350 nm e λ_{em} = 420 nm. Uma curva analítica baseada em concentrações conhecidas de GSH e GSSG foi empregada para determinar as concentrações dessas biomoléculas nas amostras.

13.16. Peroxidação lipídica (teor de malondialdeído – MDA)

A técnica colorimétrica foi usada para determinar as substâncias tiobarbituriativas (TBARS) conforme descrito anteriormente (BUEGE & AUST, 1978). Um total de 450 µg de homogeneizado de tecido (fígado ou rim) de proteína foi adicionado a 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 30% (v/v) e agitado por 1 min. Em seguida, 200 µL de 10 mM Tris-HCl (pH = 7,4) foi adicionado ao material, agitado por 1 min e centrifugado a 1180xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante coletado (450 µL) foi misturado com ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% (m/v) (450 µL), que reagiu com os produtos da lipoperoxidação para formar um composto de cor rosa. Assim, a mistura foi incubada por 15 min a 100°C e então resfriada. Finalmente, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (AJX-6100PC, Micronal) a 535 nm. Os resultados foram expressos em mmol mg⁻¹ de proteína.

13.17. Teor de carbonil de proteína

A quantificação desses produtos (formação de grupos carbonilas) 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 usa 100 µL do homogenato de tecido (fígado ou rim). A diferença entre os grupos é que para o grupo controle usa 400 µL de HCI 2,5 M e para o grupo reação usa 400 µL de DNPH 10 mM (solubilizado em HCI 2,5 M), a partir daqui o procedimento é igual para todos. Foi incubado os dois

tubos em temperatura ambiente por 1h (agitar a cada 15 min), em seguida foi adicionado 500 μ L de TCA (2 M), para homogeneizar foi utilizado um vórtex e deixamos 5 min no gelo, posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10000x *g* por 10 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionado 500 μ L de TCA (1 M) para ressuspender o pellet gerado para repetir a centrifugação anterior. Novamente o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas usando uma mistura de etanol e acetato de etila (1:1 v/v) três vezes repetindo o mesmo processo de centrifugação, por fim ressuspensas em guanidina (6 M) e centrifugada a 10000x *g* por 10 min à 4 °C, em seguida, o sobrenadante foi recolhido para fazer a leitura. A absorbância foi medida a 370 nm por um leitor de placa e normalizada pela quantidade de proteína (Tecan Infinite 200 pro) e os resultados foram expressos em pmol mg⁻¹ proteína (REZNICK & PACKER, 1994).

13.18. Conteúdo do grupo sufidrila

O teor de sulfidrila foi determinado a partir da reação com DTNB (5,5'-ácido ditio-bis-2-nitrobenzóico). O homogeneizado de tecido (fígado ou rim, 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-HCI 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 como padrão contendo SH para determinar a concentração de tal grupo nas amostras em µM.

13.19. Análise de dados

Os resultados são apresentados como média \pm Erro e foram analisados utilizando o software GraphPad Prism ®8 e OriginPro 9.0. Os outliers foram identificados e removidos pelo teste de Grubb (alfa= 0,05). O nível de significância foi fixado em p \leq 0,05.

14. RESULTADOS

14.1. Análises bioquímicas e desenvolvimento corporal

Camundongos hipercolesterolêmicos (LDLr^{-/-}) expostos a níveis compatível com contaminantes de Hg em água potável exibiu elevação significativa nos níveis plasmáticos de colesterol (16%), os níveis de triglicerídeos (TG) possuem uma tendência de aumento, por outro lado na glicemia não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 22 A-C). Ao avaliar o desenvolvimento corporal dos animais expostos a cloreto de mercúrio (HgCl₂), não observamos diferença no peso corporal, e no peso dos órgãos relativamente ao peso corporal (coração, pulmões, fígado, baço, rins e cérebro) (Figura 22 D-E), quando comparados com os animais controles.

Estudos experimentais e epidemiológicos mostraram uma associação entre dislipidemias e progressão da aterosclerose (HEGELE et al., 2014; WIERZBICKI et al., 2019). Ainda, a contaminação por metais como o mercúrio pode levar ao aumento do colesterol e triglicerídeos plasmáticos (MOREIRA et al., 2012). A exposição ao Hg, por meio de evidências epidemiológicas, aumenta a prevalência de dislipidemia (LIM, CHUNG e PAEK, 2010, STRANDBERG et al., 2016).

Figura 22. Camundongos LDLr ^{-/-} tratados crônicamente com Hg tem nos níveis de colesterol, entretanto não ocorre diferença no desenvolvimento físico. (**A**) Colesterol total, (**B**) Triglicerídeos, (**C**) Glicemia, (**D**) Diferença de peso inicial e final, (**E**) Peso dos órgãos em relação ao peso corporal. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média ± Erro Padrão, *n*=8. Valor de **p*<0,05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

14.2. Quantificação de mercúrio no sangue e nos tecidos

Na literatura está bem documentado que as várias espécies de mercúrio possuem efeitos tóxicos em sistemas biológicos e principalmente no corpo humano, esse metal e seus derivados têm afinidade por alguns tecidos e órgãos específicos, como cérebro, músculos, rins e coração (GUIDA et al., 2016). Dentro desse contexto, determinamos o nível de retenção de Hg nos órgãos (fígado, rim, baço, pulmão, cérebro e sangue) dos animais tratados e observamos níveis elevados de mercúrio em todos os sistemas avaliados. Vale destacar que nos rins tal metal bioacumulou em maior magnitude, sendo 8,28 µg g⁻¹ a concentração de Hg encontrada em tal tecido (**Figura 23**). Provavelmente tais níveis de Hg em tal órgão pode ser causado devido alta capacidade de filtração do sangue deste órgão (CARNEIRO et al., 2014).

Figura 23. Acúmulo de mercúrio total em tecidos de camundongos hipercolesterolêmicos cronicamente expostos ao HgCl₂ na água de beber. Os valores de concentração de Hg total são expressos na matéria seca após a liofilização de cada tecido, exceto o sangue. Média \pm DP, *n*=8. Teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

Por ser um metal tóxico, o mercúrio pode afetar a fisiologia dos eritrócitos, pois ele reage com canais iônicos, transportadores, enzimas, tióis não-proteicos bioacumulando nos tecidos e no sangue, podendo desencadear vias de inflamação, estresse oxidativo, alterações em biomoléculas e necrose nos órgãos (ZHOU et al., 2019; CARNEIRO et al., 2015). Em um estudo realizado em camundongos swiss por Carneiro & cols (2014) foi demonstrado que o mercúrio inorgânico pode ser convertido

em mercúrio orgânico e vice-versa, e que mesmo quantidades baixas de mercúrio no cérebro podem causar efeitos danosos que afetam a estrutura do tecido e causam inflamação. Ainda, no mesmo trabalho, mostraram que 70% do mercúrio encontrado estava bioacumulado nos rins (CARNEIRO et al., 2014). Esse achado é muito similar aos resultados obtidos em nossa pesquisa, que demonstrou a bioacumulação deste metal nos tecidos e sangue.

14.3. Prova de função hepática e renal

A exposição a metais tóxicos, como mercúrio, pode ser uma preocupação para a saúde humana podendo induzir doenças renais e hepáticas (BHARTI et al., 2016, ZHUANG et al., 2017). A forma mercurial que é prioritariamente absorvida pelo rim é a inorgânica (NUYTS, 1995, ZALUPS, 1998). Em Células do fígado expostas a produtos químicos pode ocorrer disfunção, danos celulares e falência do órgão (BERRAHAL et al., 2011, PARK et al., 2021 MIANDARE et al., 2016).

Desta forma, a funcionalidade destes orgãos foi aferida através de marcadores bioquímicos de função hepática, como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamil transferase (GGT), enquanto para danos renais foram avaliados os níveis de uréia no plasma. Os resultados obtidos mostram que os camundongos LDLr^{-/-} expostos ao Hg tiveram um aumento na atividade da GGT em 62% e os níveis de uréia em 149%, enquanto os níveis de ALT e AST não tiveram diferenças significativas **(Figura 24)**. Esses dados demonstram que a exposição e bioacumulação desse metal leva a danos hepáticos e renais

Figura 24. A exposição a HgCl₂ leva ao aumento de marcadores de danos hepáticos e renais em plasma de camundongos LDLr ^{-/-}. (**A**) Atividade da alanina aminotransferase (ALT). (**B**) Atividade da aspartato aminotransferase (AST). (**C**) Atividade da gama GT (GGT). (**D**) Quantificação de ureia. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média ± Erro Padrão, *n*=6-8. Valor de **p*<0,05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

14.4. Imagens histólogicas dos tecidos

A quantificação de mercúrio nos tecidos segue a sequência de maior para menor: rim > pulmão > fígado > baço > cérebro. Porém, as alterações morfológicas não seguem a mesma ordem do acúmulo de Hg, destacando que cada tecido tem uma sensibilidade diferente. Todos os tecidos analisados de camundongos expostos ao Hg apresentaram algum grau de acumulação desse metal, e alguns deles com níveis pequenos (baço, coração, pulmões), moderados (fígado e rins) e elevados (cérebro) de alterações na arquitetura do parênquima.

Em comparação com os controles, o baço, o coração e os pulmões expostos ao Hg apresentaram parênquima preservado, pigmento citoplasmático acastanhado e nenhum sinal de inflamação, morte celular e fibrose (Figura 25). A seta preta no baço mostra histiócitos gigantes. Setas brancas no baço e setas pretas no coração e pulmão mostram pigmentos marrons intracelulares compatíveis com acúmulo de metais que provavelmente seja o Hg.





Fonte: Autor, 2023.

Devido ao tratamento crônico com dieta rica em gordura, o fígado de camundongos controles apresentou esteatohepatite não alcoólica (EHNA), caracterizada por esteatose macrovesicular difusa (~90%), focos inflamatórios isolados e balonização rara (~10%). O fígado de camundongos expostos ao Hg mostrou sinais de piora da EHNA com focos inflamatórios mais ativos (setas brancas) e aumento de balonização (10-20%) (Figura 26). O pigmento citoplasmático acastanhado é observado principalmente nas células de Kupfer.

Os rins de camundongos expostos ao Hg apresentaram 10-20% de esclerose glomerular focal, em comparação com menos de 5% nos controles. Algumas alterações tubulares renais, como desnudamento e necrose, são observadas em ambos os grupos e, portanto, provavelmente estão relacionadas ao procedimento de eutanásia.

Figura 26. Análises histológicas do fígado e dos rins de camundongos hipercolesterolêmicos cronicamente expostos ao HgCl₂ na água potável.



Fonte: Autor, 2023.

Finalmente, no cérebro de camundongos expostos ao Hg, observamos arquitetura parenquimatosa alterada, gliose generalizada com espaçamento desorganizado, aspecto multifocal e formação de nódulos microgliais (setas pretas) (Figura 27). Esses achados sugerem os estágios iniciais de lesões, como degeneração ou morte de neurônios.

Figura 27. Análises histológicas do cérebro de camundongos hipercolesterolêmicos expostos cronicamente ao HgCl₂ na água de beber.



Fonte: Autor, 2023.

A exposição ao mercúrio leva a danos em múltiplos orgãos (cérebro, fígado, rins), sendo que esses dados foram relatados anteriormente em ratas fêmeas Sprague-Dawley expostas a uma mistura de metais contendo chumbo, mercúrio e cadmio (ZHOU et. al., 2019). Ainda, o Hg leva a ativação de proteínas e cascatas que levam à apoptose de células do tecido hepático e acúmulo de mercúrio nos rins, causando aumento de infiltrações de células inflamatórias no interstício renal e necrose no tecido (RAMADAN et. al., 2021; LI et. al., 2018).

O cérebro é um dos órgãos mais afetados mesmo que por baixas concentrações de mercúrio, pois ele adentra a barreira hematoencefálica e gera um maior dano a esse órgão que é mais sensível a toxicidade do mercúrio, prejudicando a densidade neuronal e astrocitária; e promovendo uma má coordenação e comprometimento do aprendizado motor (WIGGERS et. al., 2016; ZHANG et. al., 2011; SANTANA et al., 2018).

14.5. Funcionalidade da hemoglobina medida através da captação de oxigênio em eritrócitos

A hemoglobina presente nos eritrócitos tem como função primordial realizar o transporte de oxigênio para os tecidos, nos nossos achados nesse modelo de

camundongos LDLr^{-/-} tratados com Hg, obtivemos resultados semelhantes aos encontrados nos eritrócitos dos pescadores expostos ao ambiente contaminado com Hg. Encontramos em nosso modelo que a função da captação de O₂ dos eritrócitos está diminuída em 50% (**Figura 28**).

