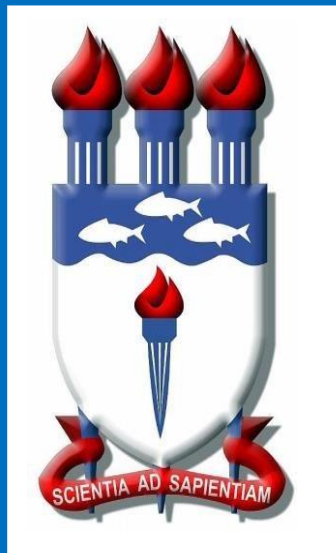




UFAL

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

SHEILA OLIVEIRA DE SOUZA

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA
HEMOGLOBINA NA PRESENÇA DE ACETATO DE
FENILMERCÚRIO: DE PROTEÍNAS ISOLADAS A MODELOS
BIOLÓGICOS**

Maceió – AL
2025

SHEILA OLIVEIRA DE SOUZA

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA
HEMOGLOBINA NA PRESENÇA DE ACETATO DE
FENILMERCÚRIO: DE PROTEÍNAS ISOLADAS A MODELOS
BIOLÓGICOS**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Catarina Rezende Leite

Coorientador: Prof. Dr. Josué C. Caldas Silva

Maceió – AL

2025

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

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

S729a Souza, Sheila Oliveira de.

Alterações estruturais e funcionais da hemoglobina na presença de acetato de fenilmercúrio : de proteínas isoladas a modelos biológicos / Sheila Oliveira de Souza. – 2025.
109 f. : il color.

Orientadora: Ana Catarina Rezende Leite.

Co-orientador: Josué C. Caldas Silva.

Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) –
Universidade Federal de Alagoas. Programa de Pós-Graduação em
Química e Biotecnologia. Maceió, 2025.

Bibliografia: f. 92-102.

1. Hemoglobinas. 2. Eritrócitos. 3. Acetato de fenilmercúrio. 4.
Estresse oxidativo. I. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Marli Justo e Luiz Baiano, pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis dessa minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, sou imensamente grata a Deus, por seu amor incondicional e por ter me guiado com sabedoria em cada passo dessa jornada. Sua presença iluminou meu caminho e sou eternamente grata pelo seu cuidado constante em minha vida. Em momentos de desafios, encontrei força nas palavras da Bíblia, que sempre me lembraram que nunca estou sozinho: "Tudo posso naquele que me fortalece" (Filipenses 4:13).

Agradeço imensamente aos meus pais, Marli Justo e Luiz Baiano, que, com sua trajetória de vida, me ensinaram o verdadeiro valor da luta, do trabalho árduo e da humildade. Minha mãe, com sua força inabalável, sempre foi minha fonte de inspiração, me guiando com amor, sabedoria e dedicação em cada passo dessa jornada. Meu pai, exemplo de coragem e perseverança, com sua simplicidade e esforço diário, foi a força que me impulsionou a seguir em frente. Vocês dois, com amor incondicional e apoio constante, foram meu alicerce, minha motivação, e sem vocês, eu jamais teria alcançado meus sonhos. Vocês são a base da minha força e a razão de minha perseverança.

As minhas irmãs (por ordem cronológica)

Marileide, Luana, Natália e Tamires, palavras não são suficientes para expressar o quanto sou grato a cada uma de vocês. Em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis desta jornada, vocês sempre estiveram ao meu lado, oferecendo não só o apoio prático, mas principalmente palavras de conforto, encorajamento e motivação.

À Melissa Marinho, meu "amorzinho de titia", suas palavras e vídeos sempre me deram força nos momentos mais difíceis. O seu carinho, o "eu te amo" que sempre vinha de você, foram um verdadeiro alicerce para mim.

À minha orientadora, a minha "mãe acadêmica", Ana Catarina, não tenho palavras suficientes para expressar a minha gratidão. Agradeço pelo acolhimento caloroso, pela paciência (mesmo que, às vezes, tenha sido pouca, risos), seus conselhos sábios me guiaram a cada passo dessa caminhada. Com

o seu carinho e dedicação, você foi muito mais do que uma orientadora, foi uma verdadeira mentora, sempre pronta para me apoiar e acreditar no meu potencial. Cada ensinamento seu ficará gravado em meu coração, e eu, com todo o meu ser, sou imensamente grata por tudo que fez por mim.

Ao meu Coorientador, Josué Carinhonha, uma verdadeira inspiração, não só na química analítica, mas em tudo o que envolve o aprendizado. Agradeço pela paciência, dedicação e por estar sempre disposto a me ajudar a seguir em frente. Sua forma de ensinar fez toda a diferença na minha jornada e me mostrou que o aprendizado não tem fim é uma estrada constante. Sou muito grato por cada ensinamento, cada conselho e, principalmente, por acredita no meu potencial.

Aos meus amigos que encontrei no laboratório, começo agradecendo ao Marcos, que foi o primeiro a me acolher quando cheguei toda tímida, uma verdadeira "coitada"! Hoje, você é um grande amigo, e sou muito grata por toda paciência e por me permitir ser sua última pupila. Maiara, minha querida amiga, agradeço por todas as vezes que compartilhamos desabafos, fofocas, alegrias e até conquistas! Você foi essencial para eu conseguir finalizar essa jornada com leveza e força. E à Ismirna Israelle (baiana arretada), obrigada por sempre escutar meus desabafos, pelos conselhos sinceros e por topa todas as festas do laboratório! Com vocês, essa jornada ficou bem mais leve e cheia de significado.

Aos meus amigos do laboratório, Leornado, Daniel, Victor, Pedro, Leticia e João.

Agradeço a banca pelas considerações.

A todos os meus professores do IQB e IFAL, meu muito obrigada!

Aos órgãos de fomentos pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte da minha jornada, permitindo que este sonho se tornasse realidade, meu sincero agradecimento. A ajuda de cada um foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Em muitos momentos, pensei em desistir, enfrentei noites sem dormir, choros e tristezas, mas nunca desisti. Superando cada obstáculo, as alegrias chegaram, culminando na realização dessa etapa tão importante. Como disse Friedrich Nietzsche: 'Aquilo que não

mata, fortalece.' Cada dificuldade me fez mais forte e mais determinado a seguir em frente.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

(Filipenses 4:1)

RESUMO

A contaminação por metais potencialmente tóxicos, como o mercúrio (Hg) e seus derivados representam um sério risco à saúde humana e ao meio ambiente. O mercúrio pode causar distúrbios neurológicos, comprometimento do sistema imunológico e doenças cardiovasculares. O fenilmercúrio (PM), é um composto orgânico derivado de mercúrio usado em fungicidas e pesticidas. Os eritrócitos (Ery) são células sanguíneas ricas em hemoglobina, uma proteína que se liga ao oxigênio e promove sua entrega aos tecidos e a remoção de dióxido de carbono. A exposição ao Hg e seus derivados, podem provocar aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), causar danos em proteínas, lipídios e DNA, contribuindo assim para o surgimento de diversas patologias. A literatura científica apresenta uma lacuna significativa sobre os impactos da exposição ao PM em células e modelos experimentais como um todo. Diante disso, este estudo visa investigar possíveis alterações estruturais, funcionais e redox do PM em três sistemas distintos no que concerne a complexidade dos modelos experimentais: hemoglobina (proteína), eritrócitos humanos (célula) e *Zebrafish* (*Danio rerio*) (animal). Os estudos teóricos indicam que o PM tende a interagir com o grupo heme ou aos resíduos de cisteína da hemoglobina (Hb), o que pode impactar na funcionalidade da proteína. A hipótese da ligação/interação com Hb foi evidenciada por meio dos estudos biofísicos, que demonstraram valor de constante de ligação (K_b) de $1.47(\pm 0.22) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, inferindo que a formação do complexo Hb-PM é significativa e favorável. Experimentalmente a exposição ao PM resultou em ligação com os resíduos de cisteína (ensaio de Ellman), alterações estruturais no grupo heme da Hb pura, evidenciado pela análise da banda de Soret, e redução da mobilidade eletroforética em função da formação de complexo supramolecular Hb-PM. Em eritrócitos humanos de voluntários, a exposição ao PM (0,125 – 1,0 μM) provocou uma diminuição de até 34% na captação de oxigênio. A geração de EROS e espécies reativas de nitrogênio (ERNS) foram verificadas por meio de sondas fluorescentes apropriadas, sendo observado um aumento de 2,2 vezes na geração de espécies reativas globais. Ademais, notamos que a produção de H_2O_2 aumentou 11%, enquanto a produção de NO, aumentou 90%. Na avaliação das enzimas antioxidantes houve diminuição na atividade da catalase e glutathione peroxidase em 25 e 49%, respectivamente, enquanto a atividade da superóxido dismutase aumentou 13%. A análise de marcadores secundários de estresse oxidativo revelou uma redução de 34% na razão GSH/GSSG e uma diminuição nos grupos sulfidril livres totais em 44%, sugerindo depleção dos mecanismos de defesa antioxidante. Salientamos, também, que não foram detectadas diferenças significativas na peroxidação lipídica, mas houve um aumento de 2,2 vezes nos níveis de proteínas carboniladas, refletindo oxidação de proteínas. No ensaio de fragilidade da membrana, observamos mudanças estruturais em Ery expostos à PM, indicando dano à membrana. Nessa linha, a análise por microscopia de força atômica revelou alterações na morfologia dessas células, bem como na elasticidade membrana. Por fim, os ensaios de toxicidade, demonstraram que o PM tem efeito teratogênico nos embriões de zebrafish, como também provoca danos cardíacos (número de batimentos) nos animais. Diante do nosso conjunto de resultados, concluímos que a exposição ao PM prejudica a estrutura, funcionalidade, e a morfologia dos Ery, devido à sua interação com a hemoglobina, causando alteração no sistema redox de tais células, e apresentando efeito teratogênico em modelo animal.

Palavras-chave: Hemoglobina; Eritrócitos; Fenilmercúrio; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Contamination by potentially toxic metals such as mercury (Hg) and its derivatives poses a serious risk to human health and the environment. Mercury can cause neurological disorders, immune system impairment, and cardiovascular disease. Phenylmercury (PM) is an organic compound derived from mercury used in fungicides and pesticides. Erythrocytes (Ery) are blood cells rich in hemoglobin, a protein that binds to oxygen and promotes its delivery to tissues and the removal of carbon dioxide. Exposure to Hg and its derivatives can cause an increase in the generation of reactive oxygen species (ROS), causing damage to proteins, lipids, and DNA, thus contributing to the emergence of several pathologies. The scientific literature presents a significant gap on the impacts of PM exposure on cells and experimental models as a whole. Therefore, this study aims to investigate possible structural, functional and redox alterations of PM in three distinct systems regarding the complexity of the experimental models: hemoglobin (protein), human erythrocytes (cell) and Zebrafish (*Danio rerio*) (animal). Theoretical studies indicate that PM tends to interact with the heme group or with the cysteine residues of hemoglobin (Hb), which may impact the functionality of the protein. The hypothesis of binding/interaction with Hb was evidenced through biophysical studies, which demonstrated a binding constant (K_b) value of $1.47 (\pm 0.22) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, inferring that the formation of the Hb-PM complex is significant and favorable. Experimentally, exposure to PM resulted in binding with cysteine residues (Ellman assay), structural alterations in the heme group of pure Hb, evidenced by the analysis of the Soret band, and reduction of electrophoretic mobility due to the formation of the Hb-PM supramolecular complex. In human erythrocytes from volunteers, exposure to PM (0.125–1.0 μM) caused a decrease of up to 34% in oxygen uptake. The generation of ROS and reactive nitrogen species (RNS) were verified by means of appropriate fluorescent probes, and a 2.2-fold increase in the generation of global reactive species was observed. Furthermore, we noted that H_2O_2 production increased by 11%, while NO production increased by 90%. In the evaluation of antioxidant enzymes, there was a decrease in catalase and glutathione peroxidase activity by 25 and 49%, respectively, while superoxide dismutase activity increased by 13%. Analysis of secondary markers of oxidative stress revealed a 34% reduction in the GSH/GSSG ratio and a decrease in total free sulfhydryl groups by 44%, suggesting depletion of antioxidant defense mechanisms. We also emphasize that no significant differences were detected in lipid peroxidation, but there was a 2.2-fold increase in the levels of carbonyl proteins, reflecting protein oxidation. In the membrane fragility assay, we observed structural changes in Ery exposed to PM, indicating membrane damage. In this line, the analysis by atomic force microscopy revealed changes in the morphology of these cells as well as in membrane elasticity. Finally, the toxicity tests demonstrated that PM has a teratogenic effect on zebrafish embryos, as well as causing cardiac damage (number of heartbeats) in the animals. Given our set of results, we conclude that exposure to PM impairs the structure, functionality, and morphology of Ery, due to its interaction with hemoglobin, causing changes in the redox system of these cells, and presenting a teratogenic effect in an animal model.

Keywords: Hemoglobin; Erythrocytes; Phenylmercury; Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo geoquímico do mercúrio em ambientes naturais	25
Figura 2: Estrutura química do acetato de PM	27
Figura 3: Representação do processo de eritropoiese	30
Figura 4: Níveis estruturais das proteínas	33
Figura 5: Estrutura molecular da Hb humana adulta (HbA) presente nos eritrócitos	35
Figura 6: Representação do grupo heme presente na Hb	36
Figura 7: A transição <i>T</i> e <i>R</i> da Hb	37
Figura 8: Geração de EROs pela cadeia transportadora de elétrons	39
Figura 9: Vias de formação de EROs e mecanismos de defesas antioxidantes	41
Figura 10: <i>Docking molecular</i> dos possíveis sítios de ligação do PM com a Hb realizado pelo programa AutoDock	58
Figura 11 A: Formação do complexo entre Hb- PM	60
Figura 11 B: Perfil espectral UV-Vis de amostras de Hb humana a 15,4 μ M incubadas com concentrações de 1,0-25 μ M PM	61
Figura 12: Espectros de absorção da Hb e PM	62
Figura 13: Conteúdo de tiol na Hb e eritrócitos na presença de PM	63
Figura 14: Efeito da adição de incrementos crescentes de PM à Hb na mobilidade eletroforética por Native-PAGE	64
Figura 15: Parâmetros de ligação e termodinâmicos da interação Hb- PM por espectrofotometria	66
Figura 16: Eritrócitos humanos expostos ao PM apresentam baixa capacidade de captação de oxigênio	68
Figura 17: A exposição de PM em eritrócitos humanos aumenta a produção de EROs, em concentrações de 0,125-1,0 μ M	70
Figura 18: A exposição ao PM aumenta a produção de peróxido de hidrogênio em eritrócitos humanos	71
Figura 19: A exposição ao PM em eritrócitos humanos gera a produção aumentada de óxido nítrico	72

Figura 20: Exposição do PM em concentrações de 0,125 – 1,0 μ M modifica o sistema antioxidante dos eritrócitos humanos expostos em comparação com os controles	74
Figura 21: Conteúdo de tiol em eritrócitos humanos na presença de PM	76
Figura 22: Exposição do PM em concentrações de 0,125 – 1,0 μ M modifica a relação do sistema GSH/GSSG dos eritrócitos humanos expostos em comparação com os controles	78
Figura 23: Exposição do PM não aumentou a produção de malondialdeído, produto da peroxidação lipídica em eritrócitos humanos expostos à concentrações de 0,125 – 1,0 μ M PM	80
Figura 24: Geração de proteínas carboniladas em eritrócitos humanos expostos a em concentrações de 0,125 – 1,0 μ M de PM	81
Figura 25: Fragilidade na membrana dos eritrócitos humanos na presença de PM	82
Figura 26: Experimento por microscopia de força atômica (AFM)	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desenvolvimento embrionário do zebrafish após exposição ao fenilmercúrio	87
Tabela 2: Frequência cardíaca do zebrafish	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
Cys	Cisteínas
DAF	Diaminofluoresceína
DCF	Diclorofluoresceína
DNPH	2,4 difenilhidrazona
DTNA	Ácido 6,6' ditiodinicotínico
DTNB	5,5' ditiobis-(2- Ácido Nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
eNOS	Óxido Nítrico Endotelial
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Ery	Eritrócitos
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
Hb	Hemoglobina
HPR	Enzima peroxidase
HSAB	Teoria de ácidos e bases duros e moles de Ralph Pearson
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LPO	Proteína carbonilada
MDA	Malondialdeído
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NEM	N-etilmaleimida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
PM	Fenilmercúrio
RBCs	Glóbulos vermelhos

R-Se	Selenóis
RSH	Grupos sulfidrilas
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas tiobarbitúricas
TCA	Ácido tricloroacético
WBCs	Glóbulos brancos
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Contaminação a metais tóxicos	21
2.2 Mercúrio e sua toxicidade.....	22
2.3 Acetato de fenilmercúrio	26
2.4 Sangue	28
2.4.1 Eritrócitos	28
2.4.2 Proteínas	31
2.4.3 Hemoglobina	34
2.5 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	38
3. JUSTIFICATIVA	44
4. OBJETIVO GERAL	46
4.1 Objetivos Específicos	46
5. MATERIAIS E MÉTODOS	47
5.1 <i>Reagentes e soluções</i>	47
5.2 <i>Experimentos usando à Hb humana comercial como modelo (proteína pura)</i>	47
5.2.1 <i>Simulação de Docking Molecular</i>	47
5.2.2 <i>Avaliação da formação de complexo entre Hb-PM e Banda de Soret com Hb humana</i>	47
5.2.3 <i>Determinação da concentração de grupos tióis livres totais Hb humana e eritrócitos</i>	48

5.2.4	<i>Avaliação do perfil de migração eletroforética da Hb humana</i>	48
5.2.5	<i>Ensaio Biofísicos com Hb humana</i>	49
5.3	Experimentos usando Eritrócitos como modelo (célula)	49
5.3.1	<i>Coleta das amostras de sangue</i>	49
5.3.2	<i>Ensaio de captação de oxigênio</i>	50
5.3.3	<i>Produção de espécies reativas de oxigênio totais</i>	50
5.3.4	<i>Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)</i>	50
5.3.5	<i>Produção de óxido nítrico</i>	51
5.3.6	<i>Fragilidade osmótica da membrana de eritrócitos</i>	51
5.3.7	<i>Atividade da superóxido dismutase (SOD)</i>	51
5.3.8	<i>Atividade da catalase (CAT)</i>	52
5.3.9	<i>Atividade da glutathione peroxidase (GPx)</i>	52
5.3.10	<i>Quantificação do estado redox (relação GSH/GSSG)</i>	52
5.3.11	<i>Peroxidação lipídica</i>	53
5.3.12	<i>Produtos da oxidação de proteínas</i>	53
5.3.13	<i>Microscopia de Força Atômica em Ery expostos a PM</i>	54
5.4	Experimentos usando a Zebrafish como modelo animal	55
5.4.1	Manutenção dos animais Zebrafish e exposição ao PM	55
5.5	<i>Análise de dados</i>	56
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
8.	PRESPECTIVAS	91
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

A exposição a metais potencialmente tóxicos tem se tornando uma preocupação global devido aos riscos substanciais que esses elementos representam contra a saúde humana. Tanto a exposição aguda quanto a crônica desses metais tóxicos podem causar sérios danos. O sistema nervoso central, em particular, é extremamente vulnerável a tais efeitos. É sabido que os metais potencialmente tóxicos têm a capacidade de causar danos mesmo em níveis baixos de concentração (TCHOUNWOU et al., 2014). Essa toxicidade pode resultar em uma ampla variedade de distúrbios neurológicos, afetando funções cognitivas, motoras e comportamentais. A exposição crônica a esses elementos está associada a um risco maior no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, além de aumentar a incidência de doenças cardiovasculares e o risco de câncer (CAITO et al., 2015). Além disso, há uma correlação direta com o aumento na prevalência de doenças metabólicas e renais, o que destaca o impacto abrangente da exposição prolongada desses elementos sobre a saúde humana (EOM et al; 2014).

O mercúrio, um metal tóxico, está presente no meio ambiente devido a eventos naturais e fontes antropogênicas, que inclui agricultura, descarga de águas residuais, mineração, entre outros (JAN et al. 2015). Existem várias formas de mercúrio, incluindo mercúrio elementar (Hg^0 , vapor), inorgânico e na forma de espécies orgânicas. Estudos indicam que o mercúrio e suas diferentes formas podem interagir com uma ampla gama de biomoléculas, incluindo aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, além de compostos contendo grupos tiol, como a glutathione. Essas interações podem comprometer a função celular e conduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a danos oxidativos e à disfunção de sistemas biológicos essenciais (KEUNEN et al. 2011).

As EROs são definidas como um termo coletivo que inclui radicais de oxigênio e certos não radicais, possuindo características oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais. As EROS incluem espécies como a radical hidroxila, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. As espécies radicalares são altamente reativas devido à presença de um ou mais elétrons

desemparelhados, tornando-os instáveis e propensos a reagir com outras moléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Essas espécies podem ser geradas por diversas vias, sendo a principal fonte a mitocôndria. Durante o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, ocorre a transferência de elétrons para o oxigênio, formando o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que pode ocorrer com mais predominância no complexo I (NADH desidrogenase), complexo II (succinato desidrogenase) e no complexo III (Coenzima Q). Estima-se que cerca de 2 a 5% dos elétrons transportados acabam formando radicais superóxidos (BOVERIS; OSHINO; CHANCE, 1972).

A produção de EROs é um processo que ocorre por múltiplas vias celulares e está associado tanto à homeostasia quanto a estados patológicos. A regulação e o controle dessas espécies reativas são fundamentais para a manutenção fisiológica celular e a prevenção de danos oxidativos, entre as moléculas afetadas, se tem a hemoglobina (GASCHLER; STOCKWELL, 2017).

A hemoglobina (Hb), é a proteína mais abundante nos eritrócitos, que tem sido amplamente estudada devido às suas interações com mercúrio e derivados de mercúrio (HOGEBACK et al., 2016). Esta proteína desempenha um papel crucial no transporte de oxigênio para os tecidos. Sua estrutura inclui quatro grupos prostéticos heme e seis resíduos de cisteína livres, que possuem a capacidade de interagir com ácidos moles de Pearson, como espécies de mercúrio. O mercúrio interage fortemente com grupos tiol ($-SH$) presentes em moléculas biológicas como a cisteína, devido à sua afinidade química com o enxofre (NELSON & COX, 2022). Essa interação pode desencadear uma série de efeitos adversos, afetando não apenas a função de transporte de oxigênio da Hb, mas também influenciando processos fisiológicos mais amplos.

A conscientização crescente sobre os impactos ambientais e à saúde humana levou a uma regulamentação mais rigorosa e à proibição do uso de mercúrio em muitos produtos e processos industriais (ANVISA, 2019). Atualmente, a busca por alternativas menos tóxicas e mais sustentáveis é um foco importante na pesquisa e no desenvolvimento de produtos agrícolas e industriais (DRISCOLL et al., 2013). Neste sentido, destacam-se os esforços internacionais, como a Convenção de Minamata sobre Mercúrio, visam reduzir a

emissão e a liberação de mercúrio no ambiente, promovendo práticas mais seguras e sustentáveis (PNUMA, 2013).