Já foi demonstrado que, mesmo baixas concentrações de mercúrio no sangue, pode ocorrer redução da funcionalidade da hemoglobina em se ligar ao oxigênio (SALES et al., 2022). Estudos publicados por nosso grupo já comprovaram que a principal via de interação do mercúrio com a hemoglobina dos eritrócitos pode ser ligando-se a cisteína 93 (Cys93), grupos sulfidrilas livres específicos, que são mais acessíveis nas cadeias polipeptídicas da Hb (MAGALHÃES-SILVA et al., 2020)

Figura 28. As consequências da exposição ao HgCl₂ na função dos eritrócitos em camundongos LDLr ^{-/-}. (**A**) Gráfico representativo da captação de oxigênio em eritrócitos. (**B**) Quantificação da capacidade máxima de captação de oxigênio durante 10 s. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média \pm Erro Padrão, *n*=20. Valor de **p*<0,05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

14.6. Contagem de células brancas do sangue

Visto que se tem uma menor funcionalidade por parte dos eritrócitos e eles estão associados a maior proliferação dos leucócitos (PROFUMO et al., 2011), é necessário avaliar se existe algum comprometimento nas células do sistema imune como linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos. Em nosso estudo, encontramos que os camundongos LDLr ^{-/-} expostos à HgCl₂ tiveram uma diminuição de 22% na

contagem de linfócitos, um aumento de 107% nos monócitos e 89% nos eosinófilos, e ainda uma tendência de aumento nos neutrófilos (Figura 29).

Figura 29. Contagem de glóbulos brancos de camundongos LDLr ^{-/-} expostos à HgCl₂. (A) Linfócitos CD3+. (B) monócitos CD11b+Ly6G-Ly6C+. (C) neutrófilos CD11b+Ly6G+. (D) eosinófilos CD11b +SiglecF+. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média ± Erro Padrão, *n*=8. Valor de **p*<0,05 de acordo com o teste t de Student não pareado.





A contaminação por Hg tem uma associação direta com efeitos hematológicos como anemia, linfopenia, neutrofilia e basofilia, (VIANNA et al, 2019). Além disso, as alterações na contagem de glóbulos brancos podem estar associadas a inflamação e aterosclerose (SWIRSKI et al., 2013). Em nosso presente estudo, mostramos que a exposição ao Hg induziu efeitos prejudiciais nas células do sistema imune. Apesar da diminuição de linfócitos estar relacionada com deficiência imunológica, quando ocorre o aumento de monócitos e neutrófilos evidenciamos que no nosso modelo, a exposição ao Hg está relacionada a um estado pró-inflamatório.

14.7. Atividade fagocítica dos macrófagos

As principais funções dos macrófagos são as de realizar a defesa do corpo, a remodelação dos tecidos e ainda são células-chave envolvidas na inflamação aguda e crônica. Dependendo do microambiente, essas células também podem desenvolver fenótipos múltiplos (M0, M1 e M2) (ASSIS, DORIGHELLO e OLIVEIRA, 2022). Além disso, as respostas dos macrófagos vão além da imunidade podendo afetar de diversas formas as doenças crônicas, inflamatórias, metabólicas e cardiovasculares, como a aterosclerose (ASSIS, DORIGHELLO e OLIVEIRA, 2022).

Afim de estudar uma das células que está diretamente correlacionada com o desenvolvimento da aterosclerose, utilizamos os macrófagos (de origem peritoneal). Os macrófagos obtidos de camundongos expostos ao Hg mostraram atividade fagocítica aumentada (31%) estimada pelo ensaio de vermelho de zymosan quando comparados com as mesmas células obtidas dos animais controle **(Figura 30)**.

O aumento da capacidade fagocitária é frequentemente associado a um fenótipo reparador e anti-inflamatório dos macrófagos. Macrófagos do tipo próinflamatório e anti-inflamatório estão presentes em lesões ateroscleróticas, sendo o último mais comum no estágio inicial e o primeiro mais abundante nos estágios avançados da aterosclerose (RENTZ et al., 2020).

Figura 30. Macrófagos peritoneais de camundongos hipercolesterolêmicos cronicamente expostos a HgCl₂ na água de beber mostram maior atividade fagocítica (estimada pela absorção de vermelho neutro zymozan). Os experimentos foram realizados em duplicata. Média \pm Erro Padrão, *n*=16. Valor de **p*<0,05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

14.8. Produção de citocinas

Como em nossas análises de geração de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado obtivemos um aumento na produção de H₂O₂, resolvemos avaliar se essa elevação de espécies reativas de oxigênio poderia acarretar em um estresse oxidativo sistêmico levando a uma resposta imunológica, ou seja, uma maior liberação de marcadores de inflamação através da liberação de citocinas como a IL-6, TNF-α e a Proteína C Reativa (CRP).

Além disso, a aterosclerose é uma doença inflamatória, e o Hg poderia potencializar ainda mais esse estado inflamatório (FOWLER et al., 2021). Nesse sentido, investigamos em nosso modelo alguns marcadores de tal resposta e encontramos um aumento do TNF- α em 131% nos camundongos LDLr/⁻ expostos a Hg, por outro lado não houve diferença na IL-6 e CRP entre os grupos **(Figura 31).**

Figura 31. Níveis plasmáticos de indicadores de inflamação em camundongos LDLr⁻/⁻. (**A**) Quantificação de interleucina-6. (**B**) Quantificação de TNF- α . (**C**) Quantificação da proteína C reativa CRP. *n*= 16, p< 0,05. média ± Erro Padrão, teste *t* de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

As respostas inflamatórias podem levar ao aumento exacerbado de produção de espécies reativas de oxigênio, e tem como medidadores inflamatórios citocinas e quimiocinas (HUSSAIN et al., 2016), que podem levar a morte celular (GUMP et al., 2012).

Por exemplo, estudos *in vitro*, usando PBMCs humanos com exposição ao Hg inorgânico aumentaram as citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), e diminuíram a liberação de

citocinas anti-inflamatórias (GARDNER et al. 2009; KEMPURAJ et al. 2010). O TNFα é considerado um mediador patogênico crítico em pacientes com lesão hepática (SCHWABE & BRENNER, 2006) e em diversas doenças inflamatórias.

14.9. Funcionamento da cadeia transportadora de elétrons

Embora seja bem conhecido que as mitocôndrias são alvos importantes para metais tóxicos, os mecanismos da perturbação da função mitocondrial por metais tóxicos como o mercúrio não são bem compreendidos, principalmente em mitocôndrias de fígado, visto que é o órgão de primeira passagem para metabolização de drogas e diversos produtos químicos. Nos nossos achados, o Hg estava bioacumulado no fígado, numa quantidade 33 vezes maior nos animais expostos ao HgCl₂ quando comparado com os não expostos. Diante desse resultado, avaliamos a funcionalidade de mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos LDLr/⁻ expostos ao Hg, onde constatamos um comprometimento do controle respiratório (CR), conforme mostrado pela redução na razão da velocidade de respiração de fosforilação pela respiração de repouso (V₃/V₄, - 33%) **(Figura 32 E)**, bem como uma diminuição da eficiência da fosforilação oxidativa medida pela razão ADP/O (24%) **(Figura 32 F)**.

Figura 32. Respiração mitocondrial na presença de substrato complexo I de mitocôndrias isoladas do fígado de camundongos LDLr ^{-/-} expostos ao HgCl₂. (**A-B**) Gráfico representativo respiração mitocondrial e taxas representativas de consumo de oxigênio (OCR). (**C**) Taxa de Fosforilação (V₃), Estado III. (**D**) Velocidade de Repouso, Estado IV (V₄). (**E**) Controle respiratório, razão entre V₃ e V₄. (**F**) Razão ADP/O. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média ± Erro Padrão, *n*=6. Valor de **p*<0,05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

14.10. Poro de transição de permeabilidade mitocondrial

A integridade da mitocôndria pode ser medida através da sua suscetibilidade à transição de permeabilidade (TMP), que ocorre pela perda da integridade da membrana interna. Esta pode ser induzida pelo cálcio, ou pela maior produção de espécies reativas, e envolve proteínas específicas, como a Ciclofilina D (Cys D), transportador de nucleotídeo de adenina (ANT), hexoquinase, transportadores de aspartato-glutamato e fosfato (PiC) e a proteína paraplegia espástica 7 (SPG 7) (VERCESI et al, 2018; KOWALTOWSKI et al., 2001; HALESTRAP et al., 1997; SHANMUGHAPRIYA et al., 2015).

A sinalização de cálcio na TPM aparece em várias doenças como, dislipidemias, diabetes, obesidade e condições tóxicas e muitas vezes leva a morte celular por apoptose ou necrose (VERCESI et al, 2018; BATALHA et al, 2022) (OLIVEIRA et al, 2005; OLIVEIRA & VERCESI, 2020). No nosso presente estudo verificamos que a exposição de camundongos LDLr/⁻ ao Hg leva a um aumento da TPM induzido por cálcio, estimado pela redução do tempo para perda do potencial de membrana mitocondrial em 40% quando comparado com o controle **(Figura 33)**.

Ainda foi possível estimar que essa perda de potencial de membrana está ligado a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, visto que a TPM foi inibida na presença do bloqueador do poro, a ciclosporina A, que inibe a participação da ciclofilina D na abertura do poro. Utilizando o EGTA, que é um complexante de cálcio houve também uma total proteção da perda do potencial de membrana, ou seja, uma manutenção da integridade de tal organela.

Figura 33. Efeito do HgCl₂ sobre o potencial de membrana de mitocôndrias isoladas de camundongos LDLr ^{-/-} (0,5 mg de proteína mL⁻¹). (**A**) Figura representativa do potencial de membrana. Setas indicando adição de cálcio (25 μ M), adição de CSA (1 μ M) ou adição de EGTA (200 μ M). (**B**) Tempo de necessário para perda do potencial de membrana. Mito= Mitocôndria. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média ± Erro Padrão, *n*=6. Valor de **p*<0,05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

14.11. Produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial

Em todas as células eucarióticas a fosforilação oxidativa desempenhada pelas mitocôndrias produz níveis fisiológicos controlados de espécies reativas oxigênio (EROs), que é iniciando pela formação do ânion radical superóxido, que geralmente são convertidos em peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase e, finalmente, em água através de um sistema enzimático antioxidante muito eficiente, via catalase e a glutationa peroxidase (GPx) (COTINGUIBA et al., 2013).
Em nossos estudos, medimos a produção de H₂O₂ usando o probe Amplex red em mitocôndrias isoladas de fígado. Detectamos uma produção elevada de H₂O₂ mitocondrial (85%) no grupo exposto ao HgCl₂ em comparação com o grupo controle (Figura 34)

Figura 34. Produção de H₂O₂ em mitocôndrias de fígado de camundongos LDLr ^{-/-} expostas ao HgCl₂. (**A**) Figura representativa da geração de H₂O₂. (**B**) Quantificação mitocondrial de H₂O₂. (0,5 mg de proteína mL⁻¹) **p= 0,0082. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média ± Erro Padrão, *n*=6. Valor de **p*<0,05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

As mitocôndrias são uma das principais fontes produtoras de espécies reativas de oxigênio e, quando se tem um fator estressor, como os metais tóxicos, pode promover uma potencialização desse evento, por meio dessas organelas que são sensíveis a insultos exógenos, causando um vazamento ainda maior de elétrons durante o transporte de elétrons na cadeia através dos complexos (SARKAR & SIL, 2010; HALLIWELL & CROSS, 1994). O dano oxidativo induzido por EROs e a subsequente morte celular estão associadas a várias doenças humanas, como doenças cardiovasculares dentre outras (GILLE & SIGLER, 1995; GHOSH et al., 2012).

14.12. Sistema antioxidante em eritrócitos

Os resultados obtidos em camundongos LDLr/⁻ expostos ao Hg mostram um prejuízo na atividade enzimática do sistema antioxidante das hemácias, a SOD teve sua atividade reduzida em 64%, a catalase e a GPx, que transformam H₂O₂ em H₂O,

tiveram uma diminuição de 60% e 65%, respectivamente **(Figura 35)**. Nessa mesma temática, quando avaliamos outros marcadores do sistema redox, encontramos uma diminuição da glutationa reduzida em 10% e a razão GSH/GSSG também diminuiu 16%, confirmando prejuízo no funcionamento do sistema redox nos animais tratados com Hg **(Figura 35 D-F)**.

Figura 35. Camundongos LDLr ^{-/-} expostos a HgCl₂ cronicamente possuem prejuízo no sistema antioxidante em eritrócitos. (**A**) Atividade da superóxido dismutase (SOD). (**B**) Atividade da Catalase (CAT). (**C**) Atividade da Glutationa Peroxidase (GPx). (**D**) Quantificação dos níveis de Glutationa reduzida (GSH). (**E**) Quantificação dos níveis de glutationa oxidada (GSSG). (**F**) Razão GSH/GSSG. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média ± Erro Padrão, *n*=7. Valor de **p*<0,05 de acordo com o teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

Na literatura existe uma correlação positiva entre o aumento marcadores próinflamatórios com a redução do sistema antioxidante (ČOLAK et al., 2012). Pessoas que sofrem com doença metabólicas, como hipercolesterolemia, hipertensão, aterosclerose, diabetes e outras doenças cardiovasculares possuem uma diminuição na atividade da SOD (FATTMAN, SCHAEFER e OURY, 2003; KUMAR et al., 2020).

Na GPx por conter selênio como grupo prostético os íons de mercúrio podem ligar-se com os de selênio promovendo um problema no funcionamento da GPx, o mesmo ocorre com a GSH que possui enxofre que possui alta afinidade por Hg, dificultando a recomposição da glutationa reduzida (OBATA et al., 2006).