Estudos realizados demonstraram que o timerosal (composto orgânico de Hg, usando como conservante de vacinas) apresenta potencial tóxico para sistemas biológicos, afetando a estrutura da Hb, o que resulta em uma diminuição na sua funcionalidade, ou seja, diminuição na capacidade de ligação de oxigênio (MAGALHÃES et al., 2020). O fenilmercúrio (PM) é um derivado de mercúrio utilizado como herbicida e fungicida na área agrícola. Estudos demonstraram que ratos expostos ao PM na água de beber, apresentaram diminuição na contagem de glóbulos vermelhos (SOLECKI et al., 1991). Este trabalho visou avaliar os efeitos toxicológicos do PM em três modelos de complexidade experimental, na Hb pura comercial (proteína), em eritrócitos (célula) e em modelo animal (*Zebrafish*), avaliando alterações estruturais, funcionais, morfológicas e no estado redox. Assim, é importante ressaltar que existem poucos achados na literatura sobre esse específico composto de mercúrio, destacando a necessidade de investigação detalhada de seus impactos no contexto biológico.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Contaminação de metais potencialmente tóxicos

A exposição a metais potencialmente tóxicos (Pb, Hg, Cd e Cr) se tornou, nos últimos anos, um tema de grande preocupação global devido aos seus efeitos deletérios a saúde humana. Dados levantados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), demonstraram que esses metais, mesmo em concentrações baixas, estão associados a várias doenças cardíacas e a um elevado risco de desenvolvimento de câncer de bexiga, rim, fígado, pulmão e pele (CHOWDHURY, et al., 2018). De acordo com a OMS, o mercúrio está dentre os 10 produtos químicos de grande preocupação para a saúde pública, podendo causar diversos efeitos no meio biológico e na saúde humana exposta a tal contaminante (OMS, 2020).

O uso recorrente desses metais em diversas áreas, como agricultura, residências, indústrias e tecnologias, proporcionou um aumento significativo a exposição humana. Entre todas as fontes de poluição, 98, 92, 80, 76 e 80% da poluição por mercúrio, cádmio, arsénico, chumbo e crómio, respetivamente, têm origem em fontes de água, como via de contaminação humana (DONG, et al., 2024). Diversos estudos na literatura documentam que a exposição de mercúrio leva a um aumento na produção EROs, induzindo ao estresse oxidativo, que pode provocar oxidação de diversas biomoléculas como também o esgotamento de sistemas que neutralizam as EROs (FARKHONDEH et al., 2020 & GRUTA et al., 2010).

A contaminação ambiental por metais potencialmente tóxicos tem aumentado desde a Segunda Guerra Mundial. Segundo a OMS, em 2015, aproximadamente 8 milhões de mortes foram atribuídas ao câncer, muitas delas associadas à exposição a metais como Pb, Hg, Cd, As e Cr, cuja presença em níveis elevados além dos limites permitidos causa toxicidade em células vivas (OMS, 2017). Esses metais têm sido associados a danos antioxidantes, inibição enzimática, indução de apoptose e disfunção proteica, que pode levar à danos nas membranas e peroxidação lipídica (ASTDR, 2017).

Relatórios mais recentes da Organização das Nações Unidas (ONU) destacam que a contaminação por metais continua sendo uma preocupação global, com impactos significativos na saúde pública e no meio ambiente (ONU, 2020). Estudos indicam que a exposição crônica a esses metais está associada não apenas a doenças cancerígenas, mas também a problemas neurológicos, cardiovasculares e renais, ampliando a urgência de políticas eficazes de controle e mitigação desses contaminantes.

2.2 Mercúrio e sua toxicidade

O mercúrio e seus compostos, historicamente foram e são ainda bastante utilizados em uma variedade de processos industriais e produtos, como agentes farmacêuticos, conservantes de vacinas, explosivos, dentre outros. As discussões e estudos sobre os altos índices de toxicidade do mercúrio para o homem e animais vem sendo discutidas há bastante tempo (NEATHERY &

MILLER, 1975). Vários estudos apontam que a toxicidade de mercúrio, mesmo que seja em concentrações baixas, ocasionam distúrbios neuronais, imunotoxicidade e danos renais (CLARKSON et al., 2003), doenças cardiovasculares (DCVs), incluindo aterosclerose (HOUSTON, 2007; VIRTANEN et al; 2007), isso devido a sua alta capacidade de acúmulo nos órgãos. A acumulação de mercúrio nos órgãos pode causar danos severos, incluindo disfunção renal, problemas neurológicos, danos hepáticos, doenças cardiovasculares e distúrbios no sistema imunológico.

O mercúrio pode ser encontrado na forma elementar (Hg^0), na forma orgânica, o íon mercúrico está ligado covalentemente a um radical orgânico, como exemplo, temos o metilmercúrio (CH_3Hg^+), o dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) e o etilmercúrio ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$). Por outro lado, na forma inorgânica, pode ser encontrado, o íon mercurioso (Hg_2^{2+}) e o íon mercúrico (Hg^{2+}) (MESQUITA et al., 2010).

A concentração do mercúrio é influenciada por diversos fatores, incluindo a natureza química, a dose, a duração da exposição e a via de entrada no organismo. Esses elementos determinam seus efeitos prejudiciais nos tecidos humanos. De acordo com a teoria de ácidos e bases duros e moles (HSAB) de Ralph Pearson, o mercúrio é classificado como uma espécie mole devido à alta polarizabilidade dos elétrons em sua camada externa. Essa propriedade confere ao mercúrio uma forte afinidade por ligantes contendo doadores moles, como átomos de enxofre (S), selênio (Se) e fósforo (P) (WU et al., 2014).

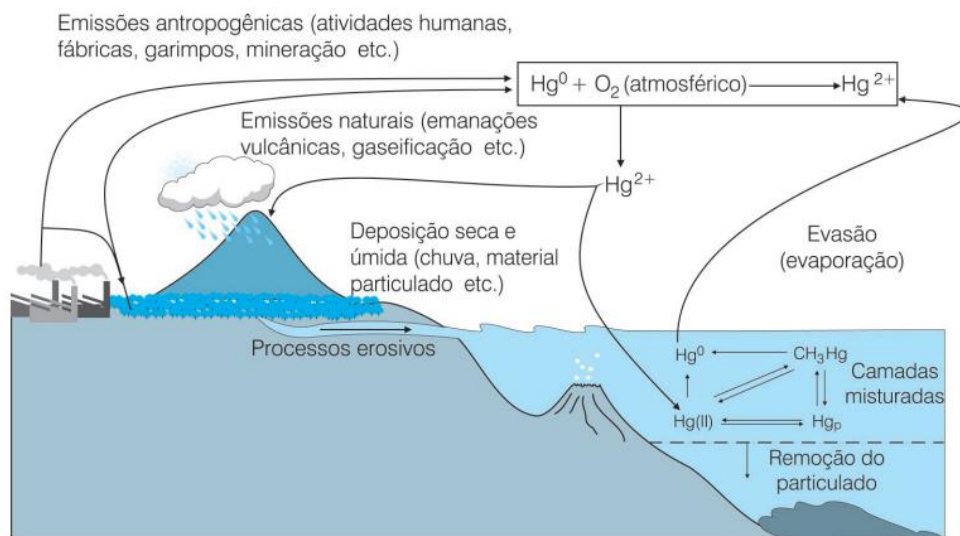
O mercúrio na forma elementar é bastante utilizado em processos industriais e de fabricação, bem como mineração, também é usado em objetos domésticos, médicos e elétricos (como termômetros, termostatos, amálgas dentárias). A exposição e conseqüentemente a intoxicação por mercúrio elementar na forma de vapor, pode levar a intoxicação, uma vez que o mercúrio é facilmente absorvido pelos pulmões, passa para a corrente sanguínea e alcança o cérebro. Isso resulta em uma variedade de alterações neurológicas e não neurológicas, como também pode provocar danos renais, alterações no sistema cardiovascular, efeitos imunológicos adversos (CICEK-SENTURK et al., 2014).

A intoxicação por mercúrio orgânico, principalmente metilmercúrio, onde as pessoas são mais expostas, pode ocorrer via trato gastrointestinal. Cerca de 95% são absorvidos pelos peixes e ingeridos pelos seres humanos ao consumirem peixes e frutos do mar que contém esse composto, que é direcionado na corrente sanguínea é distribuído em todos os tecidos. Ocasionalmente efeitos tóxicos para o sistema nervoso central e periférico. Vale ressaltar que em mulheres grávidas, o metilmercúrio possui mecanismos que atravessa a placenta e pode afetar o feto em desenvolvimento (OLIVER, 2012).

O timerosal (TM) é um derivado organomercurial do etilmercúrio que é usado como conservantes em vacinas e produtos farmacêuticos em diversos países. O etilmercúrio é decomposto pelo corpo rapidamente e não se acumula (OMS, 2020). De certa forma, a intoxicação por mercúrio inorgânico ocorre via trato gastrointestinal, em que cerca de 7 a 15% é ingerido e absorvido. Ainda, vale ressaltar que os compostos de mercúrio não conseguem atravessar facilmente a barreira hematoencefálica.

Tendo em vista que o mercúrio e suas espécies estão presentes na natureza, podendo ser encontrada no solo, ar e nas águas, é de extrema importância entender o ciclo geoquímico natural do mercúrio, este é caracterizado pelas rotas que este composto pode seguir no ambiente, proveniente das emissões geradas em atividades vulcânicas, processos geotérmicos e até volatilização dos oceanos (BISINOTI et al., 2004), (WASSERMAN et al., 2001).

Figura 1: Ciclo geoquímico do mercúrio em ambientes naturais.



Fonte: Sousa & Barbosa, 2000.

Sabe-se que em torno de 85% de mercúrio que contamina as águas doces se encontra na sua forma orgânica, preferencialmente como metilmercúrio. A **Figura 1**, apresenta um esquema demonstrando o ciclo do Hg na natureza, esquematizando as reações essenciais que podem ocorrer no sedimento ou solo, água ou atmosfera, ressaltando que essas reações sofrem a influência de bactérias e da luz solar contribuindo para transformações. Temos uma maior predominância de mercúrio elementar Hg^0 na atmosfera. Esse pode sofrer reações de oxidação sendo convertido em Hg^{2+} e em ambientes aquáticos por ter uma reatividade maior, sendo capaz de interagir com bactérias e ser convertido em espécies orgânicas como metilmercúrio (CH_3Hg^+) (BISINOTI et. al., 2004; WASSERMAN et. al., 2001).

Além disso, o mercúrio e seus respectivos compostos organomercuriais possuem uma alta afinidade por grupos sulfídricos de proteínas e outras biomoléculas, tais como enzimas (como a glutathione peroxidase, por exemplo), hemoglobina, albumina, queratina, entre outras proteínas. Além disso, também podem interagir com aminoácidos contendo grupos tiol, como a cisteína,

presente em várias proteínas estruturais e enzimáticas, o mercúrio se liga covalentemente a grupos tióis (-SH) de resíduos Cys de proteínas e forma adutos provocando alterações na conformação da proteína, consequentemente sua funcionalidade também sofre alteração. Como também pode se ligar à glutathione reduzida intracelular (GSH) e diminuir os estoques de GSH, resultando em um aumento de espécies reativas de oxigênio (VALKO et al., 2005).

A geração de EROs pela exposição ao mercúrio ocorre principalmente devido à sua capacidade de interagir com biomoléculas contendo grupos sulfídricos, como a glutathione reduzida (GSH). O mercúrio e seus derivados podem ligar-se diretamente à GSH, reduzindo seus estoques intracelulares. A GSH desempenha um papel crucial como antioxidante, neutralizando EROs e mantendo o equilíbrio redox celular. Com a diminuição dos níveis de GSH, há um aumento na concentração de EROs, como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que são produtos da reação de autooxidação ou de enzimas como a NADPH oxidase e xantina oxidase. Essas EROs podem causar danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA, comprometendo a integridade celular e contribuindo para o desenvolvimento de várias condições patológicas (MOOD et al. 2021).

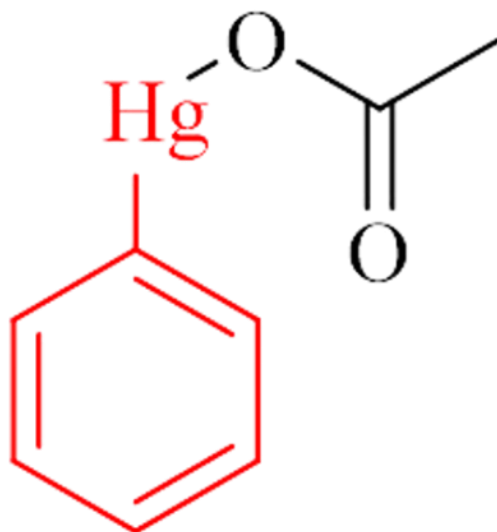
2.3 Acetato de fenilmercúrio

O acetato de fenilmercúrio (PM) é um composto organomercurial caracterizado como um pó inodoro higroscópico branco, que possui fórmula molecular de $C_8H_8HgO_2$ (**Figura 2**). Tal derivado do mercúrio tem sido utilizado como herbicida, antisséptico, catalisador, fungicida e conservante para tintas látex (TONAMURA et al., 1968; LYNN, 2024). Apesar de poucos estudos e experimentos sobre os efeitos toxicológicos do PM em modelos biológicos, alguns desses estudos realizados em modelos animais (ratos), demonstram que o fenilmercúrio pode causar, após uma administração aguda, um alto grau de necrose epitelial no córtex renal (SOLECKI et al., 1985).

Estudos indicam que o PM sofre decomposição para liberar mercúrio inorgânico e benzeno. Notavelmente, o benzeno gerado pode passar por uma

rápida conversão, para formar fenol. Essa série de reações químicas é crucial para compreender os processos de degradação do PM em meio aquoso e seus potenciais impactos ambientais e de saúde (DANIEL et al., 1972; LYNN, 2024).

Figura 2: Estrutura química do acetato de fenilmercúrio.



Fonte: Autores, 2024

Vários organomercuriais possuem mecanismos para atravessar a barreira hematoencefálica e causar efeitos nocivos no cérebro, diminuição de neurônios causados pelo aumento da citotoxicidade e apoptose (OLCZAK et al., 2009), (TEIXEIRA et al., 2018). Apesar de poucos estudos na literatura sobre a exposição do PM em células sanguíneas, experimentos em modelos animais mostraram reduções nas contagens da Hb em ratos, hematócrito e glóbulos vermelhos com uma dose de 3,7 mg Hg/kg/ dia de PM (SOLECKI et al; 1991). Em estudos de duração crônica, a exposição ao PM em doses de 0,37 mg Hg/kg/dia resultou em uma diminuição de aproximadamente 10% no peso corporal final em ratos machos (SOLECKI et al; 1991).

O mercúrio pode reagir com grupos tióis (R-SH) e selenóis (R-Se) em proteínas (CAROCCI et al., 2014). Isto permite que o mercúrio se ligue e modifique a estrutura e atividade dessas enzimas, transportadores e outras proteínas cuja atividade depende de grupos funcionais tiol ou selenol, estas incluem um conjunto diversificado de transportadores e enzimas importantes que

participar na regulação da estrutura e função celular, como ATPases; hemoglobina e mioglobina; oxidoredutases, transferases, hidrolases e isomerases; e selenoenzimas (KHAN & WANG, 2009; NAGAHARA, 2011).

2.4 Sangue

O sangue é uma composição fluida complexa e vital para o funcionamento do organismo humano, constituído por várias células e elementos essenciais. Ele é composto por plasma, que representa 55,3% de seu volume, hemácias que correspondem a 45%, e glóbulos brancos, ou leucócitos, que junto com as plaquetas somam aproximadamente 1%. O sangue desempenha um papel crucial na defesa imunológica e na manutenção das condições fisiológicas do corpo. Sua composição é constantemente renovada através da entrada e saída de diversas substâncias, garantindo a estabilidade necessária para o funcionamento adequado das células (eritrócitos, leucócitos) (HOFFBRAND; MOSS, 2013).

O plasma, a fração líquida e acelular do sangue, é uma matriz fluida composta majoritariamente por água (92%), enquanto proteínas representam 7% e 1% é constituído por moléculas orgânicas dissolvidas, como aminoácidos, glicose, lipídios, íons (Na^+ , K^+ , Cl^- , H^+ , Ca^{2+} , e HCO_3^-), além de gases como dióxido de carbono (CO_2) e oxigênio dissolvido (O_2) (SILVERTHORN, 2017). A porção celular do sangue inclui três tipos principais de células em suspensão no plasma: glóbulos vermelhos ou hemácias, glóbulos brancos ou leucócitos, e plaquetas ou trombócitos. As hemácias são responsáveis pelo transporte de oxigênio e dióxido de carbono, os leucócitos são fundamentais para a defesa do organismo contra infecções, e as plaquetas desempenham um papel essencial na coagulação do sangue, ajudando a prevenir a perda excessiva de sangue em casos de lesão.

2.4.1 Eritrócitos

As hemácias, conhecidas como glóbulos vermelhos ou eritrócitos (RBCs), desempenha papel essencial no transporte de gases para os tecidos corporais, atendendo as demandas metabólicas, entre esses gases, temos o oxigênio,

dióxido de carbono e o monóxido de carbono. Elas possuem formato de disco bicôncavo, medindo em torno de 7 μm de diâmetro, tendo tempo de vida de 120 dias (BEU et al., 2017). Essas células são produtos de um processo de maturação complexo que se inicia na medula óssea conhecido como eritropoiese, o qual envolve a diferenciação sequencial de células-tronco hematopoiéticas até a formação de eritrócitos maduros, prontos para desempenhar suas funções no sistema circulatório (PANDEY & RIZVI, 2011).

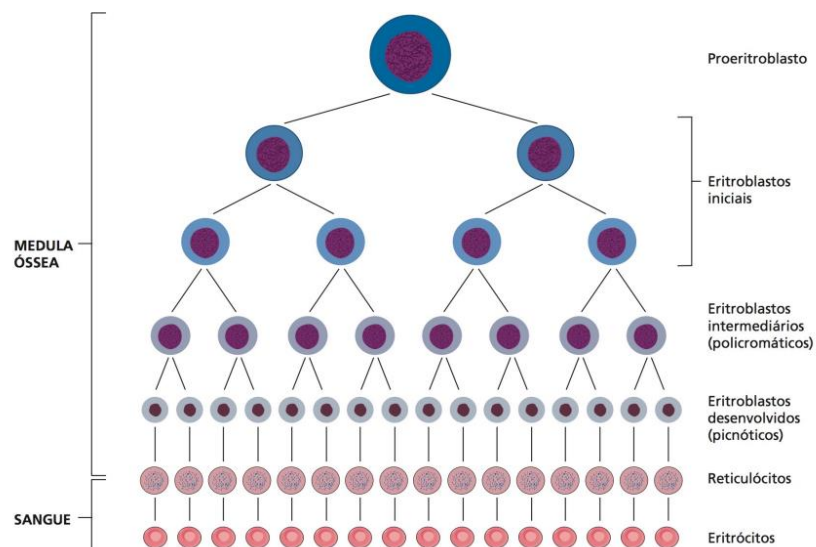
A eritropoiese é o processo de formação dos eritrócitos, tendo início com as células-tronco hematopoiéticas na medula óssea. Essas células-tronco têm a capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares, iniciando assim a produção de eritrócitos. Inicialmente, as células-tronco hematopoiéticas se diferenciam em proeritroblastos, como observado na **Figura 3** que são os primeiros precursores na linhagem dos eritrócitos. Em seguida, os proeritroblastos evoluem para eritroblastos iniciais, células maiores que exibem uma intensa coloração devido à abundância de RNA ribossomal (HOFFBRAND; MOSS, 2013).

Os eritroblastos iniciais se transformam em eritroblastos intermediários (policromáticos), que são caracterizados por uma alta atividade de síntese Hb e acúmulo de ferro. Essa fase é crucial para a preparação da célula para suas funções de transporte de oxigênio. Posteriormente, os eritroblastos intermediários se diferenciam em eritroblastos desenvolvidos (ou picnoticos). Durante este estágio, há uma condensação significativa do núcleo e um aumento na concentração de Hb. O núcleo é progressivamente reduzido e finalmente expulso da célula, marcando a transição para a fase seguinte (YAWATA, 2003).

Após a extrusão do núcleo, a célula progenitora se torna um reticulócito (**Figura 3**). Durante essa fase, os reticulócitos ainda contêm resíduos de organelas, como retículo endoplasmático e mitocôndrias. Esses resíduos são gradualmente eliminados conforme o reticulócito amadurece. Esse processo de perda das organelas ocorre enquanto os reticulócitos circulam no sangue, completando sua maturação em eritrócitos maduros. Ao final dessa maturação, os eritrócitos maduros ficam caracterizados pela ausência de núcleo e organelas, possuindo alta concentração de Hb, essencial para o transporte

eficiente de oxigênio dos pulmões para os tecidos do corpo (PANDEY & RIZVI, 2011).

Figura 3: Representação do processo de eritropoiese.



Fonte: HOFFBRAND; MOSS, 2013.

Os eritrócitos, ou glóbulos vermelhos, dependem exclusivamente da degradação anaeróbica da glicose como fonte de energia. Este processo ocorre principalmente através da via glicolítica, que resulta na produção de adenosina trifosfato (ATP), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e piruvato. O piruvato é então convertido em lactato pela ação da enzima lactato desidrogenase (DAVIDSON WD, 1972).

Aproximadamente 70 a 90% da glicose metabolizada nos eritrócitos segue a via glicolítica para gerar ATP, que é essencial para manter a integridade e funcionalidade da membrana celular e das proteínas intracelulares (VAN ZWIETEN et al., 2014). Este ATP é crucial para processos como a manutenção do gradiente iônico através da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+ -ATPase).

Além da via glicolítica, uma porção menor da glicose é desviada para a via das pentoses fosfato, que é fundamental para a produção de NADPH. O NADPH é vital para a manutenção do potencial redox da célula, protegendo os eritrócitos contra o estresse oxidativo ao manter a GSH. As enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona reduzida

desempenham um papel crucial na neutralização de EROs, prevenindo danos oxidativos às proteínas e lipídios da membrana celular (BEUTLER, 1971). A via das pentoses fosfato também é importante para a produção de ribose-5-fosfato, um componente essencial para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos. Embora os eritrócitos maduros não tenham núcleo e, portanto, não realizem síntese de DNA ou RNA, a atividade desta via é importante durante as fases de desenvolvimento dos precursores eritroides na medula óssea (SUN et al., 2017).

Em resumo, a glicose nos eritrócitos é metabolizada principalmente através da via glicolítica para a produção de ATP, enquanto uma fração menor é utilizada na via das pentoses fosfato para gerar NADPH, essencial para a defesa antioxidante. Estes processos garantem que os eritrócitos possam cumprir eficazmente suas funções de transporte de oxigênio e manutenção da homeostase redox (SUN et al., 2017).

A membrana eritrocitária é composta por 19,5% (peso/peso) de água, 39,5% de proteínas, 35,1% de lipídios e 5,8% de carboidratos (MURADOR & DEFFUNE, 2007; YAWATA, 2006). Os lipídios são constituídos por 60% de fosfolipídios, incluindo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina e fosfatidilserina, além de outros fosfolipídios em menor grau. O colesterol não esterificado representa cerca de 30% da composição lipídica, enquanto os 10% restantes são glicolipídios. A fluidez da membrana é crucial para sua função e depende de diversas características, como a classe de fosfolipídios, grau de saturação, comprimento das cadeias e a quantidade de colesterol livre (MURADOR & DEFFUNE, 2007; RODRIGUES & RIBEIRO, 2021; SALES NETO, 2012; YAWATA, 2006).

2.4.2 Proteínas

As proteínas são definidas com macromoléculas biológicas mais abundantes compostas de aminoácidos unidas por meio de ligações peptídicas. São formadas a partir de um carbono quiral ligado a um grupo amino, um grupo carboxila e um grupo R, que pode ser uma cadeia carbônica ou um hidrogênio (NELSON & COX, 2022). As proteínas podem ser descritas em quatro níveis estruturais (**Figura 4**), sendo eles, estrutura primária, que se caracteriza pela

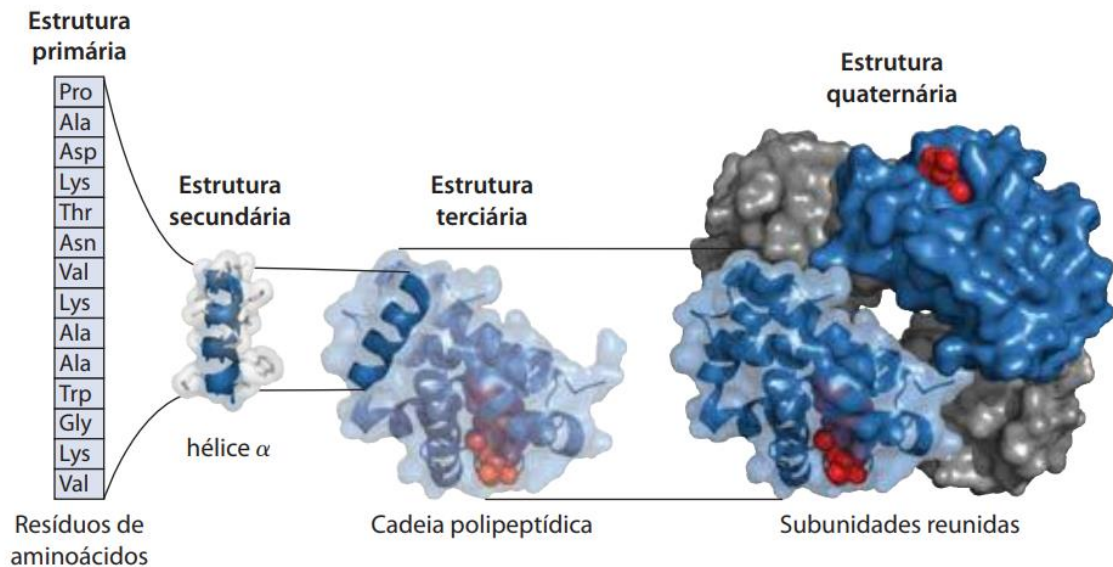
sequência de resíduos de aminoácidos, que estão ligados por ligações peptídicas, essa estrutura determina como a proteína se dobra em sua estrutura tridimensional única, que é crucial para determinar a função da proteína (STOLLAR; SMITH, 2021).

Em seguida se tem a estrutura secundária, que se refere ao arranjo estável dos resíduos de aminoácidos, sem considerar a posição de suas cadeias laterais ou em relação a outros segmentos. A estrutura secundária se refere a qualquer segmento de uma cadeia polipeptídica e descreve o arranjo espacial de seus átomos na cadeia principal, como as hélices alfa (α) e as folhas beta (β). A ligação recorrente que estabiliza essas estruturas é a ligação de hidrogênio (STOLLAR; SMITH, 2021).

Existem alguns tipos de estruturas secundárias que são particularmente estáveis e ocorrem extensamente em proteínas. Sendo as mais conhecidas como α -hélice, folha- β e a volta β . Nas α -hélice o esqueleto polipeptídico é enrolado em torno de um eixo imaginário desenhado da hélice. As folha- β é uma conformação mais estendidas das cadeias polipeptídicas e apresenta em forma de zigue-zague, ao invés de uma estrutura helicoidal, nessa conformação as ligações de hidrogênio são formadas entre os segmentos adjacentes da cadeia polipeptídica. Na estrutura secundária não há participação de grupo R na descrição da estrutura (NELSON & COX, 2022).

A estrutura terciária descrever o enovelamento tridimensional total de um polipeptídio. É caracterizado por possui uma única cadeia polipeptídica sendo estabilizada por ligações de hidrogênio, pontes dissulfeto, interações eletrostáticas e forças de van der Waals. Por fim, tem a estrutura quaternária, que é caracterizada pela associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas, formando uma proteína funcional. É mantida geralmente por ligações não covalentes entre as subunidades, dos mesmos tipos que mantêm as estruturas terciárias. A molécula de Hb, por exemplo, é formada por quatro cadeias polipeptídicas.

Figura 4: Níveis estruturais das proteínas.



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

As proteínas podem ser constituídas de uma única cadeia polipeptídica ou de várias cadeias polipeptídicas, ou seja, possuem dois ou mais polipeptídeos associados. Além disso, essas cadeias podem ser iguais, recebendo o nome de oligomérica, ou individuais, recebendo o nome de protômeros. Como exemplo temos a hemoglobina, que possui quatro cadeias alfas idênticas e duas cadeias betas idênticas, essas subunidades são mantidas por ligações não covalentes (NELSON & COX, 2022).

As proteínas em princípio podem se enovelar-se em uma variedade de formas, devido à flexibilidade de suas cadeias. A estrutura de uma cadeia enovelada é mantida por uma série de interações covalentes fracas, que são formadas entre os aminoácidos. As ligações não covalentes que ajudam a manter a forma das proteínas incluem as pontes de hidrogênio, as interações eletrostáticas e as interações de van der Waals.

Além disso, as proteínas podem ser classificadas em dois grandes grupos, as proteínas globulares, que se caracterizam como cadeias polipeptídicas dobradas em uma forma esférica ou globular, temos a mioglobina como exemplo, tendo funcionalidade de estocagem de oxigênio para facilitar a difusão de oxigênio nos tecidos musculares e na contração. As proteínas

fibrosas, com as cadeias polipeptídicas arranjadas em longos filamentos ou folhas, como exemplo, tem-se a α -queratina, o colágeno e a fibroína, apresentando propriedades de suporte, forma e proteção externa (NELSON & COX; 2022).

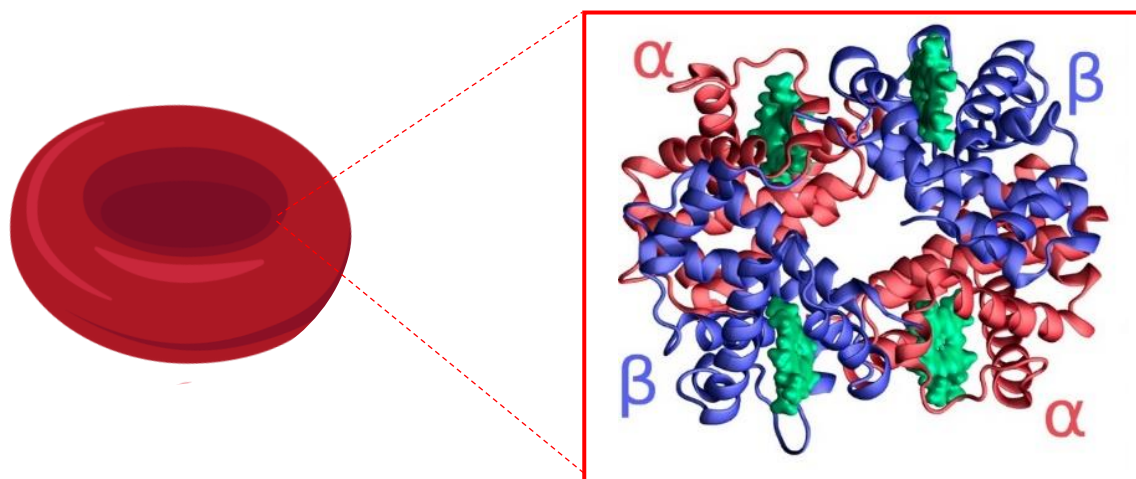
Os dois grupos são distintos estruturalmente, as proteínas fibrosas são formadas por um único tipo de estrutura secundária e a estrutura terciária é bem simples, por outro lado as proteínas globulares possuem diversas estruturas secundárias. Além disso, se diferenciam funcionalmente, as estruturas que garantem suporte, forma e proteção são as fibrosas, e as globulares estão relacionadas à regulação e atividade enzimática (DEVLIN, 2011).

As proteínas desempenham funções essenciais para o nosso organismo, devido a capacidade de adotar muitas conformações, estas podem promover suporte mecânico para células e tecidos (proteínas estruturais), transporte de substâncias pelo corpo e íons (proteínas de transporte), armazenamento de moléculas e íons (proteínas de armazenamentos), entre tantas outras funções (ALBERTS, 2010).

2.4.3 Hemoglobina

A Hb (com massa molecular de 64.500 Daltons) é uma proteína situada no interior dos glóbulos vermelhos (também conhecidos como eritrócitos ou hemácias), sendo uma das primeiras proteínas a ter sua estrutura tridimensional analisada e esclarecida (**Figura 5**). Consiste em quatro cadeias polipeptídicas, cada uma associada a quatro grupos prostéticos de heme, nos quais os átomos de ferro se encontram no estado ferroso (Fe^{2+}). Duas dessas cadeias são do tipo α , compostas por 141 resíduos de aminoácidos cada, enquanto as outras duas são do tipo β , compostas por 146 resíduos de aminoácidos cada. A hemoglobina é de configuração esférica e é considerada uma proteína tetramérica. Sua função primordial reside no transporte de gases aos tecidos corporais (NELSON & COX, 2022).

Figura 5: Estrutura molecular da hemoglobina humana adulta (HbA) presente nos eritrócitos.

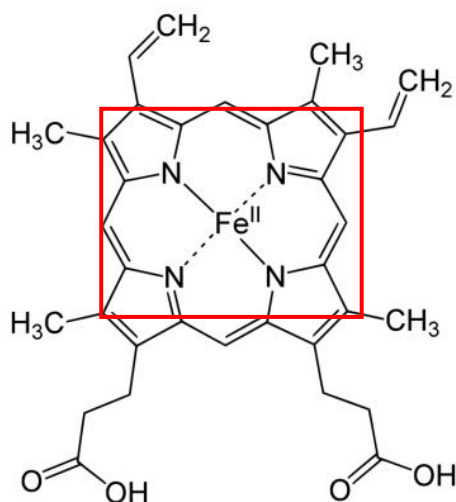


Fonte: BRINGAS, M. et. al. 2017.

O heme presente na molécula de hemoglobina é uma estrutura orgânica complexa, constituída por um anel porfirínico (**Figura 6**). Este íon de ferro, por sua vez, forma um complexo com um número de coordenação igual a seis, estabelecendo quatro ligações de coordenação com átomos de nitrogênio pertencentes ao sistema plano do anel porfirínico e duas ligações perpendiculares a este. Além de estar presente em diversas proteínas transportadoras de oxigênio, o heme também é encontrado em proteínas que participam de reações de oxirredução, como é o caso dos citocromos (HAUSER; GUNNER, 2004).

As moléculas de heme livres, ou seja, sem ligação a uma proteína, deixam o ferro (Fe^{2+}) com duas ligações de coordenação disponíveis. Quando o oxigênio (O_2) se liga a duas moléculas de heme livres, o Fe^{2+} pode ser convertido para Fe^{3+} , em que essa reação é considerada irreversível. No entanto, nas proteínas que contêm heme, essa conversão é evitada porque o heme é confinado no interior da estrutura proteica, restringindo o acesso às ligações de coordenação disponíveis.

Figura 6: Representação do grupo heme presente na hemoglobina.



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

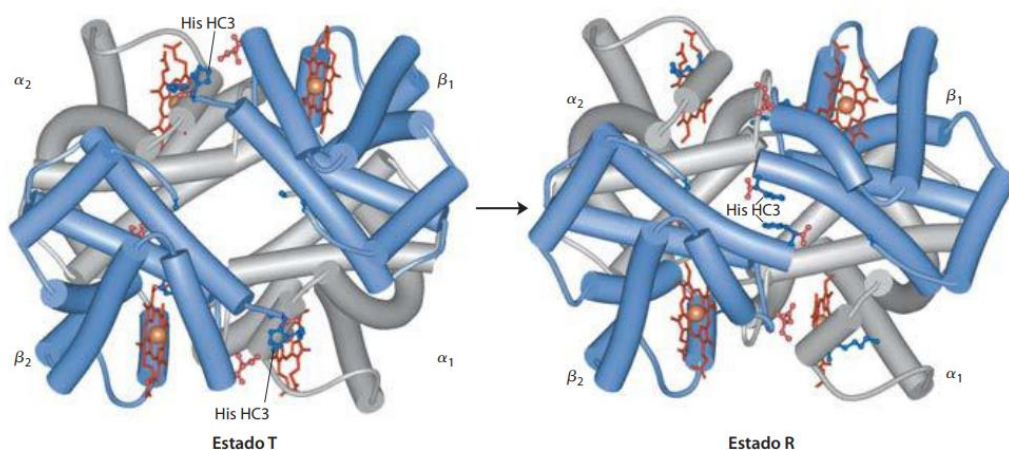
Uma dessas ligações é ocupada pelo nitrogênio de uma histidina na cadeia lateral, enquanto a outra é o local de ligação para o oxigênio molecular (O₂). Quando o O₂ se liga, as propriedades eletrônicas do ferro mudam, resultando na alteração da cor do sangue de roxo-escuro (venoso pobre em oxigênio) para vermelho-brilhante (arterial rico em oxigênio). Algumas moléculas pequenas, como monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO), têm uma afinidade maior pelo ferro do heme do que o O₂. Quando o CO se liga ao heme, o O₂ é excluído, tornando o CO altamente tóxico para organismos aeróbios. As proteínas de ligação ao oxigênio regulam o acesso do CO e de outras moléculas pequenas ao ferro do heme, protegendo contra sua toxicidade (SCHECHTER, 2008).

Estudos realizados por meio de raios X, mostraram que duas conformações principais da Hb, o estado *R* e o estado *T*. O oxigênio tem mais afinidade pela Hb no estado *R*. Quando não há a presença do oxigênio o estado *T* é mais estável, tendo a predominância da conformação da desoxiemoglobina. Estado *R* significa relaxado, enquanto o estado *T* significa tenso. Quando a Hb está no estado *R*, ela tende a ter uma maior afinidade pelo oxigênio, ou seja, está mais propensa a se ligar ao oxigênio. Por outro lado, quando está no estado

T, sua afinidade pelo oxigênio tende a ser menor, ou seja, ela libera o oxigênio que está carregando, tornando-se o estado *T* o mais estável, sendo a conformação predominante da desoxiemoglobina. Esse processo é conhecido como efeito cooperativo, sendo crucial para a função da Hb em realizar o transporte de oxigênio (PATEL; MOHIUDDIN, 2023)

A transição do estado *T* para o estado *R* é iniciada por alterações nas posições das cadeias laterais de aminoácidos específicos que cercam o heme. No estado *T*, a estrutura da porfirina apresenta uma leve distorção, resultando na projeção do ferro do heme ligeiramente para o lado da histidina proximal. Quando o oxigênio se liga, o heme se torna mais plano, o que provoca o deslocamento da histidina proximal e, conseqüentemente, da hélice F que está conectada a ela. Um outro fator que afeta a ligação cooperativa da hemoglobina é o pH. Nos tecidos que estão metabolicamente ativos, a produção de dióxido de carbono é elevada, o que leva a uma queda no pH. Essa mudança faz com que a Hb reduza sua afinidade pelo oxigênio (SCHECHTER, 2008).

Figura 7: A transição $T \rightarrow R$ da Hb, em que a transição do estado *T* para o estado *R* altera de modo considerável os pares de subunidades, afetando determinados pares iônicos.



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

2.5 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

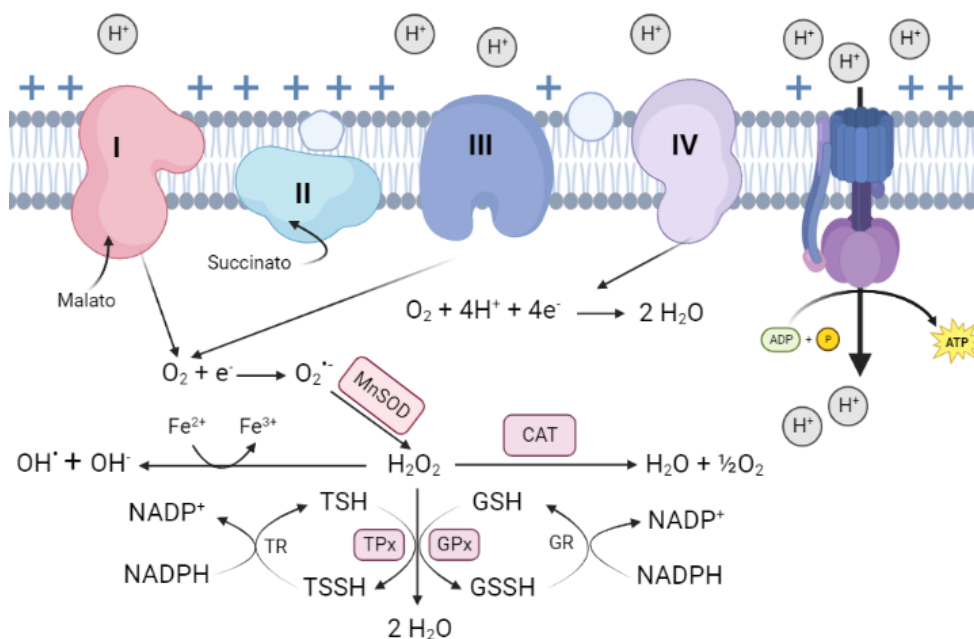
Danos oxidativos nos eritrócitos podem levar a perda da funcionalidade da Hb. Quando a pressão de oxigênio diminui nos eritrócitos pode ocorrer um aumento de uma provável ligação da Hb na membrana dos eritrócitos, facilitando a produção de EROs, desencadeando estresse oxidativo (RIFKIND et al., 2012; REMIGANTE et al., 2021). As EROs são definidas como espécies químicas altamente reativas que possuem um elétron desemparelhado originado do oxigênio molecular. As EROs resistem por um período muito curto (da ordem de 10^{-6} a 10^{-10} s) antes de colidirem com outra molécula e subtrair ou doar um elétron para alcançar estabilidade (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

É importante destacar que concentrações apropriadas de EROs são utilizadas na sinalização celular; no entanto, aumentos excessivos na sua produção podem desencadear reações em cadeia com proteínas, lipídeos e DNA, resultando em estresse oxidativo e alterações em diversas biomoléculas, levando a danos celulares que podem ser tornar irreversíveis e causar a morte celular (apoptose) ou necrose (SLIMEN et al., 2014).

Diversos estudos na literatura destacam que a mitocôndria é a principal fonte endógena de geração de EROs. Isso se deve ao seu papel crucial na produção de energia através da fosforilação oxidativa, onde o oxigênio molecular é reduzido a água na cadeia transportadora de elétrons (HAJAM et al., 2022). As EROs são geradas, através do vazamento de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, preferencialmente da coenzima Q. Então, esses elétrons que escapam reagem como o oxigênio para formar a primeira EROs, o radical superóxido. Vale ressaltar que, este radical pode ser convertido espontaneamente ou enzimaticamente em outras espécies reativas, como peróxido de hidrogênio e a radical hidroxila (PALMA et al. 2024).

Porém, é necessário destacar que além das mitocôndrias, as espécies reativas de oxigênio também são geradas por oxidases, em que estas oxidam carboidratos, aldeídos, aminoácidos, entre outras biomoléculas. Também merece destaque que a Xantina oxidase e NADPH oxidase, essa enzima tem sido bastante estudada, pois acredita-se que em condições hipóxicas, possam ser também produtora de espécies reativas de oxigênio (VOLODYMYR, 2014).

Figura 8: Geração de espécies reativas de oxigênio pela cadeia transportadora de elétrons.

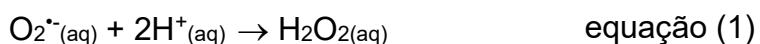


Fonte: Adaptado de Facundo et al., 2007.

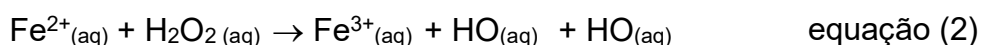
Dessa forma, constatamos que a produção exacerbada de EROs e a neutralização de antioxidantes resulta no estresse oxidativo, que consequentemente irá desencadear diferentes alterações nas células, ou seja, o estresse oxidativo, que é defendido como um desequilíbrio entre as EROs e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Para manter o equilíbrio e inibir as alterações que as EROs podem ocasionar no nosso organismo, existe sistemas antioxidantes que são responsáveis pela inibição e redução de lesões causadas pelos radicais. Essas substâncias podem ser divididas em dois sistemas, o enzimático, que são compostas por enzimas produzidas no organismo, e o não enzimático, sendo composta por vitaminas, flavonoides, licopeno, entre outras substâncias (BARBOSA, 2010).

Para proteger-se, a célula possui um sistema que pode atuar) como detoxificadora do agente que está ocasionando a lesão, sendo constituída por algumas enzimas, como SOD, GSH, CAT e GSH-Px. Os métodos mais utilizados para aferição indireta das EROs e, consequentemente, das lesões oxidativas, são os eletroquímicos e espectrofluorimétricos (ZHAO et al. 2021).

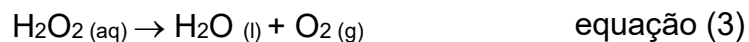
Como mencionado anteriormente, a primeira espécie reativa de oxigênio formada é o ânion radical superóxido, este sofre ação de uma enzima antioxidante, a SOD. Essa enzima foi descoberta em 1969, pelos pesquisadores Joe M. McCord e Irwin Fridovich (MCCORD et.al., 1969). Nesta reação ocorre uma dismutação, com constante de velocidade de aproximadamente, $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, onde o ânion radical superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio (uma espécie de oxigênio não radicalar) e água (equação 1) (DESIDERI et al., 2003). Vale ressaltar que a SOD possui três isoformas, sendo a SOD 1, que é citosólica dependente de cobre e zinco (Cu/Zn-SOD1), a SOD 2, que é mitocondrial, em que esta é dependente de manganês (Mn-SOD2) e, por fim a SOD 3, que é extracelular e dependente de cobre e zinco como a SOD 1 (Cu/Zn-SOD3) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



Logo após ocorre a formação do peróxido de hidrogênio, que é considerado uma espécie de oxigênio não radicalar, a qual pode reagir com ferro por meio da reação de Fenton. O ferro é extremamente tóxico e pode catalisar a formação do radical hidroxil (HO) que é altamente reativo, podendo oxidar macromoléculas e causar lesão tecidual (equação 2) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



O peróxido de hidrogênio pode ainda sofrer ação de duas enzimas, sendo reduzida a água e oxigênio. Essa reação de decomposição pode ser catalisada pela enzima CAT e pela GPx. A CAT é considerada uma hemoproteína, podendo atuar como peroxidase, que possui quatro grupamentos heme em sua estrutura com pesos moleculares entre 200 e 340 kDa. A CAT foi cristalizada a partir de fígado bovino pela primeira vez em 1937 pelos pesquisadores James B. Sumner e Alexandre L. Dounce (SUMNER et al., 1937). Dessa forma, essa enzima catalisa a clivagem heterolítica da ligação O-O do H_2O_2 em água e oxigênio, prevenindo a formação de EROs e garantindo a homeostase celular (GLORIEUX et al., 2017).