14.13. Marcadores secundários do estresse oxidativo

Além de estimar produção de espécies reativas em mitocôndrias isoladas e o funcionamento das enzimas antioxidante em eritrócitos, realizamos experimentos para investigar oxidação de lipídeos e proteínas, conteúdo de tiol livre, e estado redox da glutationa em homogenato de fígado e rins dos camundongos LDLr^{-/-} expostos ou não a HgCl₂, afim de entender se o estresse oxidativo gerado pelo tratamento crônico com Hg pode levar a alterações em diferentes órgãos, ou seja, de uma forma sistêmica.

Observamos em nossos resultados, que nos camundongos LDLr/⁻ expostos a Hg, houve uma maior peroxidação lipídica, tanto no fígado como nos rins, que foi mensurado através da quantificação de malondialdeído, um dos produtos gerados na reação de espécies reativas com os lipídeos. Os níveis de malondialdeído encontrados no fígado estava 2,7 vezes e nos rins 3 vezes maiores que no grupo controle.

Por sua vez, os produtos gerados advindos da oxidação de lipídeos podem reagir com proteínas oxidando-as gerando os grupos carbonil. Nesse contexto, o resultado que obtivemos foi um aumento dos níveis de proteínas carboniladas tanto no fígado como nos rins (3,9 e 1,3 vezes, respectivamente) em camundongos LDLr/⁻ expostos a HgCl₂ quando comparados com os controles, mostrando a influência do Hg em oxidar diversas biomoléculas. Sabendo que o Hg tem alta afinidade por grupamentos sulfidrila, presente principalmente nas cisteínas, e que uma diminuição nesses grupos é inversamente proporcional ao estresse oxidativo, quantificarmos o conteúdo de SH livre, tendo diminuido em cerca de 3,8 e 1,7 vezes no fígado e rins, respectivamente, no grupo tratado com HgCl₂.

Por fim, como na estrutura da glutationa reduzida existe o grupamento -SH, ao quantificar tal biomolécula constatamos que o seu conteúdo foi prejudicado negativamente, pois encontramos uma menor quantidade de GSH no fígado de 25%

e no rim de 13%. Por outro lado, os níveis de glutationa oxidada (GSSG) aumentaram no fígado e rim (122% e 18%, respectivamente). A razão GSH/GSSG estava diminuída em ambos os tecidos (fígado 37% menor e rim 26% menor) no grupo exposto se comparado ao controle (Figura 36).

Na condição de hipercolesterolemia, tanto o fígado quanto os rins são órgãos suscetíveis aos efeitos da evolução da doença. O fígado é impactado devido ao aumento dos níveis de colesterol e LDL plasmático causados por essa patologia. Vale destacar que uma das funções hepáticas consiste em regular os níveis de colesterol, eliminando o colesterol das lipoproteínas presentes na circulação (SCHEUER et al., 2000). Os rins sofrem com a maior produção de EROs pelo aumento da atividade da xantina-oxidoredutase, que por sua vez, leva a uma maior formação de produtos de peroxidação lipídica induzindo lesão renal, por sua ação direta vascular, consequência decorrente do desenvolvimento da doença (SCHEUER et al., 2000).

O fígado além de ser o órgão central do metabolismo, também é considerado alvo de substância tóxicas, por ser o orgão de primeira passagem e metabolização dessas substâncias, que é realizado com auxílio de enzimas do sistema citocromo P450, (RICE et al., 2014; NEWCOMER, 2022). Contaminações por mercúrio tanto em humanos como em modelo animal de ratos mostraram que podem causar danos hepáticos, como alterações morfológicas, funcionais, inflamação e apoptose (CHOI et al., 2017; ZHOU et al., 2019). Essas disfunções podem manifestar-se devido ao acúmulo de íons divalentes Hg²⁺ tanto no fígado quanto nos rins, decorrente da elevada concentração de cisteína nas metalotioneínas e glutationas presentes nesses tecidos. (ZALUPS & DIAMOND et al., 1987; SALAZAR-PAMMO et al., 2021);

É bem conhecido na literatura que o mercúrio inorgânico tem como um dos principais órgão-alvo os rins, pois é onde tal metal mais se acumula, e tem sua toxicidade bem pronunciada, também por ser a principal via de eliminação de compostos exogénos (CLARKSON, 1972; NEWCOMER, 2022). Em uma pesquisa realizada em camundongos Swiss realizado por Zhao & cols (2021), mostrou que a exposição ao mercúrio (160 mg L⁻¹ de HgCl₂ na água de beber durante 3 dias) aumenta os níveis de MDA e leva a diminuição dos níveis de glutationa reduzida.

Figura 36. Marcadores secundários do estresse oxidativo em homogenato de fígado e rim em camundongos LDLr ^{-/-} expostos ao Hg inorgânico. (**A**) Quantificação de malondialdeído em homogenato de fígado. (**B**) Proteína Carbonilada em fígado. (**C**) Conteúdo tiol reduzido em homogenato de fígado. (**D**) Quantificação de GSH em homogenato de fígado. (**E**) Quantificação de GSSG em homogenato de fígado. (**F**) Razão GSH/GSSG em homogenato de fígado. (**G**) Quantificação de malondialdeído em homogenato de Rim. (**H**) Proteína Carbonilada em homogenato de Rim. (**I**) Conteúdo tiol total em homogenato de Rim. (**J**) Quantificação de GSH em homogenato de Rim. (**K**) Quantificação de GSSG em homogenato de Rim. (**L**) Razão GSH/GSSG em homogenato de Rim. n= 16, p< 0,05. média ± Erro Padrão, teste t de Student não pareado.



Fonte: Autor, 2023.

15. CONCLUSÕES

Em suma, *in vivo*, a exposição crônica ao mercúrio inorgânico piora a hipercolesterolemia e prejudica a bioenergética mitocondrial e a função redox, perfis de glóbulos vermelhos e brancos e várias características morfológicas e funcionais do tecido. A maioria das alterações está relacionada ao estresse oxidativo sistêmico e tecidual. Esses achados sugerem que o Hg, nas concentrações encontradas em contaminação ambiental, induz alterações metabólicas e do sistema imunológico que provavelmente são relevantes para a aterogênese e outras doenças inflamatórias em indivíduos com pré-disposição a doença cardíaca.

16. REFERÊNCIAS

ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., PILLAI S. Cellular and molecular immunology, ninth edition, Elsevier, 2019, ISBN: 978-85-352-9074-5.

ABR 2019. Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2019. São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura. Recuperado de < https://www.peixebr.com.br/anuario-peixe-br-da-piscicultura-2019/> (Acessado em 03 de outubro de 2019).

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

AFRIDI H.I., KAZI T.G., TALPUR F.N., KAZI A., ARAIN S.S., ARAIN S.A., BRAHMAN K.D., PANHWAR A.H., KHAN N., ARAIN M.S., ALI J. Assessment of selenium and mercury in biological samples of normal and night blindness children of age groups (3-7) and (8-12) years. Environ Monit Assess. 187(3):82; 2015. doi: 10.1007/s10661-014-4201-z.

AGUIAR CF, CORRÊA-DA-SILVA F, GONZATTI MB, ANGELIM MK, PRETTI MA, DAVANZO GG, CASTELUCCI BG, MONTEIRO LB, CASTRO G, VIRGILIO-DA-SILVA JV, RIBEIRO G, JACCOMO V, PEREIRA ANDRADE MC, COSTA WL, GAMBARINI V, TERRA FF, ALVES-FILHO JC, SARAIVA CÂMARA NO, BORONI M, KELLER AC, MORAES-VIEIRA PM. Tissue-specific metabolic profile drives iNKT cell function during obesity and liver injury. Cell Rep. 42(1):112035; 2023. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112035.

AHAMED, M.; SIDDIQUI, M. K. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. Clin Chim Acta. 383(1-2):57-64; 2007. doi: 10.1016/j.cca.2007.04.024.

AIRES, M.M. Fisiologia. Editora Guanabara Koogan, 2ª edição, Rio de Janeiro. 101-315; 1999.

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. E WALER P. Biologia Molecular da célula. Editora Artmed ,5^a edição, Porto Alegre; 2010.

AMARA IE, ANWAR-MOHAMED A, ABDELHAMID G, EL-KADI AO. Mercury modulates the cytochrome P450 1a1, 1a2 and 1b1 in C57BL/6J mice: in vivo and in vitro studies. Toxicol Appl Pharmacol. 2013 Feb 1;266(3):419-29. doi: 10.1016/j.taap.2012.11.027.

ANA (Agência Nacional de Águas). Elaboração do Plano de Ações e Gestão Integrada do Complexo Estuarino-Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM)., Brasília. Agência Nacional de Águas. 99; 2004.

ARAÚJO M.S.L.C., CALADO T.C.S. Bioecologia do Caranguejo-Uçá Ucides cordatus (Linnaeus) no Complexo Estuarino Lagunar Mundáu/Manguaba (CELMM), Alagoas, Brasil. Revista da Gestão Costeira Integrada. 8(2):169-181; 2008.

AREFIEVA A.S., KAMAEVA A.G., KRASILSHCHIKOVA M.S. Low doses of mercuric chloride cause the main features of anti-nucleolar autoimmunity in female outbred CFW mice. Toxicol Ind Health. 32(9):1663-74; 2016. doi: 10.1177/0748233715573691.

AROCK M. Le polynucléaire basophile : du contrôle de l'immunité à celui des leucémies [The basophil: From control of immunity to control of leukemias]. Ann Pharm Fr. 80(1):9-25; 2022. doi: 10.1016/j.pharma.2021.05.005.

ASSIS L.H.P., DORIGHELLO G.G., OLIVEIRA H.C.F. Pro-inflammatory polarization of macrophages is associated with reduced endoplasmic reticulum-mitochondria interaction. Biochem Biophys Res Commun. 28;606:61-67; 2022. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.03.086.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Priority list of hazardous

substances. https://www.atsdr.cdc.gov/spl/. 2017.

AUFFRAY C., SIEWEKE M.H., GEISSMANN F. Blood monocytes: development,

heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol. 27:669-92;

2009. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557.

AUSTIN M.A., HUTTER C.M., ZIMMERN R.L., HUMPHRIES S.E. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. Am J Epidemiol. 160(5):407-20; 2004. doi: 10.1093/aje/kwh236.

BALESTIERI, F.M.P. Imunologia. Editora Manole, Barueri, SP. ISBN 85-204-1744-2; 2006.

BARCELOS GR, GROTTO D, SERPELONI JM, ANGELI JP, ROCHA BA, DE OLIVEIRA SOUZA VC, VICENTINI JT, EMANUELLI T, BASTOS JK, ANTUNES LM, KNASMÜLLER S, BARBOSA F JR. Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. Arch Toxicol. 85(9):1151-7; 2011. doi: 10.1007/s00204-011-0652-y.

BASU N., HORVAT M., EVERS D.C., ZASTENSKAYA I., WEIHE P., TEMPOWSKI J. A State-of-the-Science Review of Mercury Biomarkers in Human Populations Worldwide between 2000 and 2018. Environ Health Perspect. 126(10):106001; 2018. doi: 10.1289/EHP3904.

BATALHA C.M.P.F., VERCESI A.E., SOUZA-PINTO N.C. The Many Roles Mitochondria Play in Mammalian Aging. Antioxid Redox Signal. 36(13-15):824-843; 2022. doi: 10.1089/ars.2021.0074.

BELIKOV A.V., SCHRAVEN B., SIMEONI L. T cells and reactive oxygen species. J Biomed Sci. 15;22:85; 2015 doi: 10.1186/s12929-015-0194-3.

BERGLUND M., LIND B., BJÖRNBERG K.A., PALM B., EINARSSON O., VAHTER M. Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. Environ Health. 3;4:20; 2005. doi: 10.1186/1476-069X-4-20.

BERRAHAL A.A., LASRAM M., EL ELJ N., KERKENI A., GHARBI N., EL-FAZÂA S. Effect of age-dependent exposure to lead on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male rats. Environ. Toxicol. 26:68–78; 2011. doi: 10.1002/tox.20530.

BEU, C.C.L.; GUEDES, N.L.K.O; DE QUADROS, Â.A.G. Tecido conjuntivo, 2017. Disponível em: . Acesso em: 22 de abril de 2023

BHARTI J., VATSA R., SINGHAL S., ROY K.K., KUMAR S., PERUMAL V., MEENA J. Pregnancy with Chronic Kidney Disease: Maternal and Fetal Outcome. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 204:83–87; 2016. doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.07.512.

BIOQUÍMICA NAS ESCOLAS: Uma abordagem lúdica para o ensino médio. PET-Bioquímica, UFV – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, CCB II. 2014. ISBN: 9788591124916

BISINOTI M.C., JARDIM W.F. Behavior of methylmercury in the environment. Química

Nova, 27(4): 593-600, 2004.

BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem J, v. 128, 617-30; 1972.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 7;72:248-54; 1976. doi: 10.1006/abio.1976.9999.

BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. Annu Rev Biochem. 52:223-61; 1983. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.001255.

BROWN, M. S. & J. L. GOLDSTEIN. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science. 232(4746):34-47; 1986. doi: 10.1126/science.3513311.