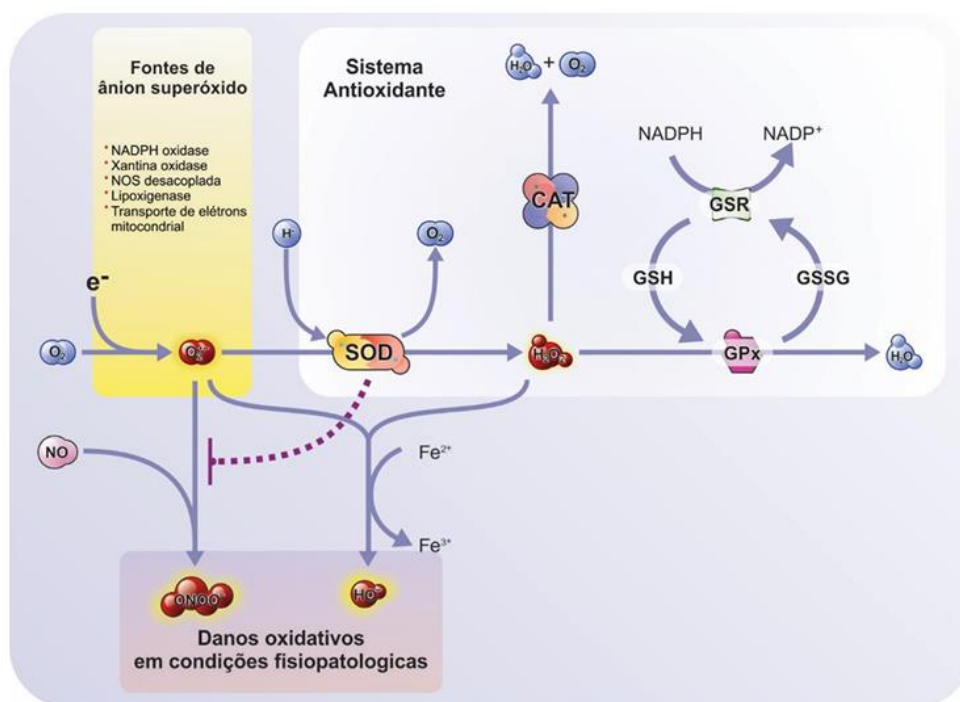


A enzima antioxidante, GPx também catalisa a reação de conversão de peróxido de hidrogênio em água. Tal enzima foi descoberta pela primeira vez em 1951. Possui em torno de oito isoformas (GPx1–GPx8) encontradas em humanos. A GPx mais conhecida e abundante é a GPx1, sendo encontrada no citoplasma. Sua estrutura é tetramérica, possuindo quatro subunidades idênticas, onde cada subunidade possui um aminoácido selenocisteína proteinogênico (HANDY et al., 2022 & LUBOS et al., 2011).



A GPx utiliza o tripeptídeo GSH em sua reação, como função para decompor o peróxido de hidrogênio em água como observado na reação [4]. Ademais essa enzima ainda tem o auxílio da GR, que via NADPH, recompõem o GSH que é oxidado a GSSG na reação (FLOHE et al., 1972).

Figura 9: Vias de formação de EROs e mecanismos de defesas antioxidantes.



Fonte: FUKAI, USHIO-FUKAI, 2011.

Além da formação de EROs, pode ocorrer a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), sendo o mais conhecido óxido nítrico (NO). Essa molécula é produzida a partir da reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (Nos), da L-arginina, liberando NO e citrulina. O NO possui diversas funções entre elas, neurotransmissão, tônus vasculares, regula a transcrição genética e a tradução do mRNA (AHMAD & MAHMOOD, 2019).

A NOs possui três isoformas importantes, sendo elas, a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), está relacionada à sinalização no sistema nervoso central, um neurotransmissor; a NOS endotelial (eNOS), que está relacionada à vasodilatação e regulação vascular; e por fim, a óxido nítrico sintase indutível, que possui uma variedade de funções, ou seja, induzida em alguns tecidos por algum agente pró-inflamatório (SAAD, 2021). Vale salientar que o NO pode reagir com o ânion radical superóxido formando o peroxinitrito (NO_3^-), podendo ocasionar danos oxidativos, nitratação de biomoléculas, como proteínas, lipídeos e DNA (FORSTERMANN et al., 2012) & (SAAD, 2021).

O estresse oxidativo tem sido amplamente estudado em diversos modelos de organismos, incluindo vertebrados e invertebrados. Dentre esses modelos, o *Zebrafish* destaca-se como uma ferramenta promissora para a investigação do estresse oxidativo, devido às suas inúmeras vantagens, como desenvolvimento rápido, baixo custo, alta similaridade genética com o genoma humano e ampla aplicação em diferentes áreas de pesquisa (CHOWDHURY & SAIKIA).

Devido ao seu pequeno tamanho e à transparência óptica das larvas de *Zebrafish*, esse modelo experimental permite a obtenção de imagens de alta resolução em tempo real. Essa característica possibilita a observação detalhada de processos biológicos, como o desenvolvimento embrionário, a circulação sanguínea e a resposta a substâncias tóxicas, sem a necessidade de técnicas invasivas.

Estudos demonstraram a toxicidade induzida pelo alumínio em embriões de *Zebrafish*, expostos a 50, 100 e 200 μM de AlCl_3 por 72 horas a partir de 6 hpf. Os resultados indicaram que o alumínio comprometeu significativamente o desenvolvimento dos embriões, levando a alterações morfológicas e morte celular. Além disso, observou-se uma alteração no estado oxidativo das larvas, com redução na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS e na atividade

de algumas enzimas antioxidantes na maior concentração testada (CAPRIELLO et al., 2021).

Outro estudo realizado com *Zebrafish* expôs embriões-larvas a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (0, 1, 4 e 16 µg/L) no intervalo de 2 hpf a 168 hpf. Os resultados indicaram que o aumento da concentração e do tempo de exposição ao Hg^{2+} levou a um acúmulo significativo do metal nos organismos, resultando em efeitos adversos no desenvolvimento. Dentre os danos observados, destacam-se o aumento da taxa de mortalidade, malformações, redução do comprimento corporal e atraso no período de eclosão (ZHANG et al; 2016).

3. JUSTIFICATIVA

Na literatura, é bem documentado que o mercúrio e seus derivados são amplamente conhecidos por seus efeitos tóxicos em seres humanos e no meio ambiente. Esses efeitos podem causar graves alterações no sistema nervoso central, incluindo distúrbios comportamentais e neurológicos, além de problemas cardiovasculares e comprometimento renal. Esses danos frequentemente estão relacionados ao aumento na produção de EROs e ainda interações com outras biomoléculas, causando perda de função, dentre outros efeitos indesejáveis.

Dentro desse contexto podemos nos basear em trabalhos do grupo, como os estudos realizados por Magalhães et al. (2020) e Sales et al. (2022), os quais mostraram o potencial tóxico do timerosal (um derivado do mercúrio), tendo como alvo biológico a Hb. Nessas análises, observou-se mudanças na estrutura da proteína, resultando em perda de sua função, ou seja, uma redução na capacidade de ligação do oxigênio, deformação em sua estrutura, alteração da membrana dos eritrócitos e de algumas biomoléculas presente em tal membrana.

Além disso, trabalhos do nosso grupo de pesquisa mostraram que o mercúrio inorgânico agrava o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos knockout para o receptor de LDL hipercolesterolêmico. A exposição ao contaminante piora a hipercolesterolemia, compromete a bioenergética mitocondrial, a função redox, e afeta os perfis de glóbulos vermelhos e brancos, além de alterar diversas características morfológicas e funcionais do tecido.

Considerando esses efeitos tóxicos já documentados e avaliados no nosso grupo de pesquisa, o presente trabalho propõe avaliar o impacto do PM (outro derivado orgânico de mercúrio) em três modelos distintos de complexidade: (1) na hemoglobina (proteína pura), (2) em eritrócitos humanos (célula), e (3) em um modelo animal, o *Zebrafish* (*Danio rerio*).

Dada a toxicidade já observada para outros derivados de Hg, assim como os efeitos do TM sobre a Hb e os eritrócitos, torna-se relevante investigar se o PM apresenta efeitos semelhantes sobre esses modelos de complexidade experimental. É importante destacar que há poucos estudos sobre esse

composto de mercúrio, especialmente em relação aos eritrócitos e Hb, gerando uma lacuna significativa quanto aos reais efeitos e mecanismos desse derivado do mercúrio para a saúde humana.

4. OBJETIVO GERAL

Investigar os impactos da exposição da Hb pura, eritrócitos humanos e do *Zebrafish* (*Danio rerio*) ao PM, considerando aspectos funcionais, estado redox, bem como, alterações estruturais e morfológicas dos modelos de complexidade estudados.

4.1 Objetivos Específicos

- ❖ Analisar alterações na estrutura da Hb por meio da banda de Soret;
- ❖ Avaliar o perfil de migração eletroforética da Hb exposta ao PM;
- ❖ Compreender como ocorre o mecanismo de interação entre a proteína Hb e o PM usando simulação de *docking molecular*;
- ❖ Determinar, por meio de ensaios biofísicos, as constantes de dissociação (K_d) e de ligação (K_b) da interação entre o PM e a Hb;
- ❖ Avaliar alterações na funcionalidade dos eritrócitos expostos ao PM;
- ❖ Mensurar a produção de EROs e ERNs nos eritrócitos expostos ao PM;
- ❖ Analisar as possíveis alterações na membrana dos eritrócitos expostos ao PM pela fragilidade osmótica;
- ❖ Determinar a atividade de enzimas antioxidantes nos eritrócitos: SOD, catalase CAT e glutathione peroxidase GPx mediante a exposição ao PM;
- ❖ Avaliar marcadores secundários do estresse oxidativo nos eritrócitos humanos, tais como GSH, GSSG à razão GSH/GSSG, grupos sulfidrilas livres, lipídios oxidados, e proteínas carboniladas frente a exposição do PM;
- ❖ Avaliar as modificações morfológicas na estrutura dos eritrócitos expostos ao PM, comparativamente ao grupo controle;
- ❖ Analisar alterações no processo de teratogênese de embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Reagentes e soluções

Todos os produtos químicos e reagentes foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich, com pureza acima de 95%, sem necessidade de etapas posteriores de purificação. Nos experimentos, foi utilizado tampão fosfato a 10 mM, contendo NaCl a 100 mM, com pH ajustado para $7,40 \pm 0,05$. A solução estoque PM foi preparada a 10 mM, diluindo o sólido diretamente em etanol, enquanto as soluções de trabalho foram diluídas em água para obter as concentrações desejadas. As concentrações de 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 μM de PM foram utilizadas para a realização dos experimentos com eritrócitos humanos.

5.2 Experimentos usando a Hb humana comercial como modelo (proteína pura)

5.2.1 Simulação por *docking molecular* da interação entre Hb e PM

As simulações de docking molecular foram iniciadas usando as coordenadas da proteína ovoalbumina derivadas de uma estrutura cristalina disponível no Protein Data Bank (PDB) com uma resolução de 2,70 Å sob o identificador 1LFL. As coordenadas atômicas do PM foram preparadas por meio da otimização da geometria com base em cálculos da teoria funcional da densidade (DFT), empregando a funcional de correlação de troca B3LYP aumentada por correções de dispersão por meio do esquema D3 de Grimme. Os cálculos usaram o conjunto de base 6-31G(d) para os ligantes e o potencial central efetivo LANL2TZ para os elétrons internos dos átomos de mercúrio, pareados com um conjunto de base de valência explícito. Todas as otimizações e análises de frequência vibracional foram executadas com o software Gaussian 09 (versão C.01).

Estudos de docking foram conduzidos usando os pacotes Autodock4 e AutoDockTools, incorporando cargas parciais atômicas derivadas pelo método Gasteiger. O protocolo foi projetado seguindo abordagens estabelecidas relatadas na literatura. As simulações de docking do complexo proteína-piceatannol 1LFL empregaram mapas de grade com dimensões de $129 \times 129 \times$

129 pontos, com espaçamento de grade de 0,25 Å. O algoritmo genético lamarckiano foi utilizado, configurado com um tamanho populacional inicial de 150 indivíduos, permitindo até $2,5 \times 10^6$ avaliações de energia e $2,7 \times 10^4$ gerações. As probabilidades de mutação e cruzamento de genes foram fixadas em 0,02 e 0,8, respectivamente, com uma probabilidade de busca local de 0,06 e um máximo de 300 iterações para otimizações individuais. As conformações resultantes foram agrupadas em clusters com base em um corte de desvio quadrático médio (RMSD) de 2,0 Å, priorizando as conformações de menor energia para análise.

5.2.2 Avaliação da formação de complexo entre Hb-PM e Banda de Soret com Hb humana

Os espectros de absorção da proteína livre e ligada ao PM, foram registrados de 200 a 600 nm, em tampão fosfato 10 mM a pH 7,4 (contendo NaCl a 100 mM). Para avaliar possíveis alterações na estrutura da Hb (no anel porfirínico) na presença do PM, a banda de Soret foi monitorada empregando-se diferentes concentrações de PM (1,0 10 e 25 µM) e com concentração fixa de Hb (15,4 µM). Os espectros de absorção foram registrados em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-1900i), após um período de 3 min de incubação.

5.2.3 Determinação da concentração de grupos tióis livres totais Hb humana e eritrócitos

A mensuração dos grupos sulfidrilas livres totais (expressos em termos de equivalente de cisteína) nas amostras de Hb (15,4 µM) e eritrócitos expostas por 3 min ao PM (0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 µM) foi realizada empregando o ácido 6,6'-ditiodinicotínico (DTNA) como reagente de derivatização à 100 µM. O NEM foi preparado em uma solução estoque de 2,5 mM, sendo empregado como um controle (bloqueador de grupos sulfidrilas), requerendo uma incubação prévia de 5 h antes da análise. A quantificação foi conduzida em um espectrofotômetro (Shimadzu (UV-1900i) à 344 nm. A cisteína (Cys) foi usada como como padrão

na construção da curva analítica (1 a 20 μM , $n = 3$, possibilitando a determinação do teor total de tiol livre (SALES et al., 2022).

5.2.4 Avaliação do perfil de migração eletroforética da Hb humana

A técnica de eletroforese foi utilizada para avaliar o efeito de migração eletroforética da Hb ($12 \mu\text{g L}^{-1}$) na presença e ausência de PM nas proporções de (1:0, 1:1, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100). Os experimentos foram realizados conforme Magalhães, (2020, com adaptações). As amostras foram aplicadas em um gel de 15% m/m de poliacrilamida em condições não desnaturantes, com SDS e β -mercaptoetanol no tampão de corrida. Neste experimento, uma alíquota de 50 μL da amostra de Hb pura ou combinações com PM foi utilizada. A eletroforese foi realizada com uma tensão de 100 V por cerca de 3 h. Em seguida, o gel foi colocado em uma solução de coloração (0,25 g de Coomassie blue R-250) para cada 100 mL de metanol (50%) / ácido acético (10%) por aproximadamente 5 min. Para descorar foi utilizado solução de metanol (50%) e ácido acético (10%).

5.2.5 Ensaios biofísicos com Hb humana

Para calcular o valor das constantes de ligação e dissociação realizou-se uma titulação espectrofotométrica na qual a macromolécula livre (Hb, $4 \mu\text{M}$) foi titulada com concentrações crescentes de ligante (PM, 1 a 25 μM). Os sinais analíticos foram registrados em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1900i) no intervalo de 235-335 nm. Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato (10 mM, pH 7,4), e as medidas realizadas a temperatura ambiente (28 °C). A formação do complexo entre a Hb e o PM foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1900i) no intervalo de 200-300 nm. Espectros de absorção nas condições: Hb (4 μM), PM (2 μM), complexo Hb + PM (1 μM), complexo Hb + PM (2 μM) e complexo Hb + PM (4 μM) foram realizados. Condição: pH 7,4 (Fosfato de sódio 10 mM e 100 mM NaCl).

5.3 Experimentos usando eritrócitos como modelo (célula)

5.3.1 Coleta das amostras de sangue

A coleta de sangue de voluntários foi realizada por punção venosa (CAAE 02840318.2.0000.5013), utilizando tubos de coleta a vácuo da marca Olen contendo EDTA-K3 ($198 \mu\text{g mL}^{-1}$) como anticoagulante. Para a separação dos eritrócitos do plasma, o sangue foi centrifugado a $2345 g$ por 10 min à temperatura ambiente ($\sim 28^\circ\text{C}$). Posteriormente, os eritrócitos foram submetidos à quantificação do teor total de proteínas pelo método de Bradford (1976), para que todos os traçados $2.000 \mu\text{g/mL}$ de proteína uma solução de Albumina sérica bovina (BSA) (2 mg mL^{-1}) foi usada como padrão de proteína.

5.3.2 Ensaio de captação de oxigênio em eritrócitos humanos

A captação de oxigênio nos eritrócitos foi medida utilizando um oxígrafo (Hansateh Instrument), à 28°C , em câmara de vidro com 1,0 mL equipada com um agitador magnético. A concentração inicial de oxigênio no meio de reação foi de $225 \text{ nmol O}_2 \text{ mL}^{-1}$ (Robinson & Cooper, 1970). Em todos os experimentos, o eletrodo de oxigênio foi calibrado (zero) com ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Os eritrócitos foram incubados com PM (0,125; 0,25; 0,5 e $1,0 \mu\text{M}$) durante 3 min para a realização do experimento.

5.3.3 Produção de EROs totais (DCF) em eritrócitos humanos

Para quantificar a produção de EROs de forma não específica, utilizou-se $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ($5 \mu\text{M}$). As análises foram realizadas utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu (RF 5301), empregando comprimento de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente; e *slit* de 3 nm, como descrito por Nunes et al. (2019). Os Ery foram incubados por 3 min com PM (0,125; 0,25; 0,5 e $1,0 \mu\text{M}$) para a realização do experimento.

5.3.4 Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em eritrócitos humanos

A produção de H_2O_2 foi avaliada utilizando Amplex-red ($10 \mu\text{M}$), uma sonda seletiva para essa EROs não radicalar. Este experimento foi conduzido na presença da enzima peroxidase (HPR, 1 U mL^{-1}). As análises foram realizadas utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu (RF 5301), com

parâmetros de excitação a 563 nm, emissão a 587 nm e com *slit* de 3 nm, conforme descrito por Nunes et al. (2019). Os eritrócitos foram incubados por 3 min com PM (1,0 μ M) para a realização dos experimentos (SALES et al., 2022).

5.3.5 Produção de óxido nítrico em eritrócitos humanos

A produção de NO nos eritrócitos foi avaliada utilizando a sonda fluorescente DAF-FM-DA a 5 μ M, com excitação e emissão em 495 e 515 nm, respectivamente, e *slit* de 2 nm usando espectrofluorímetro Shimadzu (RF 5301). Posteriormente, foi adicionado 1 μ M de CAT e 1 μ M de SOD ao sistema para minimizar as interferências do $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 que podem levar a geração de peroxinitrito que interfere na quantidade de NO. Então, os eritrócitos foram incubados por 3 min com PM (1,0 μ M) para a realização dos experimentos (Leite et al., 2010).

5.3.6 Fragilidade osmótica da membrana de eritrócitos humanos

A avaliação da fragilidade osmótica foi conduzida utilizando duas soluções de NaCl para representar um meio isotônico (0,9% m/v) e um sistema hipotônico (0,2% m/v). Os sinais analíticos foram registrados em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-1900i) por um período de 5 min, com intervalos de 15 s, a uma temperatura de 28 °C a 540 nm, conforme descrito por Cavalcanti et al. 2003. Os eritrócitos foram incubados com o PM nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 μ M durante 3 minutos para a realização do experimento.

5.3.7 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

O homogenato de eritrócito previamente incubado com concentrações de 0,125, 0,25, 0,5 e 1,0 μ M de PM foram utilizadas para a realização do experimento (80 μ g de proteína), incubado em 50 mM de tampão carbonato/bicarbonato de sódio ($NaCO_3/NaHCO_3$, pH = 10,2 com 0,1 mM EDTA) à 37°C. A atividade da enzima foi determinada mediante a reação de adição de 20 μ L de epinefrina (150 mM) em ácido acético (0,5% v/v) para um volume final de 1,0 mL. A absorbância foi registrada a 480 nm em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-1900i) durante 5 min. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína capaz de inibir a auto-oxidação de 1 μ mol de epinefrina

por minuto. Os resultados foram expressos em unidades (U) de atividade por miligrama de proteína (U mg^{-1}), conforme descrito por (Misra et al. 1972).

5.3.8 Atividade da catalase (CAT)

O ensaio é fundamentado na avaliação da decomposição do H_2O_2 . Um total de 40 μg de proteína (do homogeneizado de eritrócitos previamente incubado com concentrações de 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 μM de PM foram utilizadas para a realização do experimento), foi adicionado a tampão fosfato 50 mM ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH = 7,0) à 25°C. A reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 a 10 mM, resultando em um volume final de 1,0 mL. O decréscimo na absorbância foi monitorado a 240 nm em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1900i) por 2 min. Uma unidade de CAT foi estabelecida 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 unidades catalíticas por miligrama de proteína (mg^{-1} proteína), conforme descrito por Aebi (1984).

5.3.9 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade de GPx foi acompanhada pela redução na absorbância de NADPH a 340 nm utilizando um espectrofotômetro Shimadzu (UV-1900i) por um período de 3 min a 20°C. A mistura continha 80 μg (do sangue homogeneizado e previamente incubado por PM nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 μM de PM), 50 mM de Na_2HPO_4 (pH = 7,0), 5 mM de EDTA, 84 μM de NADPH, 1,1 mM de azida de sódio, 1,5 mM de GSH, 0,1 U mL^{-1} de GR e 90 μM de H_2O_2 em um volume final de 1,0 mL. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade necessária para oxidar 1 μmol de NADPH por miligrama de proteína. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama (U mg^{-1}) conforme descrito por Paglia et al. 1967.

5.3.10 Quantificação do estado redox (relação GSH/GSSG)

A relação GSH/GSSG foi determinada por meio da quantificação do conteúdo de GSH e GSSG, conforma descrito por Hissin e Hilf (1976). Para a reação de GSH e GSSG, foram utilizados homogenatos de eritrócitos

previamente incubados e macerados por 3 min com PM (0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 μM), contendo 50 e 100 μg de proteína, respectivamente; juntamente como o-ftaldeído (1 mg mL^{-1}) como sonda fluorescente. Para o ensaio de GSH, foi usado tampão fosfato de sódio (pH = 8,0, 100 mM) contendo 5 mM de EDTA, enquanto para o ensaio de GSSG, foi realizado em NaOH 100 mM, com adição NEM (0,04 mM) como inibidor de SH para prevenir a interferência do GSH. A fluorescência foi medida utilizando um leitor de microplaca (Tecan Infinite 200 Pro) com excitação em 350 nm e emissão a 420 nm. Uma curva analítica usando concentrações conhecidas de GSH e GSSG foi empregada para determinar as concentrações dessas biomoléculas nas amostras.

5.3.11 Peroxidação lipídica

Para determinar as substâncias reativas tiobarbitúricas (TBARS), foi empregada a técnica colorimétrica conforme descrita por Lucas et al. (2019). Assim, 0,3 mL de homogenato de eritrócitos previamente incubados e macerados por 3 min com PM (0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 μM), foi misturada à 600 μL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,6% (m/v) e 600 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (v/v). Após isso, as amostras foram agitadas no vortex, incubadas por 15 min à 95°C e resfriadas em banho de gelo por 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2.500 $\times g$ por 5 min. O sobrenadante resultante foi analisado utilizando um espectrofotômetro (Shimadzu (UV-1900i) à 540 nm. O conteúdo de (TBARS) foi calculado utilizando um coeficiente de extinção molar de malonaldeído de 1,65 $\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expresso como micro mol de TBARS por miligramas de proteína.