CAI X., SHEN Y.L., ZHU Q., JIA P.M., YU Y., ZHOU L., HUANG Y., ZHANG J.W., XIONG S.M., CHEN S.J., WANG Z.Y., CHEN Z., CHEN G.Q. Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. Leukemia. 14(2):262-70; 2000. doi: 10.1038/sj.leu.2401650.

CALGAROTO N.S., CASTRO G.Y., CARGNELUTTI D., PEREIRA L.B., GONÇALVES J.F., ROSSATO L.V., ANTES F.G., DRESSLER V.L., FLORES E.M., SCHETINGER M.R., NICOLOSO F.T. Antioxidant system activation by mercury in Pfaffia glomerata plantlets. Biometals. 23(2):295-305; 2010. doi: 10.1007/s10534-009-9287-3.

CARMAN K.B., TUTKUN E., YILMAZ H., DILBER C., DALKIRAN T., CAKIR B., ARSLANTAS D., CESARETLI Y., AYKANAT S.A. Acute mercury poisoning among children in two provinces of Turkey. Eur J Pediatr. 172(6):821-7; 2013. doi: 10.1007/s00431-013-1970-2.

CARNEIRO M.F., MORAIS C., SMALL D.M., VESEY D.A., BARBOSA F J.R., GOBE G.C. Thimerosal induces apoptotic and fibrotic changes to kidney epithelial cells in vitro. Environ Toxicol. 30(12):1423-33; 2015. doi: 10.1002/tox.22012.

CARNEIRO M.F., OLIVEIRA SOUZA J.M., GROTTO D., BATISTA B.L., DE OLIVEIRA SOUZA V.C., BARBOSA F J.R. A systematic study of the disposition and metabolism of mercury species in mice after exposure to low levels of thimerosal (ethylmercury). Environ Res. 134:218-27; 2014. doi: 10.1016/j.envres.2014.07.009.

CASSATELLA M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. Immunol Today. 16(1):21-6; 1995. doi: 10.1016/0167-5699(95)80066-2.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Mercúrio e seus

Compostos. Ficha de informação toxicológica. 2017

https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wpcontent/uploads/sites/24/2013/11/Mercurio.pd

f. Acesso: 10/04/2023.

CHANCE B., SIES H., BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev. 59(3):527-605; 1979. doi: 10.1152/physrev.1979.59.3.527.

CHOI J, BAE S, LIM H, LIM JA, LEE YH, HA M, KWON HJ. Mercury Exposure in Association With Decrease of Liver Function in Adults: A Longitudinal Study. J Prev Med Public Health. 2017 Nov;50(6):377-385. doi: 10.3961/jpmph.17.099.

CHOI S, KWON J, KWON P, LEE C, JANG S-I. Association between Blood Heavy Metal Levels and Predicted 10-Year Risk for A First Atherosclerosis Cardiovascular Disease in the General Korean Population. Int J Environ Res Public Health. 17(6):2134; 2020. doi: 10.3390/ijerph17062134.

CHRISTGEN S., PLACE D.E., KANNEGANTI T.D. Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation. Cell Res. 30(4):315-327; 2020. doi: 10.1038/s41422-020-0295-8.

CICEK-SENTURK G., ALTAY F.A., ULU-KILIC A., GURBUZ Y., TUTUNCU E., SENCAN I. Acute mercury poisoning presenting as fever of unknown origin in an adult woman: a case report. J Med Case Rep. 8:266; 2014. doi: 10.1186/1752-1947-8-266.

CIMEN M.Y. Free radical metabolism in human erythrocytes. Clin Chim Acta. 390(1-2):1-11; 2008. doi: 10.1016/j.cca.2007.12.025.

CLARKSON T.W. The pharmacology of mercury compounds. Annu Rev Pharmacol. 12:375-406; 1972. doi: 10.1146/annurev.pa.12.040172.002111.

CLARKSON T.W., MAGOS L., MYERS G.J. The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. N Engl J Med. 349(18):1731-7; 2003. doi: 10.1056/NEJMra022471. PMID: 14585942.

CLARKSON TW. The toxicology of mercury. Crit Rev Clin Lab Sci. 1997;34(4):369-403. doi: 10.3109/10408369708998098.

CLEMENS M.R., WALLER H.D. Lipid peroxidation in erythrocytes. Chem Phys Lipids. 45(2-4):251-68; 1987. doi: 10.1016/0009-3084(87)90068-5.

CLOSE AH, GUO TL, SHENKER BJ. Activated human T lymphocytes exhibit reduced susceptibility to methylmercury chloride-induced apoptosis. Toxicol Sci. 1999 May;49(1):68-77. doi: 10.1093/toxsci/49.1.68. PMID: 10367343.

ČOLAK E., MAJKIĆ-SINGH N., ŽORIC L., RADOSAVLJEVIĆ A., KOSANOVIĆ-JAKOVIĆ N. The impact of inflammation to the antioxidant defense parameters in AMD patients. Aging Clin Exp Res. 24(6):588-94; 2012. doi: 10.3275/8593.

COTINGUIBA G.G., SILVA J.R.N., AZEVEDO R.R.S., ROCHA T.J.M., SANTOS A.F. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. Journal of Health Sciences, 2013, n. 3, v. 15, p. 231-237.

CROFTS A.R., CHAPPELL J.B. Calcium ion accumulation and volume changes of isolated liver mitochondria. reversal of calcium ion-induced swelling. Biochem J. 95(2):387-92; 1965. doi: 10.1042/bj0950387.

CROMPTON M., COSTI A., HAYAT L. Evidence for the presence of a reversible Ca2+-

dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. Biochem J.

245(3):915-8; 1987. doi: 10.1042/bj2450915.

CURTIS J.M., HAHN W.S., LONG E.K., BURRILL J.S., ARRIAGA E.A., BERNLOHR D.A. Protein carbonylation and metabolic control systems. Trends Endocrinol Metab. 23(8):399-406; 2012. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.008.

CUSTODIO HM, HARARI R, GERHARDSSON L, SKERFVING S, BROBERG K. Genetic influences on the retention of inorganic mercury. Arch Environ Occup Health. 2005 Jan-Feb;60(1):17-23. doi: 10.3200/AEOH.60.1.17-23.

DALLE-DONNE I., ALDINI G., CARINI M., COLOMBO R., ROSSI R., MILZANI A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. J Cell Mol Med. 10(2):389-406; 2006. doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x.

de MAGALHÃES SILVA M., DE ARAÚJO DANTAS M.D., DA SILVA FILHO R.C., DOS SANTOS SALES M.V., DE ALMEIDA XAVIER J., LEITE A.C.R., GOULART M.O.F., GRILLO L.A.M., DE BARROS W.A., DE FÁTIMA Â., FIGUEIREDO I.M., SANTOS J.C.C. Toxicity of thimerosal in biological systems: Conformational changes in human hemoglobin, decrease of oxygen binding capacity, increase of protein glycation and amyloid's formation. Int J Biol Macromol. 154:661-671; 2020. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.156.

DEFESCHE J.C., GIDDING S.S., HARADA-SHIBA M., HEGELE R.A., SANTOS R.D., WIERZBICKI A.S. Familial hypercholesterolaemia. Nat Rev Dis Primers. 3:17093; 2017. doi: 10.1038/nrdp.2017.93.

DEGASPERI GR, VELHO JA, ZECCHIN KG, SOUZA CT, VELLOSO LA, BORECKÝ J, CASTILHO RF, VERCESI AE. Role of mitochondria in the immune response to cancer: a central role for Ca2+. J Bioenerg Biomembr. 38(1):1-10; 2006. doi: 10.1007/s10863-006-9000-y.

DESIDERI A., FALCONI M. Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. Biochem Soc Trans. 31(6):1322-5; 2003. doi: 10.1042/bst0311322.

do NASCIMENTO S.N., BARTH A., GÖETHEL G., BAIERLE M., CHARÃO M.F., BRUCKER N., MORO A.M., BUBOLS G.B., SOBREIRA J.S., SAUER E., ROCHA R., GIODA A., DIAS A.C., SALLES J.F., GARCIA S.C. Cognitive deficits and ALA-Dinhibition in children exposed to multiple metals. Environ Res. 136:387-95; 2015. doi: 10.1016/j.envres.2014.10.003.

DOBRAKOWSKI M., BOROŃ M., BIRKNER E., KASPERCZYK A., CHWALIŃSKA E., LISOWSKA G., KASPERCZYK S. The Effect of a Short-Term Exposure to Lead on the Levels of Essential Metal Ions, Selected Proteins Related to Them, and Oxidative Stress Parameters in Humans. Oxid Med Cell Longev. 2017:8763793; 2017. doi: 10.1155/2017/8763793.

DOS SANTOS M.C., DA SILVA-FILHO R.C., LEITE A.C.R., NASCENTE C.C., BOTERO W.G., SANTOS J.C.C. Evaluation of potentially toxic elements in Mundaú Lagoon (Maceió, AL-Brazil): systematic environmental monitoring of water and food quality (in press). J. Braz. Chem. Soc. 32(9):1762-1772; 2021. doi: 10.21577/0103-5053.20210067.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 82(1):47-95; 2002. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.

EGGERS M.J., DOYLE J.T., LEFTHAND M.J., YOUNG S.L., MOORE-NALL A.L., KINDNESS L., MEDICINE R.O., FORD T.E., DIETRICH E., PARKER A.E., HOOVER J.H., CAMPER A.K. Community Engaged Cumulative Risk Assessment of Exposure to Inorganic Well Water Contaminants, Crow Reservation, Montana. Int J Environ Res Public Health. 15(1):76; 2018. doi: 10.3390/ijerph15010076.

ELLMAN G.L. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys. 82(1):70-7; 1959. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.

EL-MISSIRY M.A., ABOU-SEIF M. Photosensitization induced reactive oxygen species and oxidative damage in human erythrocytes. Cancer Lett. 158(2):155-63; 2000. doi: 10.1016/s0304-3835(00)00513-9.

EPA United States Environmental Protection Agency. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. MERCURY U.S. Inventory Report: Supply, Use, and Trade; 2017. Acessado 01/05/2023.

ERCAL N, GURER-ORHAN H, AYKIN-BURNS N. Toxic metals and oxidative stress

part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. Curr Top Med Chem.

2001 Dec;1(6):529-39. doi: 10.2174/1568026013394831. PMID: 11895129.

FACUNDO, H.T.F. 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. 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: 16/04/2023.

FAJERSZTAJN L., VERAS M., BARROZO L.V., SALDIVA P. Air pollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer. Nat Rev Cancer. 13(9):674-8; 2013. doi: 10.1038/nrc3572.

FARKHONDEH T, AFSHARI R, MEHRPOUR O, SAMARGHANDIAN S. Mercury and Atherosclerosis: Cell Biology, Pathophysiology, and Epidemiological Studies. Biol Trace Elem Res. Biol Trace Elem Res. 196(1):27-36; 2020. doi: 10.1007/s12011-019-01899-w.

FARKHONDEH T., AFSHARI R., MEHRPOUR O., SAMARGHANDIAN S. Mercury and Atherosclerosis: Cell Biology, Pathophysiology, and Epidemiological Studies. Biol Trace Elem Res. 196(1):27-36; 2020. doi: 10.1007/s12011-019-01899-w.

FATTMAN CL, SCHAEFER LM, OURY TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. Free Radic Biol Med. 35(3):236-56; 2003. doi: 10.1016/s0891-5849(03)00275-2.

FERNANDES M.P., LEITE A.C., ARAÚJO F.F., SAAD S.T., BARATTI M.O., CORREIA M.T., COELHO L.C., GADELHA F.R., VERCESI A.E. 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. 61(4):381-8; 2014. doi: 10.1111/jeu.12118.

FIDAN F, UNLÜ M, KÖKEN T, TETIK L, AKGÜN S, DEMIREL R, SERTESER M. Oxidant-antioxidant status and pulmonary function in welding workers. J Occup Health. 47(4):286-92; 2005. doi: 10.1539/joh.47.286. PMID: 16096352.

FIGUEIRA T.R., BARROS M.H., CAMARGO A.A., CASTILHO R.F., FERREIRA J.C., KOWALTOWSKI A.J., SLUSE F.E., SOUZA-PINTO N.C., VERCESI A.E. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. Antioxid Redox Signal. 18(16):2029-74; 2013. doi: 10.1089/ars.2012.4729.

FIGUEIRA T.R., CASTILHO R.F., SAITO A., OLIVEIRA H.C., VERCESI A.E. 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. 104(4):521-8; 2011. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.08.031.

FILIP-CIUBOTARU F, MANCIUC C, STOLERIU G, FOIA L. NADPH oxidase: structure and activation mechanisms (review). NOTE I. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.120(1):29-33; 2016.

FLOHÉ L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. Biochim Biophys Acta. 1830(5):3139-42; 2013. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.10.020.

FLORA S.J., MITTAL M., MEHTA A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. Indian J Med Res. 128(4):501-23; 2008.

FONSECA A.M., PORTO G., UCHIDA K., AROSA F.A. Red blood cells inhibit activation-induced cell death and oxidative stress in human peripheral blood T lymphocytes. Blood. 97(10):3152-60; 2001. doi: 10.1182/blood.v97.10.3152.

FOWLER J, TSUI MT, CHAVEZ J, KHAN S, AHMED H, SMITH L, JIA Z. Methyl

mercury triggers endothelial leukocyte adhesion and increases expression of cell

adhesion molecules and chemokines. Exp Biol Med (Maywood). 246(23):2522-

2532; 2021. doi: 10.1177/15353702211033812.

FULLER R., LANDRIGAN P.J., BALAKRISHNAN K., BATHAN G., BOSE-O'REILLY S., BRAUER M., CARAVANOS J., CHILES T., COHEN A., CORRA L., CROPPER M., FERRARO G., HANNA J., HANRAHAN D., HU H., HUNTER D., JANATA G., KUPKA R., LANPHEAR B., LICHTVELD M., MARTIN K., MUSTAPHA A., SANCHEZ-TRIANA E., SANDILYA K., SCHAEFLI L., SHAW J., SEDDON J., SUK W., TÉLLEZ-ROJO M.M., YAN C. Pollution and health: a progress update. Lancet Planet Health. 6(6):e535-e547; 2022. doi: 10.1016/S2542-5196(22)00090-0.

FURDA A., SANTOS J.H., MEYER J.N., VAN HOUTEN B. Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. Methods Mol Biol. 1105:419-37; 2014. doi: 10.1007/978-1-62703-739-6_31.

FURST A. Can nutrition affect chemical toxicity? Int J Toxicol. 2002 Sep-

Oct;21(5):419-24. doi: 10.1080/10915810290096649. PMID: 12396688.

GARDNER RM, NYLAND JF, EVANS SL, WANG SB, DOYLE KM, CRAINICEANU CM, SILBERGELD EK. Mercury induces an unopposed inflammatory response in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. Environ Health Perspect. 117:1932–1938; 2009. doi: 10.1289/ehp.0900855.

GASCHLER MM, STOCKWELL BR. Lipid peroxidation in cell death. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Jan 15;482(3):419-425. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.

GHOSH M., DAS J., SIL P.C. D(+) galactosamine induced oxidative and nitrosative stress-mediated renal damage in rats via NF- κ B and inducible nitric oxide synthase (iNOS) pathways is ameliorated by a polyphenol xanthone, mangiferin. Free Radic Res. 46(2):116-32; 2012. doi: 10.3109/10715762.2011.644240.

GILLE G., SIGLER K. Oxidative stress and living cells. Folia Microbiol (Praha). 40(2):131-52; 1995. doi: 10.1007/BF02815413.

GOGOI K., MANNA P., DEY T., KALITA J., UNNI B.G., OZAH D., BARUAH P.K. Circulatory heavy metals (cadmium, lead, mercury, and chromium) inversely correlate with plasma GST activity and GSH level in COPD patients and impair NOX4/Nrf2/GCLC/GST signaling pathway in cultured monocytes. Toxicol In Vitro. 54:269-279; 2019. doi: 10.1016/j.tiv.2018.10.010.

GOLDSTEIN JL, BROWN MS. Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. Eur Heart J. 1992 Jul;13 Suppl B:34-6. doi: 10.1093/eurheartj/13.suppl_b.34.

GOLDSTEIN JL, BROWN MS. Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. Eur Heart J. B:34-6; 1992. doi: 10.1093/eurheartj/13.suppl_b.34.

GOMES J.M.M., DONNICI C.L., CORRÊA JÚNIOR J.D., SILVAJ.B.B. Validation of Methods Employing Fast Alkaline Solubilization to Determine Cadmium in Fish Liver, Spleen, Gills and Muscle by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. Microchemical Journal. 124:629-636; 2016. doi: 10.1016/j.microc.2015.10.006.

GONÇALVES, D. P. Principais desastres ambientais no Brasil e no mundo. 2017. Disponível em: < https://www.unicamp.br/unicamp/ju/noticias/2017/12/01/principaisdesastres-ambientais-no-brasil-e-no-mundo >. Acesso em: 07 abril 2023

GONÇALVES, J.B.T. Avaliação da interação entre material particulado presente no complexo estuarino lagunar mundaú-manguaba e metais potencialmente tóxicos.1-40; 2022.

GROTTO D, BARCELOS GR, VALENTINI J, ANTUNES LM, ANGELI JP, GARCIA SC, BARBOSA F JR. Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. Arch Toxicol. 2009 Mar;83(3):249-54. doi: 10.1007/s00204-008-0353-3.

GROTTO D., VALENTINI J., FILLION M., PASSOS C.J., GARCIA S.C., MERGLER D., BARBOSA F J.R. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. Sci Total Environ. 408(4):806-11; 2010. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.10.053.

GUIDA N., LAUDATI G., MASCOLO L., CUOMO O., ANZILOTTI S., SIRABELLA R., SANTOPAOLO M., GALGANI M., MONTUORI P., DI RENZO G., CANZONIERO L.M., FORMISANO L. MC1568 Inhibits Thimerosal-Induced Apoptotic Cell Death by Preventing HDAC4 Up-Regulation in Neuronal Cells and in Rat Prefrontal Cortex. Toxicol Sci. 154(2):227-240; 2016. doi: 10.1093/toxsci/kfw157.

GUMP B.B., MACKENZIE J.A., DUMAS A.K., PALMER C.D., PARSONS P.J., SEGU Z.M., MECHREF Y.S., BENDINSKAS K.G. Fish consumption, low-level mercury, lipids, and inflammatory markers in children. Environ Res. 112:204-11; 2012. doi: 10.1016/j.envres.2011.10.002.

GUO TL, MILLER MA, SHAPIRO IM, SHENKER BJ. Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: evidence of mitochondrial dysfunction. Toxicol Appl Pharmacol. 1998 Dec;153(2):250-7. doi: 10.1006/taap.1998.8549. PMID: 9878595.

HALESTRAP A.P., WOODFIELD K.Y., CONNERN C.P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. J Biol Chem. 272(6):3346-54; 1997. doi: 10.1074/jbc.272.6.3346.

HALLIWELL B., CROSS C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. Environ Health Perspect. 10(10):5-12; 1994. doi: 10.1289/ehp.94102s105.

HAN SG, KIM Y, KASHON ML, PACK DL, CASTRANOVA V, VALLYATHAN V. Correlates of oxidative stress and free-radical activity in serum from asymptomatic shipyard welders. Am J Respir Crit Care Med. 172(12):1541-8; 2005. doi: 10.1164/rccm.200409-1222OC. PMID: 16166614.

HARARI F, BARREGARD L, ÖSTLING G, SALLSTEN G, HEDBLAD B, FORSGARD N, BORNÉ Y, FAGERBERG B, ENGSTRÖM G. Blood Lead Levels and Risk of Atherosclerosis in the Carotid Artery: Results from a Swedish Cohort. Environ Health Perspect. 127(12):127002; 2019. doi: 10.1289/EHP5057.

HAWORTH R.A., HUNTER D.R. The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca2+ trigger site. Arch Biochem Biophys. 195(2):460-7; 1979. doi: 10.1016/0003-9861(79)90372-2.

HEGELE RA, GINSBERG HN, CHAPMAN MJ, NORDESTGAARD BG, KUIVENHOVEN JA, AVERNA M, BORÉN J, BRUCKERT E, CATAPANO AL, DESCAMPS OS, HOVINGH GK, HUMPHRIES SE, KOVANEN PT, MASANA L, PAJUKANTA P, PARHOFER KG, RAAL FJ, RAY KK, SANTOS RD, STALENHOEF AF, STROES E, TASKINEN MR, TYBJÆRG-HANSEN A, WATTS GF, WIKLUND O; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. Lancet Diabetes Endocrinol. 2(8):655-66; 2014. doi: 10.1016/S2213-8587(13)70191-8.

HERBST R.S., GANDARA D.R., HIRSCH F.R., REDMAN M.W., LEBLANC M., MACK P.C., SCHWARTZ L.H., VOKES E., RAMALINGAM S.S., BRADLEY J.D., SPARKS D., ZHOU Y., MIWA C., MILLER V.A., YELENSKY R., LI Y., ALLEN J.D., SIGAL E.V., WHOLLEY D., SIGMAN C.C., BLUMENTHAL G.M., MALIK S., KELLOFF G.J., ABRAMS J.S., BLANKE C.D., PAPADIMITRAKOPOULOU V.A. Lung Master Protocol (Lung-MAP)-A Biomarker-Driven Protocol for Accelerating Development of Therapies for Squamous Cell Lung Cancer: SWOG S1400. Clin Cancer Res. 21(7):1514-24; 2015. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3473.

HESS, J.R., & SOLHEIM, B.G. Red blood cell metabolism, preservation, and oxygen delivery. Rossi's Principles of Transf Medic. 9:97-109; 2016. doi: 10.1002/9781119013020.ch09.

HIROTA Y, YAMAGUCHI S, SHIMOJOH N, SANO KI. Inhibitory effect of methylmercury on the activity of glutathione peroxidase. Toxicol Appl Pharmacol. 1980 Mar 30;53(1):174-6. doi: 10.1016/0041-008x(80)90394-4. PMID: 7385232.

HISSIN P.J., HILF R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Anal Biochem. 74(1):214-26; 1976. doi: 10.1016/0003-2697(76)90326-2.

HOGEBACK J., SCHWARZER M., WEHE C.A., SPERLING M., KARST U. Investigating the adduct formation of organic mercury species with carbonic anhydrase and hemoglobin from human red blood cell hemolysate by means of LC/ESI-TOF-MS and LC/ICP-MS. Metallomics. 8(1):101-7; 2016. doi: 10.1039/c5mt00186b.

HONG D, CHO SH, PARK SJ, KIM SY, PARK SB. Hair mercury level in smokers and its influence on blood pressure and lipid metabolism. Environ Toxicol Pharmacol.36(1):103-7; 2013. doi: 10.1016/j.etap.2013.03.007. Epub 2013 Mar 22. PMID: 23603462.

HOUESSIONON, M.G.K.; OUENDO, E.-M.D.; BOULAND, C.; TAKYI, S.A.; KEDOTE, N.M.; FAYOMI, B.; FOBIL, J.N.; BASU, N. Environmental Heavy Metal Contamination from Electronic Waste (E-Waste) Recycling Activities Worldwide: A Systematic Review from 2005 to 2017. Int J Environ Res Public Health. 18(7):3517; 2021. doi: 10.3390/ijerph18073517.

HUGHES D.J., DUARTE-SALLES T., HYBSIER S., TRICHOPOULOU A., STEPIEN M., ALEKSANDROVA K., OVERVAD K., TJØNNELAND A., OLSEN A., AFFRET A., FAGHERAZZI G., BOUTRON-RUAULT M.C., KATZKE V., KAAKS R., BOEING H., BAMIA C., LAGIOU P., PEPPA E., PALLI D., KROGH V., PANICO S., TUMINO R., SACERDOTE C., BUENO-DE-MESQUITA H.B., PEETERS P.H., ENGESET D., WEIDERPASS E., LASHERAS C., AGUDO A., SÁNCHEZ M.J., NAVARRO C., ARDANAZ E., DORRONSORO M., HEMMINGSSON O., WAREHAM N.J., KHAW K.T., BRADBURY K.E., CROSS A.J., GUNTER M., RIBOLI E., ROMIEU I., SCHOMBURG L., JENAB M. Prediagnostic selenium status and hepatobiliary cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. Am J Clin Nutr. 104(2):406-14; 2016. doi: 10.3945/ajcn.116.131672.

HUGHES M.F., BECK B.D., CHEN Y., LEWIS A.S., THOMAS D.J. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. Toxicol Sci. 123(2):305-32; 2011. doi: 10.1093/toxsci/kfr184.

HUSSAIN T., TAN B., YIN Y., BLACHIER F., TOSSOU M.C., RAHU N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? Oxid Med Cell Longev. 2016:7432797; 2016. doi: 10.1155/2016/7432797.

IARC Working Group Reports. Mycotoxin Control in Low and Middle Income Countries Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2015.

IARC. monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 82, Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Phytochemistry. 65(1):139; 2004.

IARMARCOVAI G, SARI-MINODIER I, CHASPOUL F, BOTTA C, DE MÉO M, ORSIÈRE T, BERGÉ-LEFRANC JL, GALLICE P, BOTTA A. Risk assessment of welders using analysis of eight metals by ICP-MS in blood and urine and DNA damage evaluation by the comet and micronucleus assays; influence of XRCC1 and XRCC3 polymorphisms. Mutagenesis. 20(6):425-32; 2005. doi: 10.1093/mutage/gei058.

IJAZ M, ARSHAD A, AWAN MA, TARIQ MR, ALI SW, ALI S, SHAFIQ M, AHMED S, SHEAS MN, IFTIKHAR M, AHMED S, NASIR MA, KAUSAR G, JAVED AUI, SAFDAR W. Exploring the potential of curry leaves on mercury-induced hepatorenal toxicity in an animal model. Food Sci Nutr. 10(2):499-506; 2021. doi: 10.1002/fsn3.2683.

INGERSOLL M.A., PLATT A.M., POTTEAUX S., RANDOLPH G.J. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation Molly A. Trends Immunol. 32(10): 470–477; 2011. doi:10.1016/j.it.2011.05.001.