5.3.12 Produtos da oxidação de proteínas

A quantificação da formação de grupos carbonilas, foi conduzida através da reação 2,4-difenilhidrazona (DNPH) (Zanatta et al., 2013). Para a análise, as amostras foram divididas em dois grupos, o grupo controle e o grupo de reação. Para ambos os grupos, foram utilizados 100 μL de homogenato de eritrócitos previamente incubados e macerados por 3 min com PM (0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 μM). As diferenças entre os grupos residem no tratamento das amostras, onde no grupo controle foram adicionados 400 μL de HCl 2,5 M, enquanto para o grupo

de reação foram adicionados 400 μL de DNPH 10 mM, que foram dissolvidos previamente em HCl 2,5 M. Posteriormente, os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 1 h, sendo agitados a cada 15 min. Em seguida, foram adicionados 500 μL de TCA 2 M para promover a precipitação das proteínas, seguido de centrifugação das proteínas centrifugadas em TCA a $10.000\times g$ por 10 min à 4°C . As proteínas foram lavadas com uma mistura de etanol e acetato de etila (1:1 v/v), ressuspensas em guanidina 6 M e centrifugadas novamente a $10.000\times g$ por 10 min à 4°C . O sobrenadante foi então recolhido para análise da absorbância à 370 nm utilizando um leitor de microplaca (Tecan Infinite 200 Pro), e os resultados foram expressos em pmol mg^{-1} proteína (REZNICK & PACKER, 1994). Eritrócitos previamente incubados e macerados por 3 min com PM (0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 μM),

5.3.13 Microscopia de Força Atômica

As imagens topográficas e as medições da curva força foram realizadas utilizando microscopia de força atômica (AFM) (Multiview 4000 TM e Multiview 1000 TM, Nanonics, Israel) acoplada a um microscópio óptico (BXFM, Olympus, Tóquio, Japão). Essa combinação permitiu posicionamento preciso da ponta do AFM sobre a célula, com precisão micrométrica. Para minimizar o ruído ambiental durante as medições, o sistema AFM foi acusticamente isolado. Além disso, o equipamento foi montado em uma mesa de amortecimento ativa para reduzir os ruídos mecânicos. A topografia celular foi obtida em modo *tapping* pelo sistema MV4000 com uma taxa de varredura de 0,2 Hz, a ponta de varredura utilizada com um raio de curvatura típico < 20 nm e uma frequência nominal de 35 kHz. As áreas escaneadas foram de $80\text{ }\mu\text{m} \times 80\text{ }\mu\text{m}$ e a morfologia de 50-65 células (uma média de 300 células por grupo) foi analisada em cada varredura. As imagens obtidas foram tratadas no software WSxM 9.26. O experimento das curvas de força-distância foi conduzido pelo sistema MV100 com uma sonda que possui uma frequência de ressonância de 13 KHz e uma constante de mola de $0,2\text{ N m}^{-1}$. As medições da curva força-distância foram realizadas movendo a ponta do cantiléver em direção à amostra a uma velocidade de carga constante de $5\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$. Para cada grupo de células, eritrócitos, controle ($n = 3$) e expostas

ao PM (1 μM por 3 min) ($n = 3$), foram adquiridas 50 curvas força-distância. Todo o experimento foi realizado com a mesma sonda.

5.4 Experimentos usando a *Zebrafish* como modelo animal

5.4.1 Manutenção dos animais *Zebrafish* e exposição ao PM

Exemplares adultos do *Zebrafish* (*Danio rerio*) linhagem selvagem foram mantidos em uma densidade de 5 animais L^{-1} em aquários de 4 L com recirculação contínua de água sob temperatura de 26 ± 1 °C. Os parâmetros físico-químicos da água (temperatura, pH, oxigênio dissolvido) foram monitorados diariamente. O ciclo de 10 claro/14 escuro foi adotado e a alimentação foi realizada duas vezes ao dia, com ração seca *ad libitum* (Tropical[®]) e *artêmia sp.* Então, *Zebrafish* machos e fêmeas foram mantidos em aquários separados com enriquecimento ambiental.

Para obtenção dos embriões exemplares do *Zebrafish* foram separados numa proporção de fêmea e machos 1:2 e colocados em contato visual compartilhando a mesma água na tarde anterior à reprodução. A reprodução dos animais ocorreu nas primeiras horas do dia. Após os eventos reprodutivos, os embriões foram coletados e lavados exaustivamente para remoção de sujidades com o meio E3 (NaCl 15 mM, KCl 0,5 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,49 mM, KH_2PO_4 0,15 mM, Na_2PO_4 0,042 mM, CaCl_2 0,1 mM e NaHCO_3 0,07 mM, à um pH 7.2). Em seguida os embriões foram avaliados quanto à viabilidade com o auxílio de uma lupa. Embriões não fecundados ou coagulados foram descartados. Embriões viáveis foram aleatoriamente distribuídos em grupos de 20 embriões em uma placa de 24 poços. O ensaio de teratogênese foi realizado nas concentrações de PM 10 - 0,01 μM . A 3,4-dicloroanilina (4 mg L^{-1}) foi utilizada como controle positivo (OECD, 2013). A exposição foi realizada em um sistema semi-estático com renovação do meio após 48 h. O monitoramento dos efeitos da exposição foi realizado com 24, 48 e 72 hpf (horas pós-fertilização). Os desfechos considerados foram não descolamento da cauda, ausência na formação de somitos, ausência de batimento cardíaco, coagulação do embrião e taxa de eclosão. Também foi mensurada a frequência cardíaca a 72 hpf. Os embriões foram fotografados com auxílio de um microscópio com câmera acoplada (BEL

– NIB100). Todos os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-UPE (Processo 008/2024).

5.5 Análise de dados

Os resultados foram apresentados com média $\pm$ erro ($n = 3$). Os dados foram analisados utilizando teste t de Student para amostras independentes e ANOVA *one way*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para identificar diferenças significativas entre os grupos a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Foram utilizando os *softwares* Graph Pad Prism versão 8.0.1, OriginPro 9.0. Para os resultados de *Zebrafish*, os dados obtidos foram testados quando a normalidade e homogeneidade das variâncias com auxílio do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S).

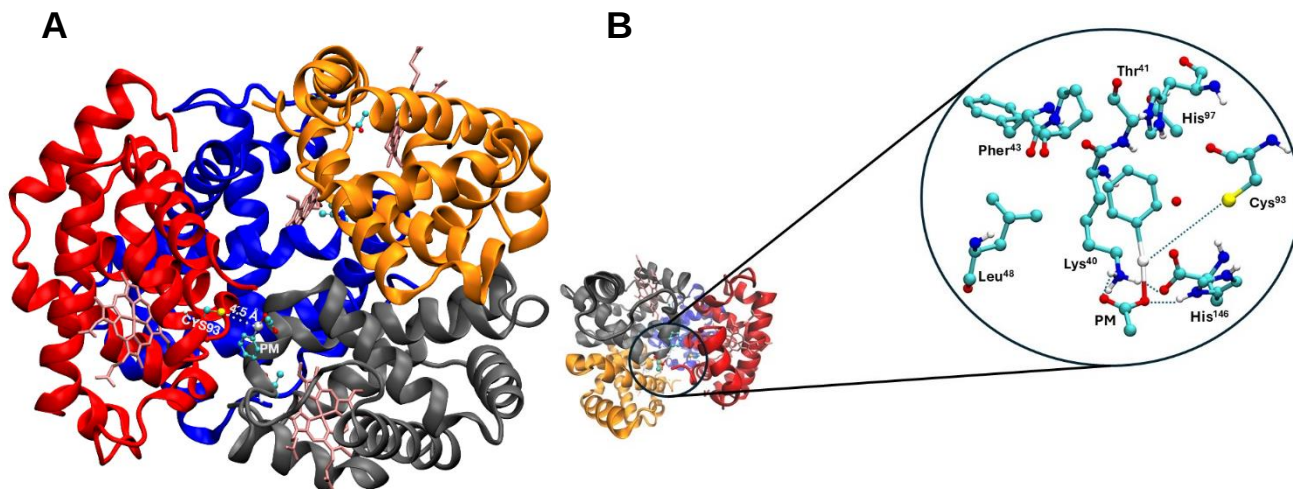
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para investigar de forma abrangente os efeitos do PM e suas interações biológicas, utilizamos três modelos experimentais com diferentes níveis de complexidade. O primeiro modelo consistiu na Hb humana pura comercial, permitindo a análise dos possíveis sítios de ligação entre a proteína e o ligante, as alterações na estrutura do grupo heme e as mudanças conformacionais da proteína. O segundo modelo experimental, com maior complexidade, envolveu os eritrócitos, células que possuem alta concentração de Hb, e os experimentos focaram na avaliação da funcionalidade dessas células, incluindo também a produção de EROs, a atividade de enzimas antioxidantes e marcadores secundários de estresse oxidativo. Por fim, o terceiro modelo foi um estudo em Zebrafish, utilizando embriões para avaliar a toxicidade do PM no processo de teratogênese.

6.1 Simulação de *docking molecular*

Para entender os possíveis sítios de ligação do PM com a Hb, foi utilizada a simulação de *docking molecular*. O *docking molecular* é uma técnica computacional amplamente utilizada para prever a interação entre macromoléculas (proteínas, enzimas, peptídeos, DNA, entre outros) e ligantes, ajudando a identificar possíveis sítios de ligação e a caracterizar as forças que governam as principais interações (Li et al., 2019). Inicialmente, as simulações realizadas, utilizaram *grids* centrados nas regiões do grupo heme e da Cys-93 da Hb (**Figura 10**), pois essas áreas foram inicialmente consideradas os sítios potenciais de ligação do composto de mercúrio de acordo com estudos realizados de outros organomercuriais com proteínas (SALES et al., 2022)

Figura 10 A e B: *Docking molecular* possível sítio de ligação do PM com a Hb, realizado pelo programa *AutoDock*. A Cys 93 é um provável local de ligação do PM. O processo de ligação é favorável, sendo governado por interações eletrostáticas e do tipo van der Waals.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Os estudos iniciais das simulações revelaram pontos importantes, destacando que a região próxima ao grupo heme da Hb (energia livre de Gibbs de - 4,4 kcal/mol) e a Cys-93 (energia livre de Gibbs de - 4,6 kcal/mol) são dois prováveis sítios de ligação para o composto de mercúrio. Contudo, estudos subsequentes mostraram que o PM tende a formar o complexo mais estável com a Hb ao interagir de maneira mais proeminente com o resíduo Cys-93 (**Figura 10 A**).

Além disso, os resultados indicaram que o PM apresenta uma clara preferência por se ligar às cadeias B e C da proteína, envolvendo-se em interações não covalentes significativas com os resíduos LYS40, THR41, PHE43, PRO44, LEU48, HIS97 e HIS146 (**Figura 10 B**). A maioria desses resíduos contribui para uma região predominantemente hidrofóbica, influenciada pelos resíduos PHE, PRO e LEU, destacando o papel crucial das interações hidrofóbicas na estabilização do complexo Hb –PM.

Os dados também mostraram que o PM se liga à Hb com uma energia livre de ligação de aproximadamente - 5,0 kcal/mol. A constante de ligação calculada, em condições padrão, está em boa concordância com o valor

experimental da constante de ligação, K_b $(1,47 \pm 0,22) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Termodinamicamente, o processo de ligação é favorável, indicando que a interação entre o composto de mercúrio e a Hb é energeticamente viável e espontânea.

Estudos de Sales et al. (2022), utilizando abordagens teóricas de *docking molecular*, mostraram que o TM interage diretamente com o Cys-93 livre disponível da Hb. Essa interação resulta em alterações estruturais e funcionais da proteína, evidenciando os potenciais efeitos tóxicos desse organomercurial. Embora as simulações sugiram a interação do PM com a Hb e indiquem possíveis mudanças conformacionais na proteína, é importante ressaltar que as simulações de *docking molecular* possuem limitações inerentes. Portanto, são necessários resultados experimentais para validar e complementar essas descobertas, como observado adiante.

6.2 Avaliação da formação de complexo entre Hb-PM e Banda de Soret com Hb humana

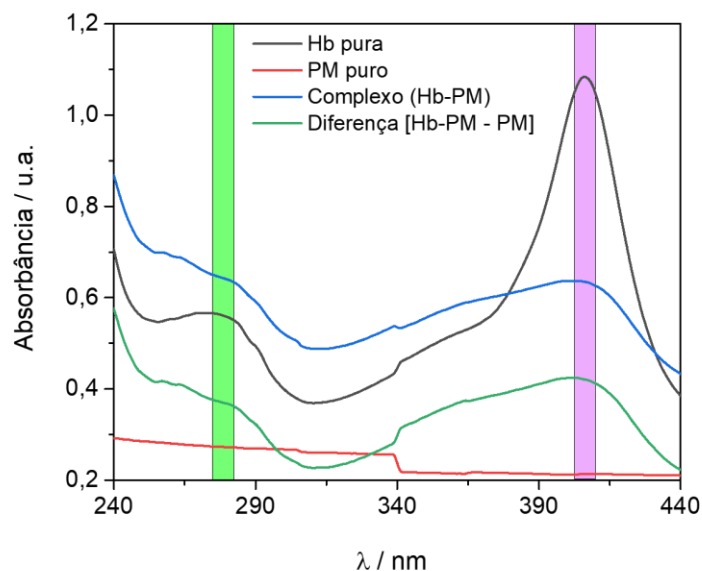
Diversos estudos na literatura destacam os efeitos específicos das espécies de mercúrio sobre proteínas, como a Hb e a albumina sérica (BSA), devido às alterações estruturais e funcionais que esses compostos podem induzir. A pesquisa realizada por Magalhães et al. (2020) evidenciou a toxicidade do TM, nos sistemas envolvendo a Hb como alvo biológico.

Além disso, estudos conduzidos por Santos et al. (2018) demonstraram que a interação entre o TM e a BSA provoca modificações estruturais na cadeia polipeptídica da albumina, evidenciando o impacto dessas substâncias na conformação das proteínas. Tendo em vista essas elucidações, a espectroscopia UV-vis foi empregada para confirmar a formação do complexo Hb-PM monitorando as mudanças estruturais da proteína (**Figura 11 A**).

A Hb livre (4 μM) apresentou absorção em torno de 400 nm, quando o PM foi adicionado a Hb, ocorreu um efeito hipercrômico seguido por um deslocamento hipocrômico, indicando uma interação entre Hb e TM e à formação do complexo supramolecular (Hb-PM) (SANTOS et al., 2018). Essa afirmação foi baseada no espectro resultante da subtração dos espectros do sistema Hb-PM

pelo ligante livre (PM) gerado em um espectro não sobreposto ao espectro de Hb livre (**Figura 11 A**).

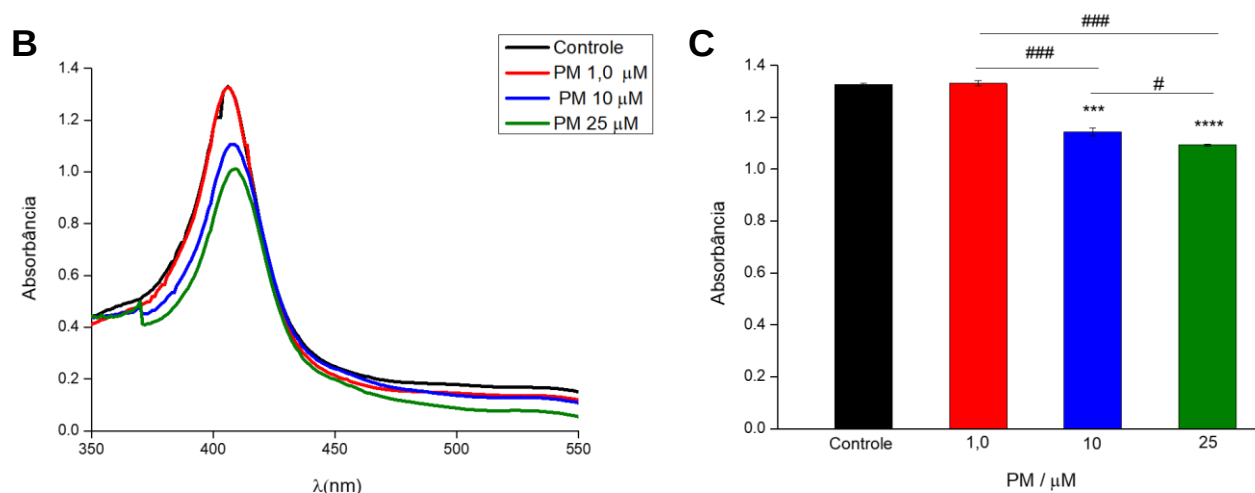
Figura 11 A: Resultados obtidos por espectroscopia no UV-vis. Formação do complexo entre Hb-PM. Hb ($4 \mu\text{M}$), PM ($4 \mu\text{M}$), complexo Hb + PM ($4 \mu\text{M}$), Condição: pH 7,4 (Fosfato de sódio 10 mM e 100 mM NaCl).



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Ademais, investigamos os impactos do PM na estrutura da Hb pura. Para avaliar possíveis deformações no anel protoporfirínico do grupo heme da Hb na presença do PM, a análise de banda de Soret foi monitorada empregando concentrações de 1, 10 e 25 μM (**Figura 11 B- C**). A banda de Soret corresponde à absorção na região do visível pelo grupo heme na Hb, essa estratégia é utilizada para estudar a ligação do oxigênio e outras moléculas ao grupo heme (SEKYONDA et al., 2024).

Figura 11 B e C: Perfil espectral UV-Vis de amostras Hb a 15,4 μM incubadas com concentrações de 1 - 25 μM de PM. (B) Gráfico representativo, as linhas representam a Hb. (C) Quantificação da estrutura da hemoglobina. Média $\pm$ EP, $n = 3$, $p < 0,05$ usando ANOVA one-way e pós-teste de Tukey, respectivamente.



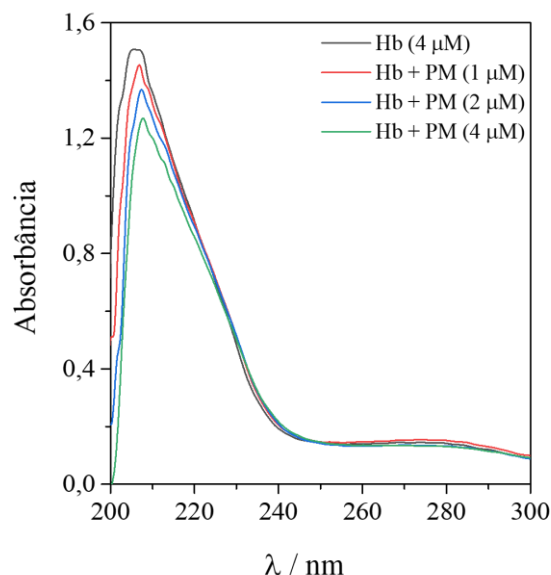
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

A observação de uma diminuição na intensidade da banda de Soret (350 – 550 nm) nas concentrações de 10 e 25 μM , sugere que a ligação do PM provoca alterações significativas na planaridade e na transição eletrônica π - π^* do anel da porfirina, impactando a capacidade da Hb de se ligar ao oxigênio e transportá-lo eficientemente para os tecidos.

Este efeito é consistente com estudos prévios de Chatterjee & Kumar (2016), que demonstraram que a interação de diversas substâncias com a Hb humana pode modificar suas propriedades estruturais e funcionais, comprometendo sua eficácia no transporte de oxigênio (SILVA, et al., 2020). Considerando essas modificações, buscamos investigar o mecanismo de interação da Hb e o PM, particularmente explorando os grupos tióis livres no bloqueio dessa interação.

Analizamos também por espectroscopia UV-vis alterações na conformação da Hb. (**Figura 12**). A faixa de 200 a 250 nm está associada a cadeia polipeptídica e a estrutura secundária da Hb.

Figura 12: Resultados obtidos por espectroscopia no UV-vis. Espectros de absorção da hemoglobina (4 μM), PM (2 μM), complexo Hb + PM (1 μM), complexo Hb + PM (2 μM) e complexo Hb + PM (4 μM). Condição: pH 7,4 (Fosfato de sódio 10 mM e 100 mM NaCl).



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

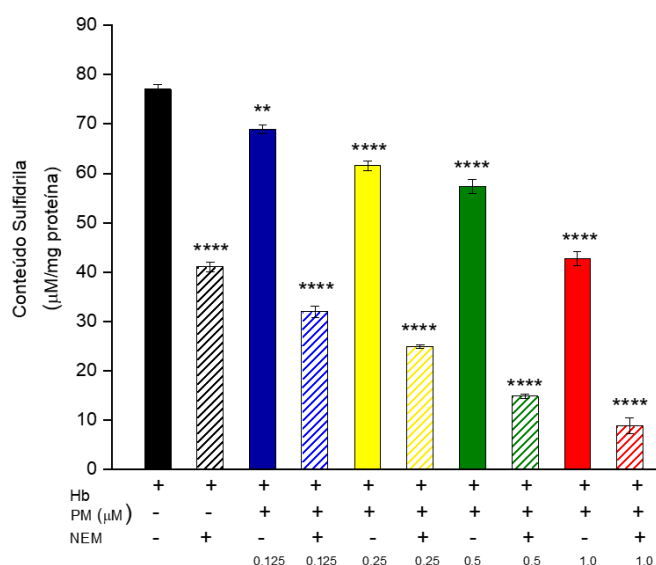
Verificamos que há uma diminuição na intensidade de absorbância nos sistemas Hb + PM (1, 2 e 4 μM), demonstrando alteração conformacional das cadeias polipeptídicas na estrutura secundária da Hb, podendo afetar diversas funções, entre elas, especialmente a capacidade de transporte de oxigênio.

6.3 Determinação de grupos tióis livres na hemoglobina humana

Nesta abordagem, procuramos investigar a afinidade do PM na Hb por meio dos resíduos de cisteínas reduzidos (**Figura 13**), para isso utilizamos o ensaio espectrofotométrico de Ellman, que se baseia-se na reação entre 5,5'-bis-ditionitrobenzoico (DTNB) e o grupo tiol livre levando à formação do ácido tionitrobenzóico (412 nm). No entanto, para este ensaio verificou-se interferência espectral devido a absorção da banda de Soret da hemoglobina (406 nm). Assim, de forma alternativa se empregou o ácido 6,6'-ditiodinicotínico (DTNB) como sonda espectrofotométrica (344 nm).

No contexto desses experimentos, o *N*-etilmaleimida (NEM) foi utilizado como um agente de controle, pois é um bloqueador de grupo tiol. É importante destacar que as amostras de Hb comercial tratadas com PM e com NEM, foram incubadas por um período de 5 h. Posteriormente, o teor de grupos tíóis livres foi determinado tanto na presença quanto na ausência de adição de NEM e PM (SALES et al., 2022).

Figura 13: Conteúdo de tiol da Hb a na presença de PM. Quantificação de grupos tiol reduzidos da Hb incubados por 5 h com PM (0,125 – 1,0 μ M), na presença e na ausência de NEM, $n = 3$ respectivamente. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média $\pm$ EP, usando ANOVA one-way e Tukey como pós-teste, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

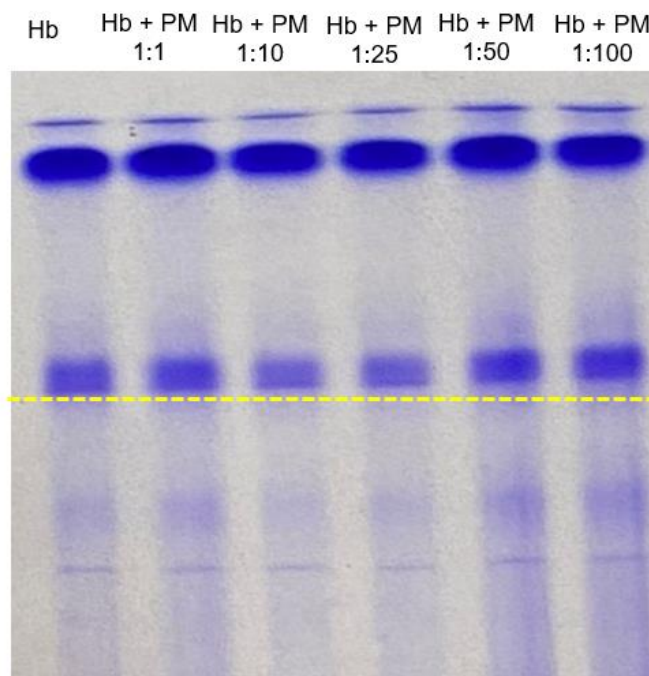
Como observado, o NEM reage com os grupos sulfidríla presentes na Hb (**Figura 13**), formando ligações covalentes irreversíveis e, conseqüentemente, bloqueando esses grupos. Assim, quando a Hb foi tratada com NEM, houve uma diminuição do sinal analítico, indicando que não estava ocorrendo reação com o DTNA (**Figura 13**). Esse efeito ocorre porque o DTNA depende da integridade dos grupos sulfidrílas na Hb. A reação com NEM bloqueia esses grupos tíóis, como confirmado experimentalmente. Em sistemas onde o bloqueador de tiol (NEM) estava presente, as concentrações médias foram reduzidas, similarmente

ao observado nos sistemas Hb + PM onde observou-se uma maior diminuição com o aumento da concentração do PM.