JACKSON S.H., DEVADAS S., KWON J., PINTO L.A., WILLIAMS M.S. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. Nat Immunol. 5(8):818-27; 2004. doi: 10.1038/ni1096.

JADHAV S.H., SARKAR S.N., AGGARWAL M., TRIPATHI H.C. Induction of oxidative stress in erythrocytes of male rats subchronically exposed to a mixture of eight metals found as groundwater contaminants in different parts of India. Arch Environ Contam Toxicol. 52(1):145-51; 2007. doi: 10.1007/s00244-006-0053-z.

JANZEN R, SCHWARZER M, SPERLING M, VOGEL M, SCHWERDTLE T, KARST U. Adduct formation of Thimerosal with human and rat hemoglobin: a study using liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry (LC/ESI-TOF-MS). Metallomics. 2011 Aug;3(8):847-52. doi: 10.1039/c1mt00043h.

KAMAL A., MALIK R.N., FATIMA N., RASHID A. Chemical exposure in occupational settings and related health risks: a neglected area of research in Pakistan. Environ Toxicol Pharmacol. 34(1):46-58; 2012. doi: 10.1016/j.etap.2012.02.009.

KAPLAN RS, PEDERSEN PL. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. Biochem J. 212(2):279-88; 1983. doi: 10.1042/bj2120279.

KARLMARK K.R., TACKE F., DUNAY, I. R. Monocytes in health and disease -Minireview. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2(2):97-102; 2012. doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.2.1.

KEMPURAJ D., ASADI S., ZHANG B., MANOLA A., HOGAN J., PETERSON E., THEOHARIDES T.C. J Neuroinflammation. 7:20; 2010. doi: 10.1186/1742-2094-7-20.

KERN, W. PDQ Hematology. Editora BC Decker. 1^a edição, 1:51-87; 2002. ISBN 1-55009-176-x.

KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. Trends Biochem Sci. 32(1):44-50; 2007. doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.003.

KJERFVE B., MAGILL K.E. Geographic and hydrodynamic characteristics of shallow coastal lagoons. Marine Geology. 88:(3–4)187–199; 1989. doi: 10.1016/0025-3227(89)90097-2

KOWALTOWSKI A.J., CASTILHO R.F., VERCESI A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. FEBS Lett. 495(1-2):12-5; 2001. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02316-x.

KOWALTOWSKI A.J., TURIN J., INDIG G.L., VERCESI A.E. Mitochondrial effects of triarylmethane dyes. J Bioenerg Biomembr. 31(6):581-90; 1999. doi: 10.1023/a:1005421112345.

KOWALTOWSKI A.J., VERCESI A.E., FISKUM G. Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. Cell Death Differ. 7(10):903-10; 2000. doi: 10.1038/sj.cdd.4400722.

KOWALTOWSKI AJ, CASTILHO RF, VERCESI AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. FEBS Lett. 495(1-2):12-5; 2001. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02316-x

KULICZKOWSKI K. Badania stezenia ołowiu w krwi i aktwywności dehydratazy kwasu delta-aminolewulinowego (ALAD) w erytrocytach w zalezności od płci, wieku, palenia tytoniu i picia alkoholu w grupie ludności narazonej na działanie pyłow przemysłowych [Lead concentration in the blood and aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity in the erythrocytes depending on sex, age, tobacco smoking and alcohol drinking in the group of persons exposed to industrial dust]. Med Pr. 32(2):99-107; 1981.

KUMAR A, KHUSHBOO, PANDEY R, SHARMA B. Modulation of Superoxide Dismutase Activity by Mercury, Lead, and Arsenic. Biol Trace Elem Res. 196(2):654-661; 2020. doi: 10.1007/s12011-019-01957-3.

LACERDA L.D. Chapter 8 Biogeochemistry of heavy Metals in Coastal Lagoons. In Elsevier Oceanography Series. 60:221–241; 1994. doi: 10.1016/S0422-9894(08)70013-8.

LANDRIGAN P.J., FULLER R. Global health and environmental pollution. Int J Public Health. 60(7):761-2; 2015. doi: 10.1007/s00038-015-0706-7.

LATZ E., XIAO T.S., STUTZ A. Activation and regulation of the inflammasomes. Nat Rev Immunol. 13(6):397-411; 2013. doi: 10.1038/nri3452.

LEE M.Y., SHIN J.H., HAN H.S., CHUNG J.H. In vivo effects of lead on erythrocytes following chronic exposure through drinking water. Arch Pharm Res. 29(12):1158-63; 2006. doi: 10.1007/BF02969308.

LEGGETT R.W. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. Environ Health Perspect. 101(7):598-616; 1993. doi: 10.1289/ehp.93101598.

LEITE A.C., OLIVEIRA H.C., UTINO F.L., GARCIA R., ALBERICI L.C., FERNANDES M.P., CASTILHO R.F., VERCESI A.E. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. Biochim Biophys Acta. 1797(6-7):1210-6; 2010. doi: 10.1016/j.bbabio.2010.01.034.

LEMIRE M., PHILIBERT A., FILLION M., PASSOS C.J.S., GUIMARÃES J.-R., BARBOSA F., MERGLER D. No evidence of selenosis from a selenium-rich diet in the Brazilian Amazon. Environ Int. 40:128-136; 2012. doi: 10.1016/j.envint.2011.07.005.

LI C, XU W, CHU S, ZHENG Z, XIAO Y, LI L, BI H, WEI L. The chemical speciation, spatial distribution and toxicity of mercury from Tibetan medicine Zuotai, β -HgS and HgCl2 in mouse kidney. J Trace Elem Med Biol. 2018 Jan;45:104-113. doi: 10.1016/j.jtemb.2017.08.010.

LI S, BAIYUN R, LV Z, LI J, HAN D, ZHAO W, YU L, DENG N, LIU Z, ZHANG Z. Exploring the kidney hazard of exposure to mercuric chloride in mice:Disorder of mitochondrial dynamics induces oxidative stress and results in apoptosis. Chemosphere. 234:822-829; 2019. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.096.

LI S, BAIYUN R, LV Z, LI J, HAN D, ZHAO W, YU L, DENG N, LIU Z, ZHANG Z. Exploring the kidney hazard of exposure to mercuric chloride in mice: Disorder of mitochondrial dynamics induces oxidative stress and results in apoptosis. Chemosphere. 2019 Nov;234:822-829. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.096

LIEW PX, KUBES P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. Physiol Rev. 99(2):1223-1248; 2019. doi: 10.1152/physrev.00012.2018.

LIM S., CHUNG H.U., PAEK D. Low dose mercury and heart rate variability among community residents nearby to an industrial complex in Korea. Neurotoxicology. 31(1):10-6; 2010. doi: 10.1016/j.neuro.2009.10.001.

LIOI MB, SCARFÌ MR, SANTORO A, BARBIERI R, ZENI O, DI BERARDINO D,

URSINI MV. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in

bovine lymphocyte cultures in vitro. Mutat Res. 403(1-2):13-20. 1998. doi:

10.1016/s0027-5107(98)00010-4. PMID: 9726001.

LU T., ZHANG Q., ZHANG Z., HU B., CHEN J., CHEN J., QIAN H. Pollutant toxicology with respect to microalgae and cyanobacteria. J Environ Sci (China). 99:175-186; 2021. doi: 10.1016/j.jes.2020.06.033.

LUCAS A.M.B., DE LACERDA ALEXANDRE J.V., ARAÚJO M.T.S., DAVID C.E.B., PONTE VIANA Y.I., COELHO B.N., CALDAS F.R.L., VARELA A.L.N., KOWALTOWSKI A.J., FACUNDO H.T. Diazoxide Modulates Cardiac Hypertrophy by Targeting H_2O_2 Generation and Mitochondrial Superoxide Dismutase Activity. Curr Mol Pharmacol. 13(1):76-83; 2020. doi: 10.2174/1874467212666190723144006.

MA L., LI J., ZHAN Z., CHEN L., LI D., BAI Q., GAO C., LI J., ZENG X., HE Z., WANG S., XIAO Y., CHEN W., ZHANG A. Specific histone modification responds to arsenicinduced oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol. 302:52-61; 2016. doi: 10.1016/j.taap.2016.03.015.

MAERTENS DE NOORDHOUT C., DEVLEESSCHAUWER B., GIELENS L., PLASMANS M.H.D., HAAGSMA J.A., SPEYBROECK N. Mapping EQ-5D utilities to GBD 2010 and GBD 2013 disability weights: results of two pilot studies in Belgium. Arch Public Health. 75:6; 2017. doi: 10.1186/s13690-017-0174-z.

MALAGUTI C., LA GUARDIA P.G., LEITE A.C., OLIVEIRA D.N., DE LIMA ZOLLNER R.L., CATHARINO R.R., VERCESI A.E., OLIVEIRA H.C. Oxidative stress and susceptibility to mitochondrial permeability transition precedes the onset of diabetes in autoimmune non-obese diabetic mice. Free Radic Res. 48(12):1494-504; 2014. doi: 10.3109/10715762.2014.966706.

MALONE, R. Bioinorganic Chemistry: A Short Course. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2002. p. 265-292.

MAZZARON BARCELOS G.R., DE MARCO K.C., GROTTO D., VALENTINI J., GARCIA S.C., LEITE BRAGA G.Ú., BARBOSA F. J.R. Evaluation of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and methylmercury metabolism in an exposed Amazon population. J Toxicol Environ Health A. 75(16-17):960-70; 2012. doi: 10.1080/15287394.2012.695232.

MCBRIEN C.N., MENZIES-GOW A. The biology of eosinophils and their role in asthma. Front Med (Lausanne). 4:93; 2017. doi: 10.3389/fmed.2017.00093

MCFARLAND DC, ZHANG C, THOMAS HC, T L R. Confounding effects of platelets on flow cytometric analysis and cell-sorting experiments using blood-derived cells. Cytometry A. 69(2):86-94; 2006. doi: 10.1002/cyto.a.20207.

MELDER R.J., YUAN J., MUNN L.L., JAIN R.K. Erythrocytes enhance lymphocyte rolling and arrest in vivo. Microvasc Res. 59(2):316-22; 2000. doi: 10.1006/mvre.1999.2223.

MESQUITA JÚNIOR, D., ARAÚJO, J.A.P., CATELAN, T.T.T., SOUZA, A.W.S. DE, CRUVINEL, W. DE M., ANDRADE, L.E.C., & SILVA, N.P.DA. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. Rev Bras Reumatol. 50(5):552-80; 2010.

METZLER DE. Biochemistry: the chemical reactions of living cells. Editora Academic press, 2ª edição. 3:539-564; 2001.

MEYER, A. J.; HELL, R. lutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. Photosynth Res. 86(3):435-57; 2005. doi: 10.1007/s11120-005-8425-1.

MIANDARE H.K., NIKNEJAD M., SHABANI A., SAFARI R. Exposure of Persian sturgeon (Acipenser persicus) to cadmium results in biochemical, histological and transcriptional alterations. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 181:1–8. 2016. doi: 10.1016/j.cbpc.2015.12.004.

MIESSLER, G.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. Química Inorgânica. Editora_Pearson Education, 5^a edição. 2014.

MIRANDA, M.R.; COELHO-SOUZA, S.A.; GUIMARÃES, J.R.D.; CORREIA, R.R.S.;

OLIVEIRA, D. Mercúrio em sistemas aquáticos: Fatores ambientais que afetam a

metilação. Oecologia Brasilienses, v.11, p.240-251, 2007.

MISRA H.P., FRIDOVICH I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem. 247(10):3170-5; 1972.

MITCHELL P. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. Science. 206(4423):1148-59; 1979. doi: 10.1126/science.388618.

MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7(9):405-10; 2002. doi: 10.1016/s1360-1385(02)02312-9.

MONTEIRO, A.S.C. Especiação de chumbo e cádmio: desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a avaliação da influência da matéria orgânica natural e substâncias húmicas. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

MOREIRA E.L., DE OLIVEIRA J., DUTRA M.F., SANTOS D.B., GONÇALVES C.A., GOLDFEDER E.M., DE BEM A.F., PREDIGER R.D., ASCHNER M., FARINA M. Does methylmercury-induced hypercholesterolemia play a causal role in its neurotoxicity and cardiovascular disease? Toxicol Sci. 130(2):373-82; 2012. doi: 10.1093/toxsci/kfs252.

NAKAMURA T., GOTO M., KOYAMA J. The NADPH oxidase-dependent hemolysis of sheep erythrocytes with the membrane fraction of guinea pig peritoneal macrophages. J Biochem. 101(6):1347-53; 1987. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122002.

NAVARRO C.D.C., FIGUEIRA T.R., FRANCISCO A., DAL'BÓ G.A., RONCHI J.A., ROVANI J.C., ESCANHOELA C.A.F., OLIVEIRA H.C.F., CASTILHO R.F., VERCESI A.E. Redox imbalance due to the loss of mitochondrial NAD(P)-transhydrogenase markedly aggravates high fat diet-induced fatty liver disease in mice. Free Radic Biol Med. 113:190-202; 2017. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.026.

NAZIMA B., MANOHARAN V., MILTONPRABU S. Oxidative stress induced by cadmium in the plasma, erythrocytes and lymphocytes of rats: Attenuation by grape seed proanthocyanidins. Hum Exp Toxicol. 35(4):428-47; 2016. doi: 10.1177/0960327115591376.

NELSON, D. L. C., COX M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 8^a. Freeman, W. H. & Company, 2022. 1328 ISBN 8428216037.

NESCI S, TROMBETTI F, PIRINI M, VENTRELLA V, PAGLIARANI A. Mercury and protein thiols: Stimulation of mitochondrial F₁F₀-ATPase and inhibition of respiration. Chem Biol Interact. 2016 Dec 25;260:42-49. doi: 10.1016/j.cbi.2016.10.018.

NEWCOMER BW. Toxicologic Insults to the Bovine Liver. Vet Clin North Am Food

Anim Pract. 38(3):421-432; 2022. doi: 10.1016/j.cvfa.2022.07.003.

NICHOLLS D.G., FERGUSON S.J. Bioenergetics. Editora academic press, 4^a edição. 4-5:53-136; 2013. ISBN: 978-0-12-388425-1.

NIKOLIĆ-KOKIĆ A.; BLAGOJEVIĆ D.; SPASIĆ M. Complexity of free radical Metabolism in human Erythrocytes. J Med Biochem. 29:(3)189-195; 2010. doi: 10.2478/v10011-010-0018-7.

NUNES Á.M., DA SILVA K.R.M., CALADO C.M.S., SARAIVA K.L.A., Q FIGUEIREDO R.C.B., LEITE A.C.R., MENEGHETTI M.R. Evaluation of gold nanorods toxicity on isolated mitochondria. Toxicology. 413:24-32; 2019. doi: 10.1016/j.tox.2018.12.002.

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. 413:24-32; 2019. doi: 10.1016/j.tox.2018.12.002.

NUNNARI J., SUOMALAINEN A. Mitochondria: in sickness and in health. Cell. 148(6):1145-59; 2012. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035.

NUYTS G.D., VAN VLEM E., THYS J., DE LEERSNIJDER D., D'HAESE P.C., ELSEVIERS M.M., DE BROE M.E. New occupational risk factors for chronic renal failure. Lancet. 346(8966):7-11; 1995. doi: 10.1016/s0140-6736(95)92648-8.

NYLAND J.F., FILLION M., BARBOSA F J.R., SHIRLEY D.L., CHINE C., LEMIRE M., MERGLER D., SILBERGELD E.K. Biomarkers of methylmercury exposure immunotoxicity among fish consumers in Amazonian Brazil. Environ Health Perspect. 119(12):1733-8; 2011. doi: 10.1289/ehp.1103741.

OBATA T. Protective effect of fluvastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, on copper-induced hydroxyl radical generation in the rat heart. Toxicology. 223(3):175-80; 2006. doi: 10.1016/j.tox.2006.03.006.

OLIVEIRA H.C., COSSO R.G., ALBERICI L.C., MACIEL E.N., SALERNO A.G., DORIGHELLO G.G., VELHO J.A., DE FARIA E.C., VERCESI A.E. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. FASEB J. 19(2):278-80; 2005. doi: 10.1096/fj.04-2095fje.

OLIVEIRA H.C.F., VERCESI A.E. Mitochondrial bioenergetics and redox dysfunctions in hypercholesterolemia and atherosclerosis. Mol Aspects Med. 71:100840; 2020. doi: 10.1016/j.mam.2019.100840.

OLIVEIRA M.R.A.A. Hematologia Básica: fisiopatologia e estudo laboratorial._Livraria Luana editora, 3^a edição; 2003.

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. 36:740-746; ., 2021. doi: 10.1039/D1JA00041A

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS ONU. Aumento de renda é mais prejudicial ao meio ambiente do que o crescimento populacional, 02 de março de 2022. https://brasil.un.org/pt-br/173333-aumento-de-renda-%C3%A9-mais-prejudicial-ao-meio-ambiente-do-que-o-crescimento

populacional#:~:text=Segundo%20o%20estudo%2C%20embora%20o,de%20gases %20de%20efeito%20estufa. Acessado dia 03/04/2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE OMS. Global Health Observatory (GHO) data: Causes of child mortality [website]. Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2016 (http://www. who.int/gho/child_health/mortality/causes/en/, acessado em 03/04/2016, disponível em inglês).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE OMS. Mercúrio Elementar e Compostos Inorgânicos de Mercúrio: Aspectos da Saúde Humana. Documento Conciso de Avaliação Química Internacional 50. Organização Mundial da Saúde; Genebra, Suíça: 2003. Acessado: 03/04/2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, OMS. Novos dados da OMS revelam que bilhões de pessoas ainda respiram ar insalubre. https://www.paho.org/pt/noticias/4-4-2022-novos-dados-da-oms-revelam-que-bilhoes-pessoas-ainda-respiram-ar-insalubre#:~:text=A%200MS%20estima%20que%20mais,resultado%20de%20caus as%20ambientais%20evit%C3%A1veis.&text=Acesse%20aqui%20o%20banco%20d e,da%200MS%20atualizado%20em%202022.; 2022. Acessado: 10/04/2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS) Não polua o meu futuro! O impacto do ambiente na saúde das crianças . Poluição do Ar e Saúde Infantil: Prescrevendo Ar Puro. Resumo . https://iris.paho.org/handle/10665.2/49122. Acessado: 31/03/2023.

ORRU H., EBI K.L., FORSBERG B. The Interplay of Climate Change and Air Pollution on Health. Curr Environ Health Rep. 4(4):504-513; 2017. doi: 10.1007/s40572-017-0168-6.

PAGLIA D.E., VALENTINE W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 70(1):158-69; 1967.

PARK E., KIM J., KIM B., PARK E.Y. Association between environmental exposure to cadmium and risk of suspected non-alcoholic fatty liver disease. Chemosphere. 266:128947; 2021. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128947.

PENTA KL, FAIRWEATHER D, SHIRLEY DL, ROSE NR, SILBERGELD EK, NYLAND JF. Low-dose mercury heightens early innate response to coxsackievirus infection in female mice. Inflamm Res. 64(1):31-40; 2015. doi: 10.1007/s00011-014-0781-x.

PESCA. Relações das Colônias dos Pescadores do Estado de Alagoas. 2019. Disponível em: < http://www.pesca.al.gov.br/pescadores-colonias-eassociacoes/relacoes-das-colonias-dos-pescadores-do-estado-de-alagoas >. Acesso em: 16/04/2023.

POLLARD KM, HULTMAN P. Effects of mercury on the immune system. Met lons Biol

Syst. 1997;34:421-40. PMID: 9046578.

PROFUMO E., BUTTARI B., PETRONE L., STRAFACE E., GAMBARDELLA L., PIETRAFORTE D., GENUINI I., CAPOANO R., SALVATI B., MALORNI W., RIGANÒ R. Redox imbalance of red blood cells impacts T lymphocyte homeostasis: implication in carotid atherosclerosis. Thromb Haemost. 106(6):1117-26; 2011. doi: 10.1160/TH11-02-0110.

QUE X., HUNG M.Y., YEANG C., GONEN A., PROHASKA T.A., SUN X., DIEHL C., MÄÄTTÄ A., GADDIS D.E., BOWDEN K., PATTISON J., MACDONALD J.G., YLÄ-HERTTUALA S., MELLON P.L., HEDRICK C.C., LEY K., MILLER Y.I., GLASS C.K., PETERSON K.L., BINDER C.J., TSIMIKAS S., WITZTUM J.L. Oxidized phospholipids are proinflammatory and proatherogenic in hypercholesterolaemic mice. Nature. 558(7709):301-306; 2018. doi: 10.1038/s41586-018-0198-8. PMID: 29875409. RADI R., BECKMAN J.S., BUSH K.M., FREEMAN B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J Biol Chem. 266(7):4244-50; 1991.

RADI R., BECKMAN J.S., BUSH K.M., FREEMAN B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch Biochem Biophys. 288(2):481-7; 1991. doi: 10.1016/0003-9861(91)90224-7. PMID: 1654835.

RAMADAN SS, ALMEER RS, ALKAHTANI S, ALARIFI S, ALBASHER G, ABDEL MONEIM AE. Ziziphus spina-christi leaf extract attenuates mercuric chloride-induced liver injury in male rats via inhibition of oxidative damage. Environ Sci Pollut Res Int. 2021 Apr;28(14):17482-17494. doi: 10.1007/s11356-020-12160-6.

RAPOPORT, T. A.; HEINRICH, Reinhart; RAPOPORT, S. M. The regulatory principles of glycolysis in erythrocytes in vivo and in vitro. A minimal comprehensive model describing steady states, quasi-steady states and time-dependent processes. Biochem J. 154(2):449-69; 1976. doi: 10.1042/bj1540449.

RASOLA A, SCIACOVELLI M, PANTIC B, BERNARDI P. Signal transduction to the permeability transition pore. FEBS Lett. 2010 May 17;584(10):1989-96. doi: 10.1016/j.febslet.2010.02.022.

REMIGANTE A., MORABITO R., MARINO A. Band 3 protein function and oxidative stress in erythrocytes. J Cell Physiol. 236(9):6225-6234; 2021. doi: 10.1002/jcp.30322.

RENTZ T., WANSCHEL A.C.B.A., DE CARVALHO MOI L., LORZA-GIL E., DE SOUZA J.C., DOS SANTOS R.R., OLIVEIRA H.C.F. The Anti-atherogenic Role of Exercise Is Associated With the Attenuation of Bone Marrow-Derived Macrophage Activation and Migration in Hypercholesterolemic Mice. Front Physiol. 11:599379; 2020. doi: 10.3389/fphys.2020.599379. PMID: 33329050.

RICE KM, WALKER EM JR, WU M, GILLETTE C, BLOUGH ER. Environmental mercury and its toxic effects. J Prev Med Public Health. 47(2):74-83; 2014. doi: 10.3961/jpmph.2014.47.2.74.

RIFKIND, J. M.; SALGADO, M. T.; CAO, Z. Regulation of oxygen delivery by the reaction of nitrite with RBCs under hypoxic conditions. Adv Exp Med Biol. 737:183-9; 2012. doi: 10.1007/978-1-4614-1566-4_27.

RITTER L., SOLOMON K., SIBLEY P., HALL K., KEEN P., MATTU G., LINTON B. Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry. J Toxicol Environ Health A. 65(1):1-142; 2002. doi: 10.1080/152873902753338572.

ROBINSON J., COOPER J.M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. Anal Biochem. 33(2):390-9; 1970. doi: 10.1016/0003-2697(70)90310-6.

ROBINSON J., COOPER J.M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. Anal Biochem. 33(2):390-9; 1970. doi: 10.1016/0003-2697(70)90310-6. PMID: 4314758.

ROCHA J.B., ASCHNER M., DÓREA J.G., CECCATELLI S., FARINA M., SILVEIRA L.C. Mercury toxicity. J Biomed Biotechnol. 2012:831890; 2012. doi: 10.1155/2012/831890.

ROSENBERG HF, DYER KD, FOSTER PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. Nat Rev Immunol. 13(1):9-22; 2013. doi: 10.1038/nri3341.

RUBBO H., RADI R., TRUJILLO M., TELLERI R., KALYANARAMAN B., BARNES S., KIRK M., FREEMAN B.A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitritedependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. J Biol Chem. 269(42):26066-75; 1994.

SALERNO A.G., RENTZ T., DORIGHELLO G.G., MARQUES A.C., LORZA-GIL E., WANSCHEL A.C.B.A., DE MORAES A., VERCESI A.E., OLIVEIRA H.C.F. Lack of mitochondrial NADP(H)-transhydrogenase expression in macrophages exacerbates atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. Biochem J. 476(24):3769-3789; 2019. doi: 10.1042/BCJ20190543.

SANTANA LNDS, BITTENCOURT LO, NASCIMENTO PC, FERNANDES RM, TEIXEIRA FB, FERNANDES LMP, FREITAS SILVA MC, NOGUEIRA LS, AMADO LL, CRESPO-LOPEZ ME, MAIA CDSF, LIMA RR. Low doses of methylmercury exposure during adulthood in rats display oxidative stress, neurodegeneration in the motor cortex and lead to impairment of motor skills. J Trace Elem Med Biol. 2019 Jan;51:19-27. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.09.004.

SANTOS E.C., SAMPAIO C.L.S. A Pesca Artesanal na Comunidade de Fernão Velho, Maceió (Alagoas, Brasil): de Tradicional a Marginal. Revista da Gestão Costeira Integrada 13(4):513-524; 2013. DOI:10.5894/rgci428.

SARAH R., TABASSUM B., IDREES N., HASHEM A., ABD ALLAH E.F. Bioaccumulation of heavy metals in Channa punctatus (Bloch) in river Ramganga (U.P.), India. Saudi J Biol Sci. 26(5):979-984; 2019. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.02.009.

SARKAR M.K., SIL P.C. Prevention of tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative impairment and cell death by a novel antioxidant protein molecule isolated from the herb, Phyllanthus niruri. Toxicol In Vitro. 24(6):1711-9; 2010. doi: 10.1016/j.tiv.2010.05.014. PMID: 20510348.