6.4 Avaliação do perfil de migração eletroforética da Hb

Com o objetivo de investigar possíveis alterações no perfil de migração eletroforética da Hb na presença de PM, realizamos a eletroforese utilizando gel de poliacrilamida na forma nativa (Native-PAGE), conforme ilustrado na **Figura 14**. A técnica de eletroforese é amplamente utilizada para a separação de moléculas com base em sua carga elétrica e tamanho, aproveitando a ação de um campo elétrico em um gel ou meio similar. Esse método é particularmente popular na análise de proteínas, destacando-se por sua alta eficiência e pelo baixo custo dos reagentes e amostras envolvidas (HAJBA; GUTTMAN, 2017).

Figura 14: Efeito da adição de incrementos crescentes de PM à hemoglobina na mobilidade eletroforética por Native-PAGE.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Conforme observado na **Figura 14**, ocorreu uma redução na mobilidade eletroforética da Hb com a adição de quantidades crescentes de PM, em

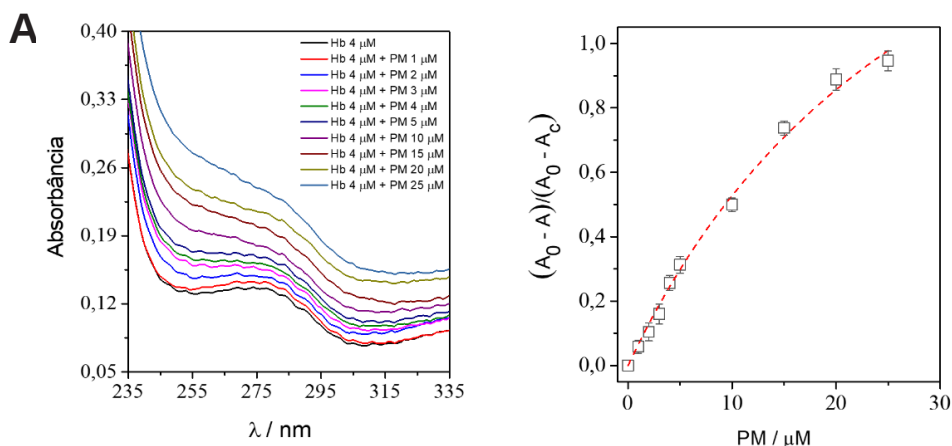
comparação com a Hb pura (controle). Essa diminuição na mobilidade pode ser explicada pela interação do PM com a Hb, tornando a proteína mais aniônica e aumentando sua massa molecular, devido à formação de um complexo supramolecular. Como resultado, as bandas de HB apresentaram um deslocamento mais lento no gel, indicando um possível aumento no tamanho/massa e carga da proteína devido à ligação com o PM. Esses resultados sugerem que o PM consegue alterar significativamente as propriedades da Hb, afetando seu comportamento eletroforético, o que contribui para o comprometimento de sua funcionalidade.

Assim, os efeitos observados resultantes das alterações estruturais na Hb, evidenciadas pela diminuição na intensidade da banda de Soret e nos ensaios espectrofotométricos, indicam que o PM impacta diretamente na conformação e mobilidade dessa proteína. Esses resultados confirmam as observações anteriores de que a interação entre o PM e a Hb altera sua estrutura, comprometendo suas funções. A partir disso, é necessário prosseguir com investigações experimentais.

6.5 Ensaios biofísicos com Hb humana

Para os ensaios biofísicos com a Hb humana, realizamos inicialmente titulações espectrofluorimétricas da Hb com o PM (com incubação prévia de 30 min), a fim de determinar os parâmetros de ligação e termodinâmicos da interação Hb-PM por espectrofotometria.

Figura 15: Parâmetros de ligação e termodinâmicos da interação Hb-PM por espectrofotometria. (A) Curva de titulação da Hb com incrementos crescentes de PM (1 - 25 μM); (B) Regressão não linear para calcular a constante de dissociação. Condição: pH 7,4 (Fosfato de sódio 10 mM e 100 mM NaCl).



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Para avaliar a magnitude da interação macromolécula-ligante, a constante de ligação (K_b) foi calculada (**equação 5**) a partir da constante de dissociação (K_d). K_b determina a afinidade da ligação entre a Hb e o PM.

Equação 5: Constante para avaliar a interação entre o ligante (PM) e a proteína (Hb). K_d : Constante de dissociação. K_b : Constante de ligação.

$$\left(\frac{A_0 - A}{A_0 - A_c} \right) = \frac{[Hb]_t + [PM]_a + K_d - \sqrt{([Hb]_t + [PM]_a + K_d)^2 - 4 \times [Hb]_t \times [PM]_a}}{2 \times [Hb]_t}$$

$$K_b = \left(\frac{1}{K_d} \right) \quad \begin{array}{l} K_d = 68 \pm 11 \text{ M} \\ K_b = 1,47(\pm 0.22) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \end{array}$$

Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

A K_b é fundamental para analisar a estabilidade do complexo formado e sobre os mecanismos de interação molecular. Esse parâmetro foi obtido a partir das variações na intensidade de absorbância durante as titulações (**Figura 15**

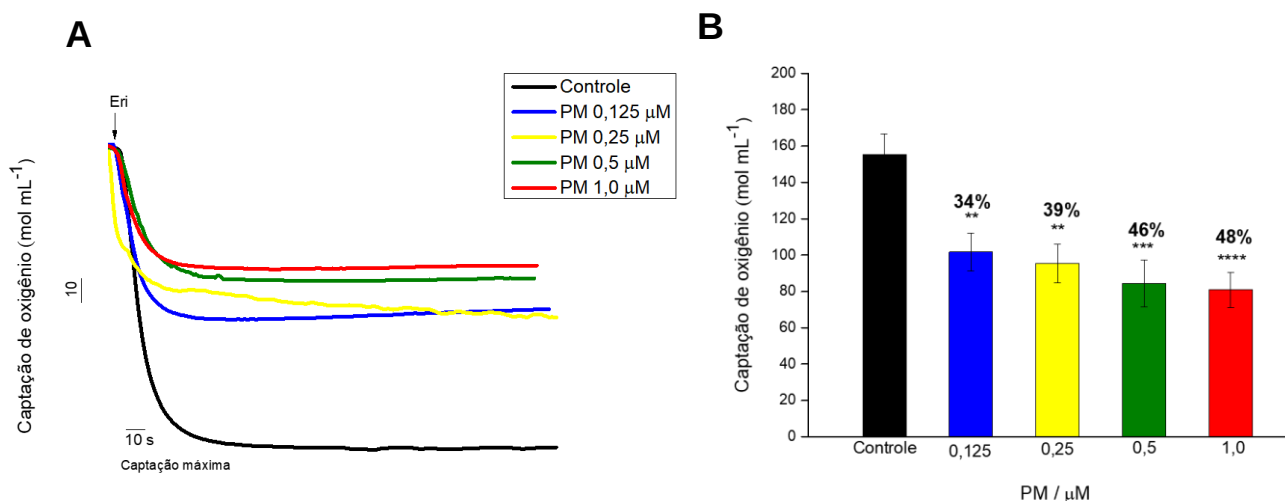
A), utilizando os dados experimentais para construir uma curva de ligação e, a partir dela, calcular o K_b . A interpretação desse valor pode fornecer informações sobre a eficácia das interações entre a Hb e o PM. O valor de K_b indica uma alta afinidade, uma interação forte entre a Hb e o PM, ou seja, a Hb tende a se ligar com mais facilidade ao ligante formando o complexo.

6.6 Análise da função da hemoglobina presente nos eritrócitos humanos

Os experimentos realizados com Hb humana evidenciaram que o PM provocou alterações significativas no anel porfirínico da proteína, comprometendo possivelmente sua capacidade de transporte de oxigênio. Além disso, a interação do PM com os grupos tíóis das cisteínas, confirmada pelos ensaios com DTNA, reforça o impacto químico direto do composto na estabilidade estrutural da proteína. As simulações de *docking molecular* mostrando a Cys-93 como o provável sítio de ligação, enquanto os ensaios de eletroforese revelaram alterações no perfil de mobilidade da Hb, indicando aumento na massa molecular e modificação de sua carga. Com base nesses resultados, avançamos para experimentos nos eritrócitos, um modelo experimental mais complexo que contém concentrações elevadas de Hb em seu interior, permitindo uma análise mais representativa e concreta dos efeitos do PM no sistema biológico.

Sendo assim, avaliamos a funcionalidade da Hb, ou seja, o transporte de oxigênio. A captação de oxigênio em eritrócitos foi medida utilizando um eletrodo específico para oxigênio. É possível observar, neste experimento, que os grupos expostos a concentrações de 0,125 – 1,0 μM de PM tiveram uma diminuição na captação de oxigênio em relação ao grupo controle, esse comportamento é dose-dependente da concentração como observado (**Figura 16 A e B**).

Figura 16: Eritrócitos humanos expostos ao PM apresentam baixa capacidade de captação de oxigênio. (A) Gráfico representativo da captação de oxigênio pelos eritrócitos humanos (Ery). (B) Quantificação da captação de oxigênio durante 10 s. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média $\pm$ erro padrão, $n=6$, $p<0,05$ usando ANOVA one-way e Tukey como pós-teste respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Como observado na **Figura 16 A e B**, verifica-se uma diminuição de captação de oxigênio de 34% na concentração de 0,125 μM , 39% na concentração de 0,25 μM , 46% na concentração de 0,5 μM e 48% na concentração de 1,0 μM quando comparado com o controle, demonstrando uma diminuição no transporte de oxigênio realizado pela Hb após à exposição ao PM.

Os efeitos deletérios dos compostos de mercúrio são amplamente justificados pela sua notável afinidade pelos grupos sulfidrilas ou tióis, abundantemente presentes em diversas biomoléculas, tais como peptídeos e proteínas, incluindo a Hb. Essa afinidade resulta em modificações estruturais significativas, as quais frequentemente desencadeiam alterações profundas na atividade biológica dessas moléculas, que são fundamentais em diversos processos no organismo. Essas perturbações moleculares podem impactar não apenas a função específica da Hb, mas também afetar vias de sinalização essenciais para a homeostase celular e a saúde do organismo como um todo (MAGALHÃES et al., 2020; RALSTON et. al., 2018).

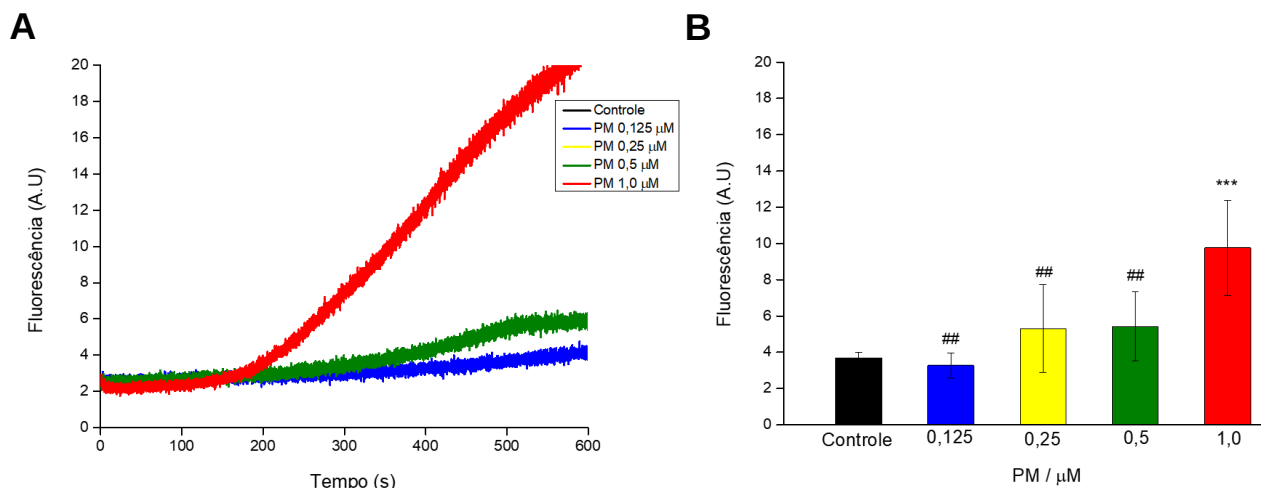
Ao observar uma diminuição na funcionalidade dos eritrócitos humanos expostos ao PM, seguimos analisando se esse organomercurial estaria provocando estresse oxidativo por meio do aumento da produção de EROs.

6.7 Produção de espécies reativas globais

O mercúrio e seus derivados podem aumentar a produção EROs por meio de vários mecanismos que envolvem interações com componentes celulares, levando a um desequilíbrio redox. Entre essas espécies estão O_2^- , o H_2O_2 uma espécie não radicalar entre outros, ambos podem gerar o radical hidroxila ($HO^\bullet$), na presença de ferro pela reação de Fenton, que é altamente reativo e apesar de desempenhar funções fundamentais em concentrações ditas fisiológicas, apresenta efeitos deletérios sobre os componentes celulares em altas concentrações (BARBOSA et al., 2010).

Estudos indicam que as espécies de mercúrio podem aumentar a produção de EROs em sistemas biológicos (AHMAD et al., 2019). Para quantificar a produção EROs, de forma não específica, utilizou-se $H_2DCF-DA$, na presença de PM em concentrações de 0,125 – 1,0 μM . Foi observado um aumento de mais de 100% na produção dos EROs, principalmente na concentração de 1,0 μM como observado (**Figura 17 A e B**).

Figura 17: A exposição de PM em eritrócitos humanos aumenta a produção EROs, em concentrações de 0,125 - 1,0 μM . (A) Gráfico representativo da geração de EROs usando o probe $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. (B) Quantificação da intensidade de fluorescência de $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média $\pm$ erro padrão, $n=6$, $p<0,05$ usando ANOVA one-way e Tukey como pós-teste respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

A sonda DCF é eficaz na identificação de EROs em estudos biológicos e químicos. Entre as principais EROs detectadas por essa sonda estão $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\text{OH}^\bullet$. Essas espécies são cruciais indicadores de estresse oxidativo celular. Esse aumento nos EROs comprometem as defesas antioxidantes do nosso organismo, resultando no estresse oxidativo e desequilíbrio no sistema antioxidante.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, causado pela produção excessiva de EROs e ERNs (HALLIWELLAND & GUTTERIDGE, 2007). Esse desequilíbrio pode levar à oxidação de biomoléculas, incluindo lipídeos, proteínas e DNA, resultando na perda de funções biológicas essenciais e no desequilíbrio homeostático (ERCAL et al., 2001 & RIBEIRO et al., 2015).

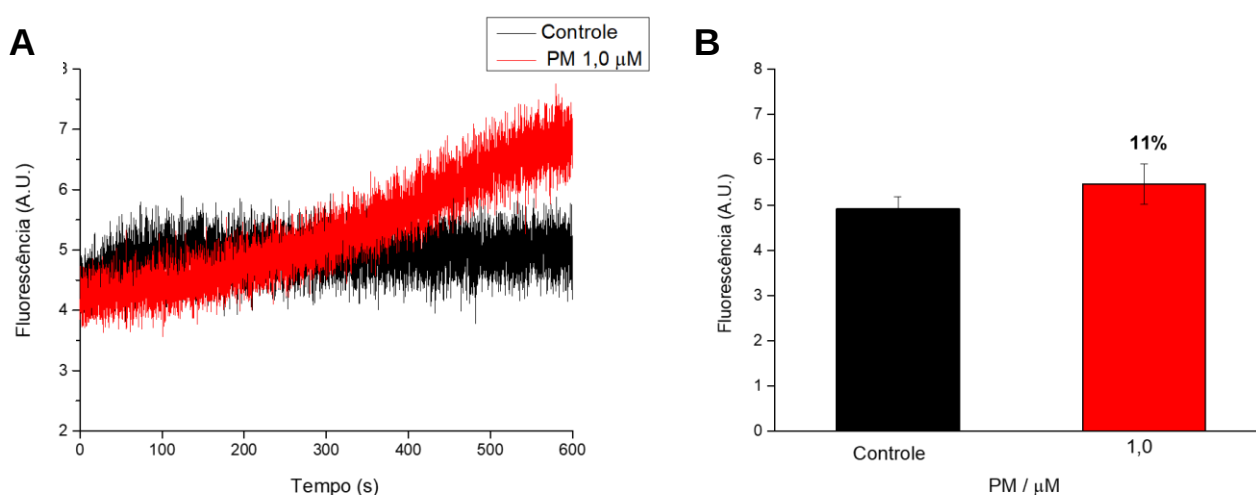
Dessa forma, com o objetivo de identificar as EROs geradas durante o processo de estresse oxidativo, utilizamos sondas específicas para detectar e quantificar essas moléculas.

6.8 Geração de Peróxido de Hidrogênio

A geração de peróxido de H_2O_2 foi observada pela sonda Amplex-Red. Embora o aumento de 11% de H_2O_2 em relação ao controle na concentração de $1,0 \mu\text{M}$ PM não tenha diferença estatística, os dados sugerem uma tendência na elevação das EROs (**Figura 18**). Isso está de acordo com estudos que indicam que os valores de mercúrio, como o cloreto de mercúrio, podem induzir ao aumento de H_2O_2 em eritrócitos. O H_2O_2 gerado em excesso pode comprometer a integridade celular, causando danos oxidativos e, em níveis elevados, levando à proteólise nos eritrócitos, como também uma diminuição na capacidade antioxidante.

Esse quadro pode ser observado também com o PM, indicando que o aumento do H_2O_2 , pode comprometer os componentes celulares, aumentando sua fragilidade e comprometendo sua funcionalidade (GIULIVI & DAVIES, 2001).

Figura 18: A exposição ao fenilmercúrio aumenta a produção de peróxido de hidrogênio em Ery humanos. (A) Gráfico representativo da produção de H_2O_2 . (B) Quantificação da geração de H_2O_2 . Média $\pm$ EP, $n = 4$, $p < 0,05$ usando teste t de Student para amostras independentes.



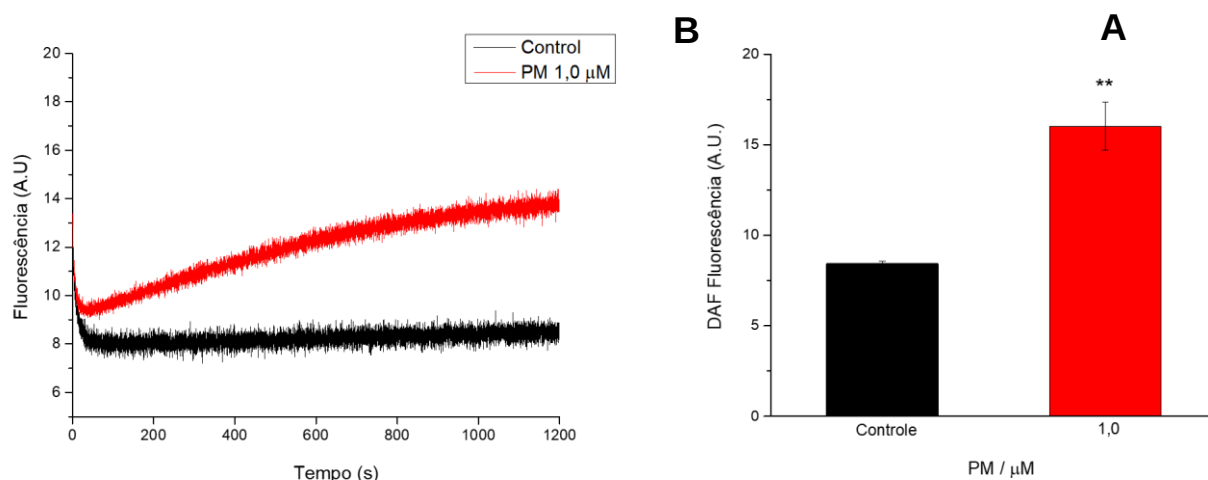
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

O H_2O_2 em concentrações adequadas tem como função ser um sinalizador celular, modulando a atividade de diversas proteínas e enzimas, por outro lado quando se tem uma produção excessiva dessa molécula sinalizadora, o sistema antioxidante celular pode ser comprometido, levando ao estresse oxidativo, que está associado ao início e progressão de diversas doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatórias, entre outras. (VEAL, 2017).

6.9 Produção de Óxido Nítrico

Como foi observado que o PM ocasionou um aumento na produção global de EROs pela sonda $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ a qual se liga dentre outras espécies ao NO_3^- . Notamos a necessidade de investigar a produção da principal espécie reativa de nitrogênio, o NO. Tal espécie foi determinada com o auxílio da sonda fluorescente DAF-FM. A produção desta espécie aumentou em 90% nos eritrócitos expostos à concentração de $1,0 \mu\text{M}$ de PM (**Figura 19 A e B**).

Figura 19: A exposição ao fenilmercúrio em eritrócitos humanos gera a produção aumentada de óxido nítrico. (A) Gráfico representativo da geração de óxido nítrico. (B) Quantificação da intensidade de fluorescência da geração de NO. Média $\pm$ EP, $n=5$, $p < 0,05$ usando teste t de Student para amostras independentes.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

O NO desempenha papel importante com neurotransmissor e como um mediador de vários processos fisiológicos, incluindo a regulação do fluxo sanguíneo, a defesa imunológica e a comunicação entre células. Dessa forma o óxido nítrico é uma molécula essencial a manutenção do sistema nervoso. (AHMAD & MAHMOOD, 2019).

Nos eritrócitos pode haver tantas fontes de EROs como também ERNs. A oxidação do íon ferroso para a forma férrica, na conversão da hemoglobina em methemoglobina, libera um elétron que pode ser absorvido pelo oxigênio molecular, originando os radicais superóxidos. Os radicais superóxidos podem reagir com NO, formando o radical peroxinitrito (PRYOR & SQUADRITO, 1995) ou podem ser convertidos em H_2O_2 .

Através das reações de Haber-Weiss e Fenton, o H_2O_2 interage com radicais livres de ferro ou superóxidos, gerando a radical hidroxila, que é altamente reativo e prejudicial. Sua extrema reatividade causa danos severos aos componentes celulares. O aumento na produção de ERNs nas células danifica os eritrócitos, resultando em uma diminuição na capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos (AHMAD & MAHMOOD, 2019).

O mercúrio um elemento que é amplamente associado ao desenvolvimento de diversas patologias. Estudos mostram que a exposição ao cloreto de mercúrio aumenta significativamente a geração de NO em modelos animais, incluindo ratos espontaneamente hipertensos (SHRs). Altos níveis de NO pode resultar em danos oxidativos a proteínas, lipídios e DNA. Além disso, o excesso de NO pode alterar a sinalização celular, prejudicar a função endotelial e contribuir para disfunções cardiovasculares, e o desenvolvimento de doenças inflamatórias (FARDIN et al; 2020).

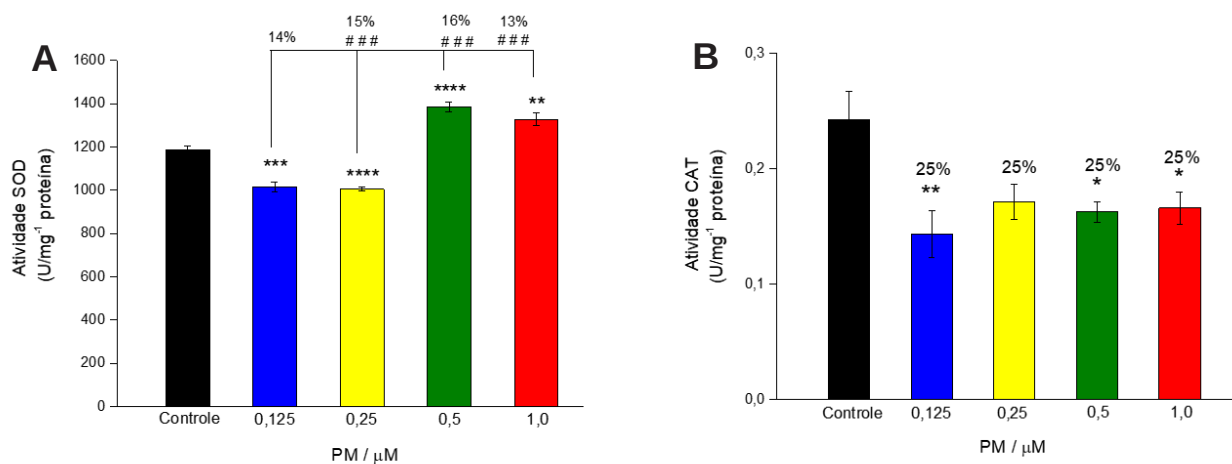
6.10 Atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e da glutathione peroxidase (GPx)

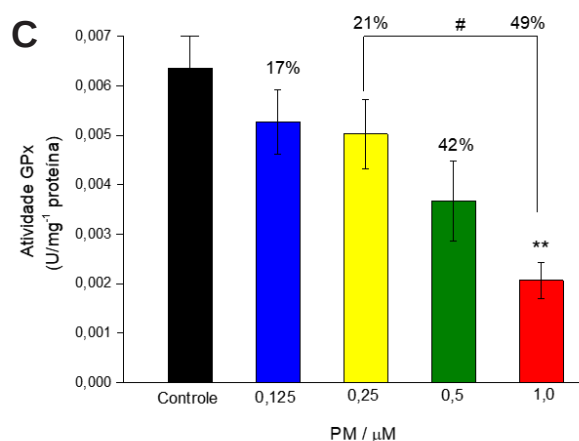
Para compreender como os eritrócitos respondem no sistema redox à exposição a contaminantes como o PM, investigamos a atividade das enzimas antioxidantes: A SOD, CAT e a GPx. A SOD desempenha papel crucial ao catalisar a conversão do radical superóxido em H_2O_2 .

Enquanto a CAT é responsável por converter o H_2O_2 em H_2O e oxigênio O_2 , a GPx também catalisa a conversão de H_2O_2 H_2O . Essas enzimas são componentes fundamentais do sistema de defesa antioxidante, ajudando a neutralizar os efeitos danosos dos radicais livres gerados durante a exposição a agentes tóxicos, como o mercúrio e seus derivados.

Ao avaliar a atividade da enzima SOD, foi observado um aumento significativo em resposta à exposição ao PM. Na concentração de 0,5 μM , a atividade da SOD aumentou em 16%, enquanto na concentração de 1,0 μM o aumento foi de 13% (**Figura 20 A**). A SOD é uma enzima indutível, cuja atividade tende a aumentar na presença de níveis elevados de EROs, atuando como um mecanismo adaptativo ao estresse oxidativo induzido pelo PM. Esse aumento reflete uma resposta celular compensatória para minimizar os danos causados pelo acúmulo de EROs (ERCAL et al., 2001; CALGAROTO et al., 2010).

Figura 20: Exposição do PM em concentrações de 0,125 – 1,0 μM modifica o sistema antioxidante dos eritrócitos humanos expostos ao PM. (A) Atividade de superóxido dismutase (SOD), (B) Atividade da catalase (CAT), (C) Atividade da glutathiona peroxidase (GPx). Os experimentos foram realizados em duplicata. Média $\pm$ Erro Padrão, $n=5$ (controle) e $n=5$ (expostos), usando ANOVA one-way e Tukey como pós-teste, respectivamente.





Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Ao analisar a atividade das enzimas CAT e GPx, foi observada uma diminuição significativa nos eritrócitos expostos ao PM (**Figura 20 B e C**). A atividade da CAT apresentou uma redução consistente de 25% em todas as concentrações avaliadas, o que pode ser atribuído ao aumento do peróxido de hidrogênio como visto anteriormente. O excesso de H₂O₂ gera um ambiente oxidativo que pode levar à alteração estrutural da catalase, prejudicando sua função. Já a GPx mostrou um padrão de redução mais acentuada, com diminuições de 17% na concentração de 0,125 μM, 21% em 0,25 μM, 42% em 0,5 μM e 49% em 1,0 μM de PM em comparação ao grupo controle.

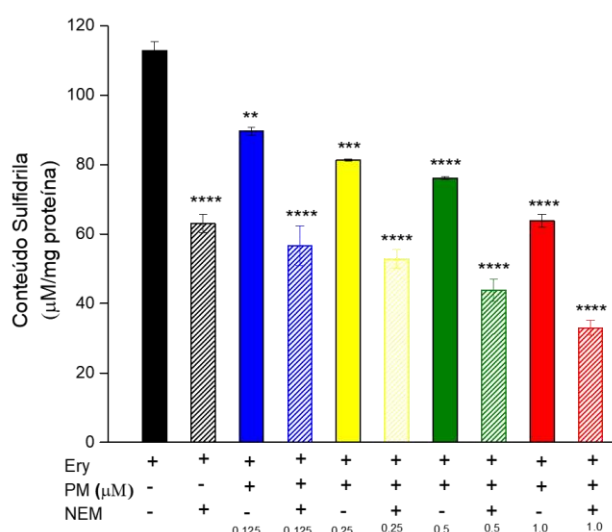
Estudos na literatura mostraram, que tal resultado pode estar relacionado a questão de que o mercúrio pode ser ligar ao selênio, em enzimas dependentes do mesmo como a GPx, formando complexos que podem comprometer a atividade destas enzimas. Além disso, o selênio pode competir com grupos tiol pela ligação ao mercúrio, neutralizando parcialmente seus efeitos tóxicos. A redução na atividade da GPx também pode estar associada a uma queda nos níveis intracelulares de GSH, uma molécula essencial para a função dessa enzima (SPILLER, 2018 & BARCELOS et al., 2011 & GROTTTO et al., 2009).

6.11 Determinação de grupos tióis livres totais nos eritrócitos humanos

Prosseguindo na investigação do efeito do PM nos eritrócitos, investigamos a afinidade do PM nos eritrócitos humanos por meio dos resíduos

de cisteínas reduzidos (**Figura 20**). O mesmo ensaio foi empregado anteriormente para Hb humana. As amostras de eritrócitos foram tratadas com PM e com NEM, e foram incubadas por um período de 5 h. Posteriormente, o teor de grupos tióis livres foi determinado tanto na presença quanto na ausência de adição de NEM e PM (SALES et al., 2022).

Figura 21: Conteúdo de tiol de eritrócitos humanos na presença de PM. Quantificação de grupos tiol reduzidos incubados por 5 horas com PM (0,125 – 1,0 μ M), incubados na presença e na ausência de NEM, n=3 respectivamente. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média $\pm$ Erro Padrão, usando ANOVA one-way e Tukey como pós-teste, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Como visto anteriormente, o NEM reage com os grupos sulfidril presentes nos eritrócitos (**Figura 21**), formando ligações covalentes irreversíveis e, conseqüentemente, bloqueando esses grupos. Assim, quando os eritrócitos foram tratados com NEM, houve uma diminuição do sinal analítico, indicando que não estava ocorrendo reação com o DTNA (**Figura 21**). Esse efeito ocorre porque o DTNA depende da integridade dos grupos sulfidrilas. A reação com NEM bloqueia esses grupos tióis, como confirmado experimentalmente. Em sistemas onde o bloqueador de tiol (NEM) estava presente, as concentrações médias foram reduzidas, similarmente ao observado nos sistemas eritrócitos +

PM onde observou-se uma maior diminuição com o aumento da concentração do PM.

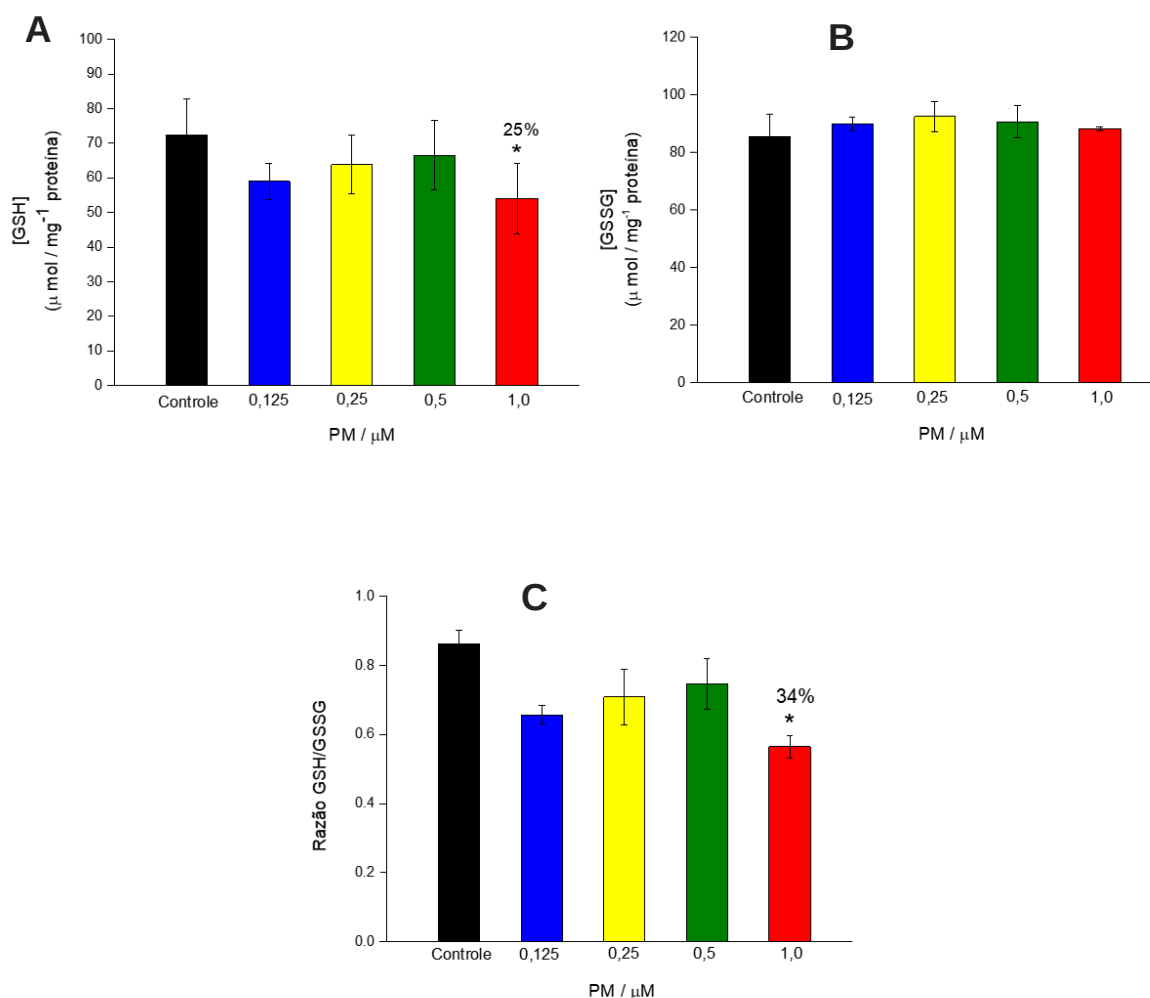
6.12 Quantificação da relação GSH/GSSG

É reconhecido que o sistema de glutathione desempenha um papel crucial na defesa antioxidante, incluindo o tripéptido GSH, devido às suas propriedades nucleofílicas (FARINA et al., 2011). Observou-se uma redução de 25% no teor de GSH com a concentração de 1,0 μM de PM em comparação com o controle. Essa diminuição resultou em uma redução no estado redox celular, conforme indicado pela quantificação do GSH (**Figura 22 A**).

Essa diminuição na relação GSH/GSSG (**Figura 22 C**) pode aumentar a susceptibilidade ao dano oxidativo devido ao aumento EROs com diminuição de um dos componentes redox. Além de atuar como antioxidante não enzimático, o GSH também participa da atividade de várias enzimas antioxidantes.

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). O GSSG é a forma oxidada da glutathione, e sua relação com o GSH é essencial para manter o equilíbrio redox intracelular. Quando há um desequilíbrio nessa relação, como a diminuição de GSH que foi observada, pode ocorrer um aumento no estresse oxidativo e a susceptibilidade a danos celulares (AHAMED & SIDDIQUI, 2007, CHEN E OUTROS, 2005).

Figura 22: Exposição do PM em concentrações de 0,125 – 1,0 μM modifica a relação do sistema GSH/GSSG dos eritrócitos humanos expostos em comparação com o controle. (A) Atividade da Glutathiona Reduzida (GSH), (B) Atividade da Glutathiona Oxidada e (C) Razão entre GSH/GSSG. Os experimentos foram realizados em duplicata. Média $\pm$ Erro Padrão, $n=5$ (controle) e $n=5$ (expostos), usando ANOVA one-way e Tukey como pós-teste, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

6.13 Peroxidação Lipídica

O estresse oxidativo também pode ser avaliado pela quantificação de marcadores de danos biomoleculares, como a peroxidação lipídica. Esse processo é caracterizado como uma reação em cadeia na qual um radical livre

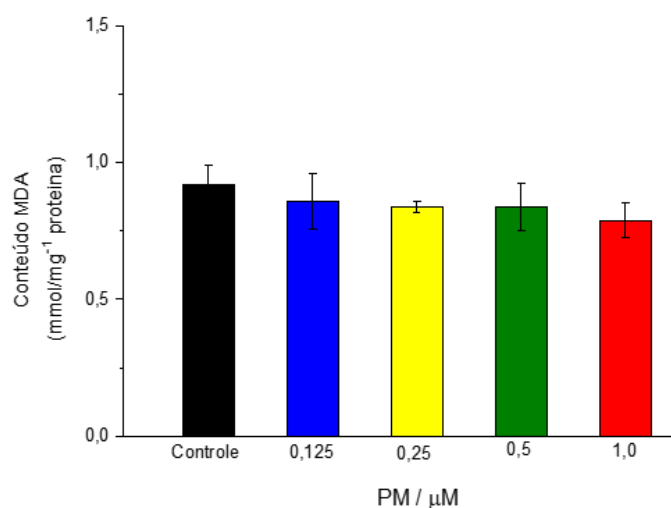
retira um elétron de um lipídio, formando um radical de ácido graxo. Esse radical reage com outros ácidos graxos, gerando peróxidos lipídicos (MARTINS et al., 2022).

Diante disso, investigamos também a formação de malondialdeído (MDA), um dos principais produtos da peroxidação lipídica. O MDA é um aldeído altamente reativo, formado durante esse processo, e sua quantificação é amplamente utilizada como indicador do grau de dano oxidativo aos lipídios celulares e às membranas. Níveis elevados de MDA estão associados a diversas condições patológicas, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatórias.

A exposição de eritrócitos humanos ao PM em diferentes concentrações foi analisada para avaliar seu impacto no estresse oxidativo. Curiosamente, os níveis de MDA, marcador clássico de dano lipídico, não apresentaram alterações significativas após a exposição ao PM. Esses resultados indicam que, nas condições experimentais empregadas, o PM não foi capaz de induzir peroxidação lipídica detectável nos eritrócitos (**Figura 23**).

Experimentos realizados em camundongos *Swiss* demonstraram que a exposição ao cloreto de mercúrio (160 mg/L) na água de beber por um período de 72 horas resultou em um aumento significativo nos níveis de MDA, um marcador bem estabelecido de estresse oxidativo e peroxidação lipídica. Esse aumento indica que o mercúrio induz danos oxidativos às membranas celulares, promovendo a degradação de lipídios e comprometendo a integridade celular (ZHAO & COLS, 2021).

Figura 23: Ausência efeito na produção de MDA em eritrócitos humanos expostos à concentrações de 0,125 – 1,0 μM PM. Teor de malondialdeído. Os experimentos foram realizados em triplicata usando Média $\pm$ Erro Padrão, $n=5$ (controle) e $n=5$ (expostos), usando ANOVA one-way e Tukey como pós-teste, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

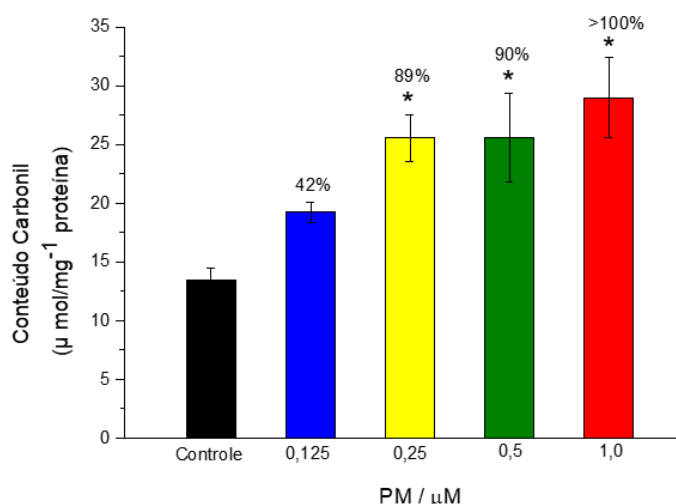
Pesquisas realizadas por Filho-Silva e colaboradores (2021) demonstraram que a exposição ao mercúrio induz aumento na peroxidação lipídica em pescadores expostos à mercúrio, especificamente, o nível MDA, um marcador de estresse oxidativo e dano lipídico, apresentou um aumento superior a 100% em comparação ao grupo controle. Este aumento é indicativo de severos danos às biomoléculas, refletindo a intensa atividade oxidativa desencadeada pelo mercúrio. Entretanto, nos nossos achados investigando o efeito do PM na geração de MDA em eritrócitos humanos, não encontramos nenhuma diferença.

6.14 Produtos da Oxidação de Proteínas

Para investigar alterações induzidas pela exposição do PM em proteínas, frente ao estresse oxidativo, realizamos o ensaio de proteínas carboniladas, que pode ser desencadeada pelo aumento de EROs e ERNs, como visto nos resultados anteriores.

Como amplamente documentado na literatura científica, o estresse oxidativo está intimamente ligado à produção de aldeídos lipídicos reativos, os quais podem reagir de forma não enzimática com proteínas em um processo conhecido como carbonilação de proteínas. Esses aldeídos lipídicos podem ser regulados por mecanismos de defesa antioxidantes (CURTIS, et al; 2012).

Figura 24: Geração de proteínas carboniladas em eritrócitos humanos expostos em concentrações de 0,125 – 1,0 μM de PM. Os experimentos foram realizados em triplicata usando Média $\pm$ Erro Padrão, $n=5$ (controle) e $n=5$ (expostos), usando ANOVA one-way e Tukey como pós-teste, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

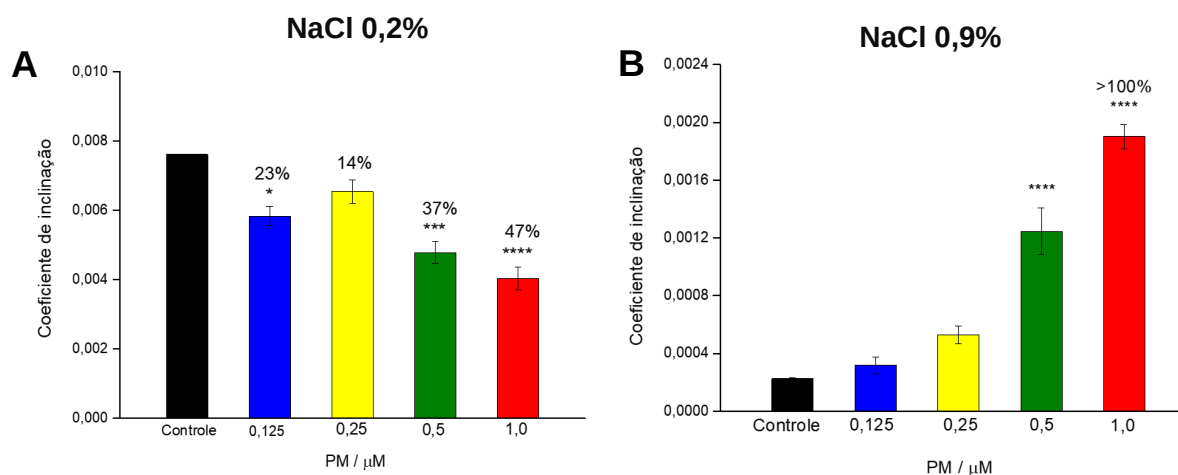
Em condições em que os mecanismos de defesa antioxidante estão comprometidos ou as condições oxidativas são exacerbadas, observa-se um aumento na carbonilação de proteínas, conforme ilustrado na (**Figura 24**). Os resultados revelaram aumento de 42% na concentração de 0,12 μM , 89% em 0,25 μM , 90% em 0,5 μM e mais de 100% em 1,0 μM , em comparação com o grupo controle. Esse aumento expressivo na carbonilação de proteínas está associado a diversos estados metabólicos, incluindo envelhecimento, perda muscular e resistência à insulina.

6.15 Fragilidade de membrana dos eritrócitos na presença do PM

O ensaio de fragilidade osmótica é um indicador direto de estresse oxidativo, este foi utilizado para testar a integridade da membrana dos eritrócitos através de alterações na fragilidade relacionadas a mudanças na densidade óptica em 540 nm, usando duas concentrações diferentes de cloreto de sódio (NaCl): uma isotônica (0,9%) e outra hipotônica (0,2%) (**Figura 25**).

Para tal experimento, as células eritrocitárias foram previamente incubadas com PM em concentrações de 0,125 a 1,0 μM à temperatura ambiente (28 °C). Cada condição (0,2% e 0,9% m/v) foi analisada ao longo de 3 minutos. Observou-se que a membrana dos eritrócitos foi comprometida pelo PM nas condições testadas, sugerindo que o PM é capaz de atravessar a membrana dos eritrócitos e causar danos.

Figura 25: Fragilidade na membrana dos eritrócitos humanos na presença de PM. (A) Meio hipotônico (NaCl 0,2% m/v, $p = 0,0097$), (B) Meio isotônico (NaCl 0,9% m/v, $p = 0,0024$). Média $\pm$ EP, $n = 3$, $p < 0,05$ usando ANOVA one-way e Tukey como pós-teste, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Quando os eritrócitos do grupo exposto ao PM foram incubados em meio hipotônico (NaCl 0,2% m/v), foram observadas alterações na densidade óptica (**Figura 25 A**), indicando uma redução na entrada de água nas células. No entanto, quando os eritrócitos do grupo exposto ao PM foram incubados em meio isotônico (NaCl 0,9% m/v), observou-se um aumento significativo na densidade

óptica (>100%). Isso sugere que as membranas dos eritrócitos no meio isotônico na presença do PM são mais frágeis em relação ao grupo controle, visto que as células incharam devido à maior entrada de água (**Figura 24 B**).