SATOH H. Occupational and environmental toxicology of mercury and its compounds. Ind Health. 38(2):153-64; 2000. doi: 10.2486/indhealth.38.153.

SCHAUR R.J. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. Mol Aspects Med. 24(4-5):149-59; 2003. doi: 10.1016/s0098-2997(03)00009-8.

SCHECHTER A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Blood. 112(10):3927-38; 2008. doi: 10.1182/blood-2008-04-078188.

SCHEUER H, GWINNER W, HOHBACH J, GRÖNE EF, BRANDES RP, MALLE E, OLBRICHT CJ, WALLI AK, GRÖNE HJ. Oxidant stress in hyperlipidemia-induced renal damage. Am J Physiol Renal Physiol. 278(1):F63-74; 2000. doi: 10.1152/ajprenal.2000.278.1.F63. PMID: 10644656.

SCHIRALDI M., MONESTIER M. How can a chemical element elicit complex immunopathology? Lessons from mercury-induced autoimmunity. Trends Immunol. 30(10):502-9; 2009. doi: 10.1016/j.it.2009.07.005. PMID: 19709928.

SCHULZ R., BUNDSCHUH M., GERGS R., BRÜHL C.A., DIEHL D., ENTLING M.H., FAHSE L., FRÖR O., JUNGKUNST H.F., LORKE A., SCHÄFER R.B., SCHAUMANN G.E., SCHWENK K. Review on environmental alterations propagating from aquatic to terrestrial ecosystems. Sci Total Environ. 538:246-61; 2015. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.038. PMID: 26311581.

SCHWABE R.F. & BRENNER D.A. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 290(4):G583-9; 2006. doi: 10.1152/ajpgi.00422.2005. PMID: 16537970.

SELIM M.I. Significance of aflatoxins in rural and global health: concern for agricultural workers. N C Med J. 71(5):438-41; 2010.

SHANMUGHAPRIYA S., RAJAN S., HOFFMAN N.E., HIGGINS A.M., TOMAR D., NEMANI N., HINES K.J., SMITH D.J., EGUCHI A., VALLEM S., SHAIKH F., CHEUNG M., LEONARD N.J., STOLAKIS R.S., WOLFERS M.P., IBETTI J., CHUPRUN J.K., JOG N.R., HOUSER S.R., KOCH W.J., ELROD J.W., MADESH M. SPG7 Is an Essential and Conserved Component of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. Mol Cell. 60(1):47-62; 2015. doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.009.

SHENKER B.J., BERTHOLD P., ROONEY C., VITALE L., DEBOLT K., SHAPIRO I.M. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. III. Alterations in B-cell function and viability. Immunopharmacol Immunotoxicol. 15(1):87-112; 1993. doi: 10.3109/08923979309066936. PMID:8450183.

SHENKER B.J., GUO T.L., SHAPIRO I.M. Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence of mitochondrial dysfunction. Environ Res. 77(2):149-59; 1998. doi: 10.1006/enrs.1997.3816.

SHENKER BJ, GUO TL, O I, SHAPIRO IM. Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. Toxicol Appl Pharmacol. 1999 May 15;157(1):23-35. doi: 10.1006/taap.1999.8652. PMID: 10329504.

SHENKER BJ, MAYRO JS, ROONEY C, VITALE L, SHAPIRO IM. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. IV. Alterations in cellular glutathione content. Immunopharmacol Immunotoxicol. 1993 Mar-Jun;15(2-3):273-90. doi: 10.3109/08923979309025999. PMID: 8349953.

SHENKER BJ, PANKOSKI L, ZEKAVAT A, SHAPIRO IM. Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. Antioxid Redox Signal. 2002 Jun;4(3):379-89. doi: 10.1089/15230860260196182. PMID: 12215206.

SHIGA T., MAEDA N., KON K. Erythrocyte rheology. Crit Rev Oncol Hematol. 10(1):9-48; 1990. doi: 10.1016/1040-8428(90)90020-s.

SHRIVER D.F. & ATKINS. Química inorgânica. Editora Bookman. 4ª edição, 847. ISBN 9788577801992; 2008.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. Redox Biol. 4:180-3; 2015. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.

SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. In Oxidative stress. Editora Academic Press, 1-8. ISBN 978-1-4615-4649-8; 1985.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. Annu Rev Biochem. 86:715-748; 2017. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.

SILVA D.F., SOUSA F.A.S. Proposta de manejo Sustentável para o Complexo Estuarino-lagunar Mundaú Manguaba/al. Revista Brasileira de Geografia Física, Recife, PE. 1:(2)78-94; 2009.

SILVA T.C.L., JUNIOR J.F.S., FERREIRA B. Índice de geodiversidade do complexo estuarino lagunar mundaú-manguaba – CELMM, Alagoas, Nordeste do Brasil. ACTA

Geográfica, Boa Vista. 16:(41)139-165; 2022.

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. 192:106412; 2022. doi: 10.1016/j.sab.2022.106412

SILVA-FILHO R., SANTOS N., SANTOS M.C., NUNES Á., PINTO R., MARINHO C., LIMA T., FERNANDES M.P., SANTOS J.C.C., LEITE A.C.R. 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. 219:112337; 2021. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112337.

SLY P.D., CARPENTER D.O., VAN DEN BERG M., STEIN R.T., LANDRIGAN P.J., BRUNE-DRISSE M.N., SUK W. Health Consequences of Environmental Exposures: Causal Thinking in Global Environmental Epidemiology. Ann Glob Health. 82(1):3-9; 2016. doi: 10.1016/j.aogh.2016.01.004.

SOUZA R.C., REIS R.S. Uma Análise na Dragagem do Complexo Estuarino-Lagunar Mundaú/Manguaba em Alagoas através de um Modelo Numérico Hidrodinâmico Bidimensional – Resultados Preliminares. RBRH – Revista Brasileira de Recursos Hídricos. 9:(4)21-31; 2004.

SOUZA, S.S., CAMPIGLIA, D.A., BARBOSA, F. A simple method for methylmercury, inorganic mercury and ethylmercury determination in plasma samples by high-

performance liquid chromatography-cold-vapor-inductively coupled plasma mass spectrometry, Analytica Chimica Acta. 761:11-17; 2013. doi: 10.1016/j.aca.2012.11.038.

SPILLER H.A. Rethinking mercury: the role of selenium in the pathophysiology of mercury toxicity. Clin Toxicol (Phila). 56(5):313-326; 2018. doi: 10.1080/15563650.2017.1400555.

STEINBERG D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. J Lipid Res. 50:S376-81; 2009. doi: 10.1194/jlr.R800087-JLR200.

STIENE-MARTIN E. A., LOTSPEICH-STEININGER, Cheryl A., KOEPKE, John A. Clinical Hematology: Principles, procedures, correlations. Editora Lippincott-Raven, 2^a edição, ISBN: 0397553218; 1998.

STRANDBERG U., PALVIAINEN M., ERONEN A., PIIRAINEN S., LAURÉN A., AKKANEN J., KANKAALA P. Spatial variability of mercury and polyunsaturated fatty acids in the European perch (Perca fluviatilis) - Implications for risk-benefit analyses of fish consumption. Environ Pollut. 219:305-314; 2016. doi: 10.1016/j.envpol.2016.10.050.

SUWALSKY M., VILLENA F., NORRIS B., CUEVAS Y.F., SOTOMAYOR C.P., ZATTA P. Effects of lead on the human erythrocyte membrane and molecular models. J Inorg Biochem. 97(3):308-13; 2003. doi: 10.1016/s0162-0134(03)00292-7.

SWIRSKI FK, NAHRENDORF M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. Science. 339(6116):161-6; 2013. doi: 10.1126/science.1230719.

SYVERSEN T., KAUR P. The toxicology of mercury and its compounds. J Trace Elem Med Biol. 26(4):215-26; 2012. doi: 10.1016/j.jtemb.2012.02.004.

TALEB S. Inflammation in atherosclerosis. Arch Cardiovasc Dis. 109(12):708-715; 2016. doi: 10.1016/j.acvd.2016.04.002.

TAUBE H, MYERS H, RICH RL. Observations on the mechanism of electron transfer in solution. J. Am. Chem. Soc. 1953, 75, 41182a

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. 11:125; 2018. doi: 10.3389/fnmol.2018.00125.

TOMA HE. 5 coleção de química conceitual: química bioinorgânica e ambiental. Editora Blucher, 1ª edição. 1:123-146; 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS UFAL. Pesquisadores da Ufal estudam espécie exótica de sururu na laguna Mundaú. https://ufal.br/ufal/noticias/2023/3/pesquisadores-da-ufal-estudam-especie-exotica-de-sururu-na-laguna-mundau. 2023. Acesso em: 09/04/2023

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. 129:1-24; 2018. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.034.

VIANNA AS, MATOS EP, JESUS IM, ASMUS CIRF, CÂMARA VM. Human exposure to mercury and its hematological effects: a systematic review. Cad. Saúde Pública. 35(2):e00091618; 2019. doi: 10.1590/0102-311X00091618.

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

WHO Preventing Disease through Healthy Environment: Exposure to Mercury: a Major Public Health Concern: World Health Organization Mercury Flyer. (2007)

WHO; IPCS. International Programme on Chemical Safety. Methylmercury. Environmental health criteria 101. Geneva: 114 p. 1991.

WIERZBICKI AS, REYNOLDS TM. Genetic risk scores in lipid disorders. Curr Opin Cardiol. 34(4):406-412; 2019. doi: 10.1097/HCO.000000000000623.

WIGGERS GA, FURIERI LB, BRIONES AM, AVENDAÑO MS, PEÇANHA FM, VASSALLO DV, SALAICES M, ALONSO MJ. Cerebrovascular endothelial dysfunction induced by mercury exposure at low concentrations. Neurotoxicology. 2016 Mar;53:282-289. doi: 10.1016/j.neuro.2016.02.010.

WOLIN M.S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20(6):1430-42; 2000. doi: 10.1161/01.atv.20.6.1430.

XU X, LIAO W, LIN Y, DAI Y, SHI Z, HUO X. Blood concentrations of lead, cadmium, mercury and their association with biomarkers of DNA oxidative damage in preschool children living in an e-waste recycling area. Environ Geochem Health. 40(4):1481-1494; 2018. doi: 10.1007/s10653-017-9997-3.

YANG SC. Scanning electron microscopy of normal human peripheral blood cells.

Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi.88(11-12):1128-32. 1989. PMID: 2636250.

YANG Z, MIN Z, YU B. Reactive oxygen species and immune regulation. Int Rev Immunol. 39(6):292-298; 2020. doi: 10.1080/08830185.2020.1768251.

ZAGO M.A., FALCÃO R.P., PASQUINI R. Tratado de Hematologia. Editora Atheneu, 1ª edição, 925; 2013.

ZALUPS R.K. Basolateral uptake of inorganic mercury in the kidney. Toxicol Appl Pharmacol. 151(1):192-9; 1998. doi: 10.1006/taap.1998.8416.

ZALUPS RK, DIAMOND GL. Mercuric chloride-induced nephrotoxicity in the rat following unilateral nephrectomy and compensatory renal growth. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1987;53(6):336-46. doi: 10.1007/BF02890261.

ZHANG JH, FERRANTE A, ARRIGO AP, DAYER JM. Neutrophil stimulation and priming by direct contact with activated human T lymphocytes. J Immunol. 1992 Jan 1;148(1):177-81.

ZHANG Y, CHEN X, YANG Y, WANG D, LIU X. Effect of dissolved organic matter on mercury release from water body. J Environ Sci (China). 2011;23(6):912-7. doi: 10.1016/s1001-0742(10)60497-4.

ZHAO Y, ZHOU C, GUO X, HU G, LI G, ZHUANG Y, CAO H, LI L, XING C, ZHANG C, YANG F, LIU P. Exposed to Mercury-Induced Oxidative Stress, Changes of Intestinal Microflora, and Association between them in Mice. Biol Trace Elem Res. 199(5):1900-1907; 2021. doi: 10.1007/s12011-020-02300-x.

ZHOU F, YIN G, GAO Y, LIU D, XIE J, OUYANG L, FAN Y, YU H, ZHA Z, WANG K, SHAO L, FENG C, FAN G. Toxicity assessment due to prenatal and lactational exposure to lead, cadmium and mercury mixtures. Environ Int. 133(Pt B):105192; 2019. doi: 10.1016/j.envint.2019.105192.

ZHOU R, YAZDI AS, MENU P, TSCHOPP J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature. 469(7329):221-5; 2011. doi: 10.1038/nature09663.

ZHUANG X., CUI A.-M., WANG Q., CHENG X.-Y., SHEN Y., CAI W.-H., LI H.-B., ZHANG S., QIN G. Liver Dysfunction during Pregnancy and Its Association With Preterm Birth in China: A Prospective Cohort Study. EBioMedicine. 26:152–156; 2017. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.11.014.

ZIMMER H., LUDWIG H., BADER M., BAILER J., EICKHOLZ P., STAEHLE H.J., TRIEBIG G. Determination of mercury in blood, urine and saliva for the biological monitoring of an exposure from amalgam fillings in a group with self-reported adverse health effects. Int J Hyg Environ Health. 205(3):205-211; 2002. doi: 10.1078/1438-4639-00146