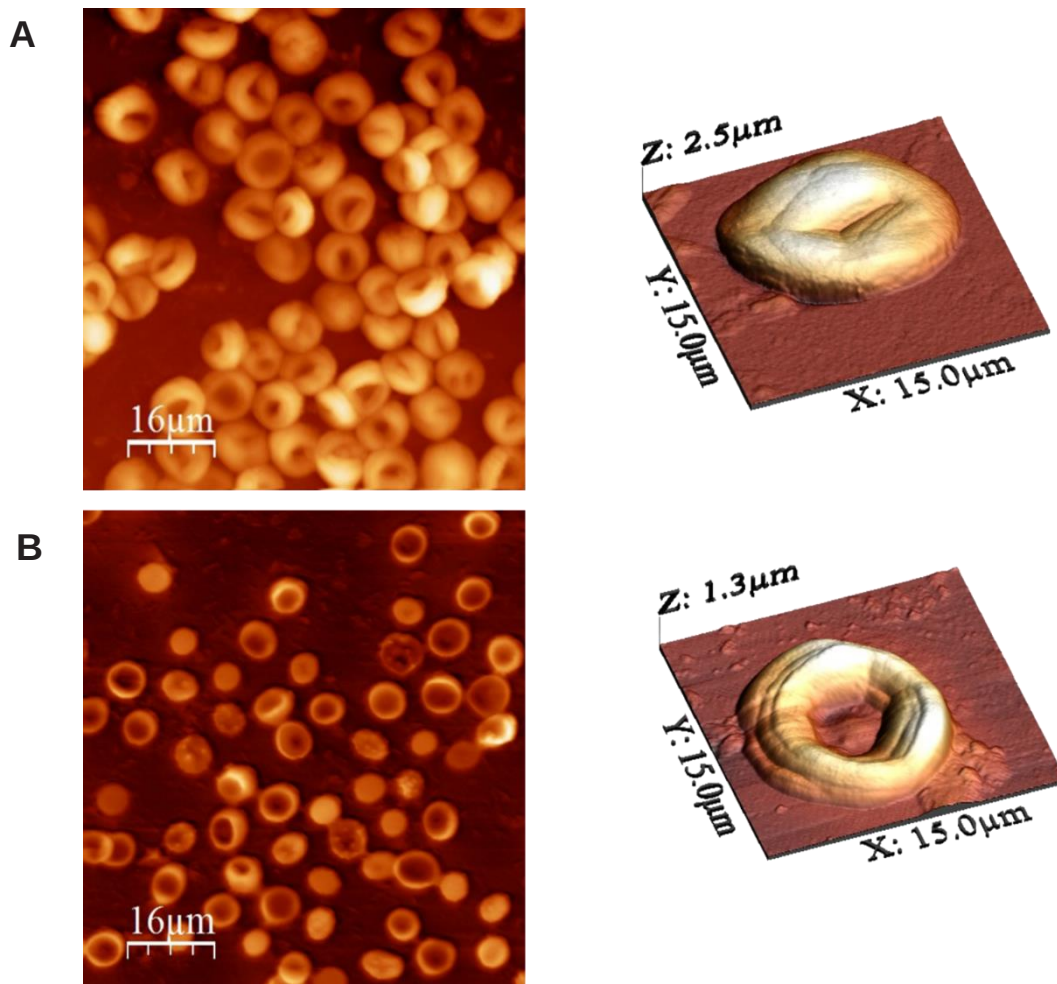
Esses danos às membranas eritrocitárias pela exposição ao PM podem resultar na fragilidade dessas células em decorrência do estresse oxidativo. Estudos realizados por Cheng e colaboradores (2018) evidenciaram que a fragilidade osmótica dos eritrócitos de ratos tratados com $AlCl_3$ resultou na destruição da integridade celular. Esse efeito foi observado pela diminuição da capacidade dos eritrócitos de se esticar e deformar, indicando comprometimento na elasticidade e estabilidade das membranas celulares.

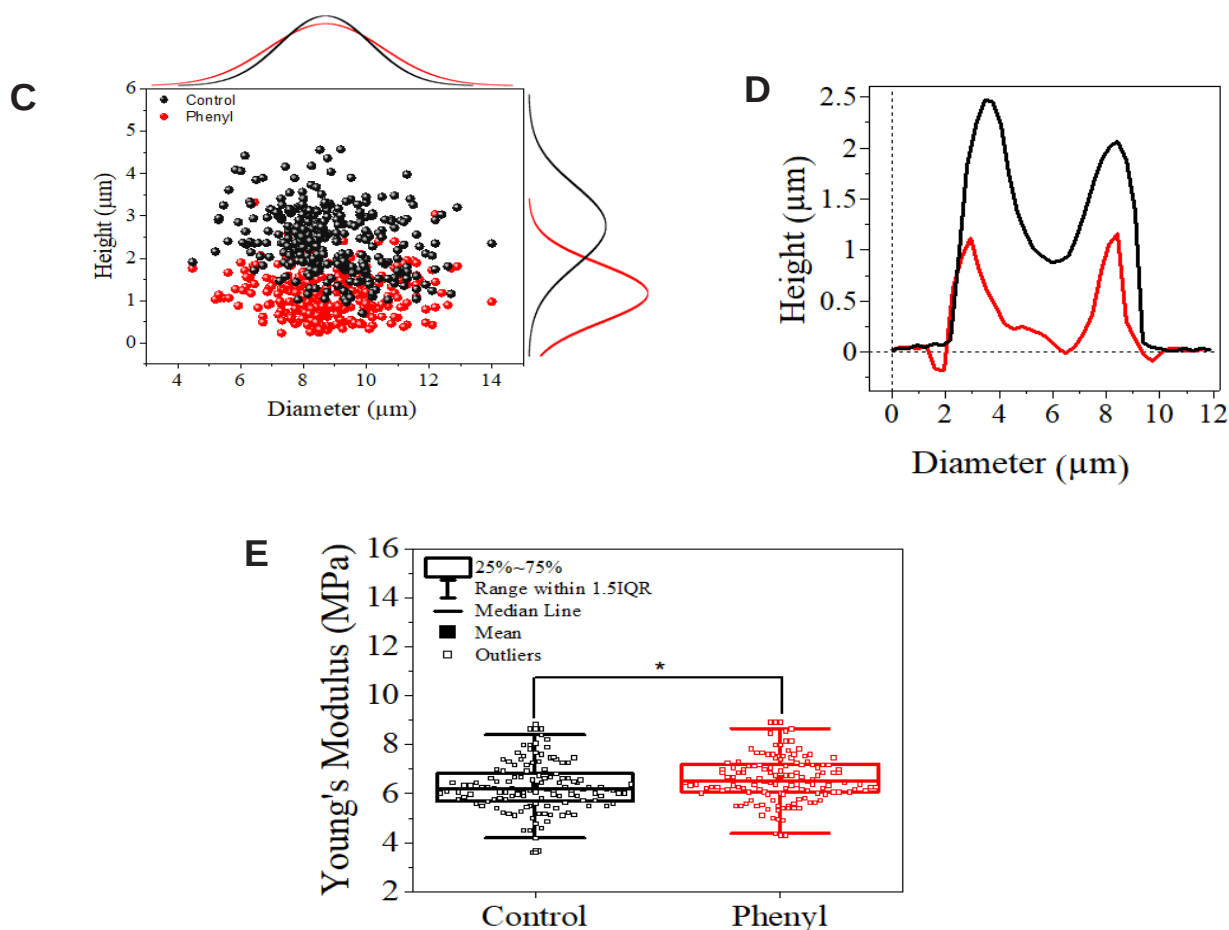
6.16 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para analisar os efeitos da exposição ao PM na morfologia dos eritrócitos humanos, utilizou-se a microscopia de força atômica (AFM). Esta técnica é uma ferramenta que permite a observação de características nanométricas e a avaliação das propriedades biomecânicas de amostras biológicas em alta resolução (Bozna et al., 2011 & Shi et al., 2013). O AFM é particularmente útil para estudos morfológicos e funcionais de células, pois fornece uma visualização detalhada da topografia celular.

As imagens topográficas dos eritrócitos do grupo controle e expostos ao PM foram realizadas para investigar as alterações estruturais das células em resposta ao organomercurial (**Figura 26 A e B**). O diâmetro e a altura das células foram medidos usando regressão linear (**Figuras 26 A-D**). Os valores médios do diâmetro dos eritrócitos dos grupos controle e PM, não mostraram diferença significativa, com médias de $8,81 \pm 1,25 \mu m$ e $8,81 \pm 1,59 \mu m$, respectivamente.

Figura 26: Experimento por microscopia de força atômica (AFM). Imagens de AFM dos eritrócitos (A) controle e (B) expostos ao PM (C) Distribuição das células em relação aos parâmetros de diâmetro e altura. (D) Perfil das células mostrando a relação entre diâmetro e altura e (E) Diagrama de caixa dos módulos de Young dos eritrócitos do grupo controle e do grupo exposto ao PM. Foi aplicado teste ANOVA one-way e comparada pelo teste Tukey ($p < 0,05$).





Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Em contrapartida, a altura das células apresentou uma diferença estatisticamente significativa, com uma média de $2,43 \pm 0,75 \mu\text{m}$ para o grupo controle e $1,17 \pm 0,54 \mu\text{m}$ para o grupo PM. Além disso, os histogramas de frequência versus diâmetro e frequência versus altura demonstraram ajustes a uma distribuição gaussiana (**Figura 26 C**). A análise morfológica indicou que a altura dos eritrócitos diminuiu aproximadamente 51,85% após a exposição ao PM em comparação com o grupo controle.

A análise de rigidez dos eritrócitos revelou uma diferença significativa entre os grupos controle e PM. O módulo elástico dos eritrócitos expostos PM aumentou em comparação com o grupo controle. Os valores médios do módulo elástico são $6,29 \pm 0,99 \text{ Mpa}$ para o grupo controle e $6,59 \pm 0,93 \text{ Mpa}$ para o grupo PM (**Figura 25 E**). Esses achados sugerem que à exposição ao PM

provoca alterações morfológicas e funcionais substanciais nos eritrócitos, que podem comprometer sua integridade estrutural e fisiológica

6.17 Ensaio de toxicidade em *Zebrafish* (Teratogênese)

Para avaliar os efeitos tóxicos do PM, conduzimos experimentos de toxicidade utilizando *Zebrafish* (*Danio rerio*), um modelo amplamente empregado em estudos toxicológicos devido à sua alta sensibilidade a compostos químicos e à praticidade na observação dos efeitos adversos (HE et al., 2014). A análise de toxicidade incluiu a avaliação de possíveis efeitos teratogênicos em embriões de *Zebrafish* expostos ao PM.

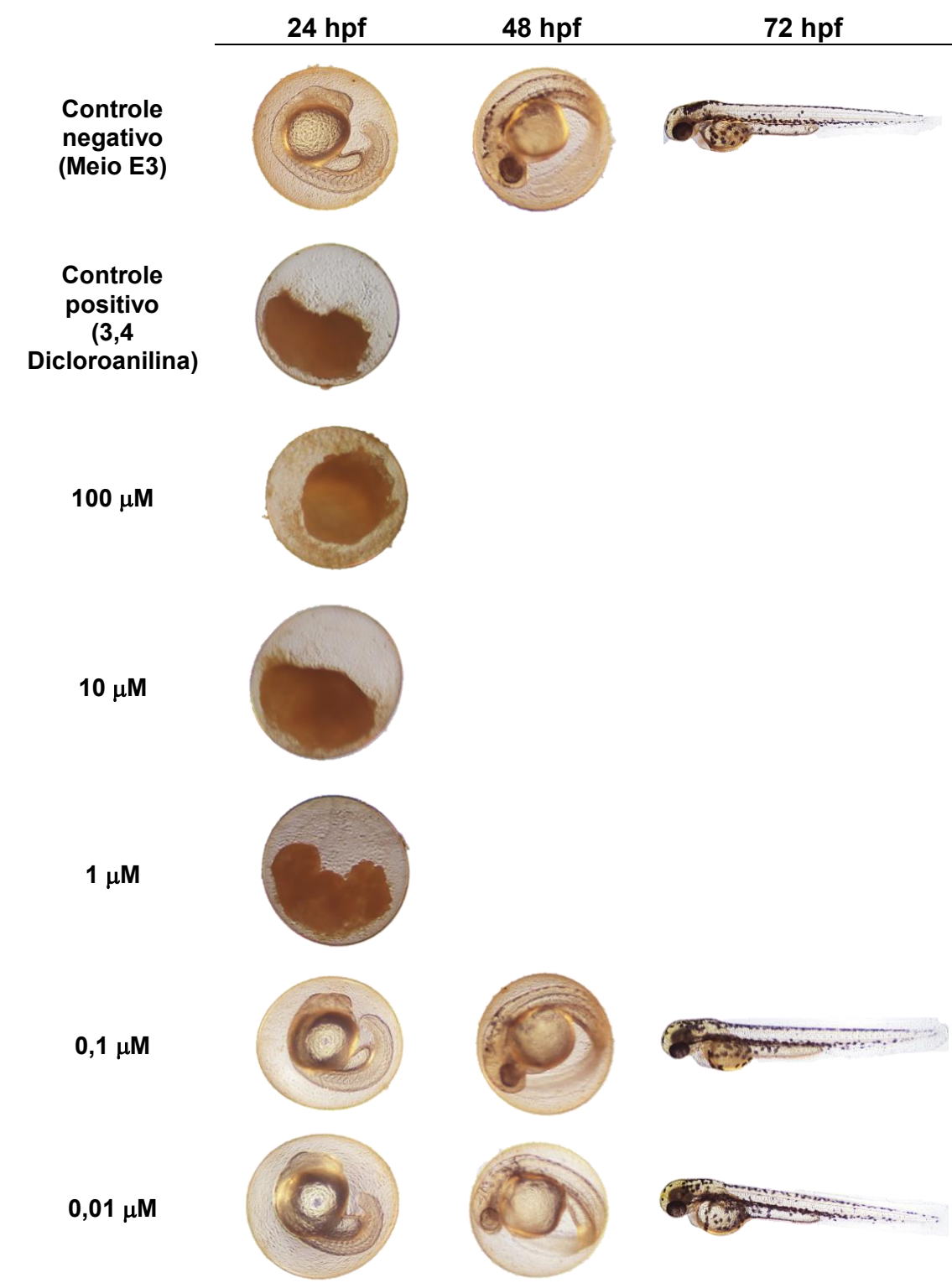
O ensaio de teratogênese seguiu os parâmetros de letalidade do *FET-test* (do inglês *Fish Embryo Acute Toxicity*) fornecido pela OECD, 2013. As vantagens deste teste incluem a (1) redução no uso de animais adultos. Aspecto que alinha-se com os 3Rs na experimentação animal (Reduzir, refinar e substituir). (2) celeridade nas triagens em toxicologia, (3) previsibilidade e adequada sensibilidade e (4) aplicação regulamentada e validada, pois o teste é aprovado pela OECD e por diversos agentes reguladores.

O controle positivo utilizado no teste, a 3,4 dicloroanilina, como esperado, apresentou 100% de letalidade nas primeiras 24 horas de exposição. A letalidade no teste foi registrada pela presença de embriões coagulados como exemplificado na (**Tabela 1 A**). Resultados similares foram observados para as concentrações de 100 µM, 10 µM e 1 µM do PM (**Tabela 1**). Para o controle negativo (meio E3) nenhuma observação significativa foi registrada.

As concentrações de 0,1 µM e 0,01 µM mostraram 10% de embriões coagulados durante as primeiras 24h do teste. Após 48h o percentual de embriões coagulados na concentração de 0,1 µM subiu para 15%. Ao fim do teste, o percentual de se manteve em 15% para concentração de 0,1 µM e 10% para concentração de 0,01 µM (**Tabela 1**).

A ausência na formação de somitos foi mantida em 10% para ambas as concentrações até o fim do teste. A ausência na formação de somitos após 48h representa letalidade. Portanto, o percentual de embriões mortos subiu para 25% para concentração de 0,1 µM e 20% para 0,01 µM. O não descolamento da cauda

durante das primeiras 24h foi de 40% para 0,1 μM e 30% para 0,01 μM como foi demonstrado. Esse percentual caiu para 10% durante 48h e não foi registrada com 72h de exposição.



A ausência de batimentos cardíacos foi observada em 25% dos embriões na concentração de 0,1 μ M e 20% na concentração de 0,01 μ M. A ausência de batimentos cardíacos também foi observada em 25% dos embriões na concentração de 0,1 μ M e 20% na concentração de 0,01 μ M. Estes resultados confirmam a letalidade destas concentrações. A taxa de eclosão ficou em 75% para concentração de 0,1 μ M e 80% para 0,01 μ M. A frequência cardíaca teve uma redução média de 28% para ambas as concentrações (**Tabela 2**).

Tabela 1 B: Frequência cardíaca do zebrafish. O teste foi realizado em duplicata com n= 4 embriões por poço. Resultados são expressos em bpm e são médias $\pm$ DP. Resultados foram considerados estatisticamente diferentes * p = 0.001.

	Frequência cardíaca	%
Controle	90 $\pm$ 4,1	
0,1 μM	64 $\pm$ 4,6*	□ 28,4
0,01 μM	65 $\pm$ 4,8*	□ 27,9

Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Estudos realizados por Andrade e colaboradores, 2004, demonstraram redução da frequência cardíaca em embriões de *Zebrafish* expostos ao mercúrio. Neste estudo, os embriões foram submetidos a efluentes contendo mercúrio, resultando em uma diminuição significativa nos batimentos cardíacos. Os resultados indicam que a frequência cardíaca é um parâmetro sensível para detectar precocemente a toxicidade em embriões de *Zebrafish*.

Os resultados obtidos demonstram que o PM possui efeitos tóxicos significativos no desenvolvimento embrionário de zebrafish (*Danio rerio*), mesmo em concentrações menores. A toxicidade foi evidenciada por altas taxas de letalidade, anormalidades no desenvolvimento embrionário, redução na frequência cardíaca e comprometimento de processos vitais, como formação de somitos e descolamento da cauda.

As concentrações mais altas (100 μ M, 10 μ M e 1 μ M) apresentaram letalidade total nas primeiras 24 horas de exposição, enquanto concentrações mais baixas (0,1 μ M e 0,01 μ M) induziram toxicidade progressiva ao longo de 72

horas, com aumento na letalidade e alterações no desenvolvimento embrionário. Essas concentrações também comprometeram a frequência cardíaca e reduziram a taxa de eclosão, confirmando o impacto tóxico em múltiplos níveis do desenvolvimento. Ademais, os resultados do controle positivo validaram a metodologia do experimento, reforçando a confiabilidade dos dados obtidos. O modelo zebrafish mostrou-se eficiente para avaliar os efeitos teratogênicos e letais do PM (CHOWDHURY & SAIKIA, 2021).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste estudo, é possível inferir que o PM exerce efeitos deletérios semelhantes, ou até mais prejudiciais, que o TM e outros derivados de mercúrio, conforme evidenciado pela complexidade dos diferentes modelos experimentais utilizados. No primeiro nível de complexidade, com hemoglobina humana pura, observamos alterações conformacionais na proteína, bloqueio de grupos tióis e retardamento na mobilidade eletroforética. No segundo nível, utilizando eritrócitos, identificamos comprometimento funcional, aumento na produção EROs e redução da atividade enzimática redox. Por fim, no modelo animal, *Danio rerio*, confirmamos a toxicidade do PM por meio da indução de teratogênese em embriões. Esses achados indicam que o PM impacta significativamente a estrutura e função de proteínas e células, reforçando seu potencial tóxico. Além disso, os resultados evidenciam a relevância de investigar os efeitos do PM em diferentes níveis de complexidade biológica.

8. PRESPECTIVAS

Realizaremos experimentos de microscopia de fluorescência com detecção de EROs por meio do DCF e Mito-Sox em zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao PM. Também estamos realizando experimentos de cristalografia e difração de raios - X para identificar os reais sítios de ligação do PM com a Hb. Este experimento fornecerá uma visão detalhada da estrutura tridimensional da Hb e dos locais exatos onde o PM se liga, complementando os dados de *docking molecular* que indicaram os potenciais sítios de ligação na proteína.

9. REFERÊNCIAS

- AEBI H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-6; 1984. doi: 10.1016/s0076- 6879(84)05016-3.
- AHMAD, S.; MAHMOOD, R. Mercury chloride toxicity in human erythrocytes: enhanced generation of ROS and RNS, hemoglobin oxidation, impaired antioxidant power, and inhibition of plasma membrane redox system. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 26, n. 6, p. 5645-5657, 2019.
- ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. E WALER P. *Biologia Molecular da célula*. Editora Artmed ,5a edição, Porto Alegre; 2010.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Priority list of hazardous substances. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>. 2017.
- BALALI-MOOD M, NASERI K, TAHERGORABI Z, KHAZDAIR MR, SADEGHI M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front Pharmacol.* 2021 Apr 13;12:643972. doi: 10.3389/fphar.2021.643972.
- Balali-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., Khazdair, M. R., & Sadeghi, M. (2021). Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 643972. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643972>.
- BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARCELOS GR, GROTO 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.
- 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.
- BEUTLER, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. Edição ilustrada. Nova Iorque: Grune & Stratton, 1971. 146 p. ISBN 0808906879, 9780808906872. Original de: Universidade de Michigan. Digitalizado em: 25 jul. 2008.
- 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.
- Bozna B.L., Polzella P., Rankl C., Zhu R., Salio M., Shepherd D., Duman M., Cerundolo V., Hinterdorfer P. Binding strength and dynamics of invariant natural

killer cell T cell receptor/CD1d-glycosphingolipid interaction on living cells by single molecule force spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 286:15973–15979 (2011).

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.

BRINGAS, M.; PETRUK, A. A.; ESTRIN, D. A. et al. Base estrutural terciária e quaternária da afinidade do oxigênio na hemoglobina humana revelada por simulações multiescala. *Scientific Reports*, v. 7, p. 10926, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11259-0>.

BURTON, Graham J.; JAUNIAUX, Eric. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011.

CAITO, Samuel; ASCHNER, Michael. Neurotoxicity of metals. In: LOTTI, Marcello; BLEECKER, Margit L. (Eds.). *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, 2015. cap. 11, p. 169-189. Volume 131. ISBN 9780444626271. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62627-1.00011-1>.

CAPRIELLO, T.; MONTEIRO, S. M.; FÉLIX, L. M.; DONIZETTI, A.; ALIPERTI, V.; FERRANDINO, I. Apoptosis, oxidative stress and genotoxicity in developing zebrafish after aluminium exposure. *Aquatic Toxicology*, v. 236, p. 105872, jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105872>.

CARNEIRO, M. F. H.; SANTOS, C. A.; GARCIA, D. O.; MURATA, T.; ANDRADE, L. O.; DE OLIVEIRA, E. H. A.; DOREA, J. G.; LUNETTA, P.; CARDOSO, B. A.; SEGUNDO, G. R. Bioaccumulation of mercury in different fish species and its effects on health in a contaminated region. *Environmental Research*, v. 134, p. 372-380, 2014.

CARTY, A. J.; MALONE, S. F. A química do mercúrio em sistemas biológicos. In: NRIAGU, J. O. (Ed.). *A biogeoquímica do mercúrio no ambiente*. Amsterdã: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979. Cap. 17, p. 433-480.

CATTONI, D.I.; KAUFMAN, S. B.; FLECHA, F. L. G. Kinetics and thermodynamics of the interaciono f 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate with proteins. *Biochimica et biophysica Acta*, Argentina, v. 1794, p. 1700-1708, Ago. 2009.

Cavalcanti T.C.; Gregorini C.C.; Guimarães F.; Rettori O. and Vieira-Matos A.N. Changes in red blood cell osmotic fragility induced by total plasma and plasma fractions obtained from rats bearing progressive and regressive variants of the Walker 256 tumor. *Braz J Med Biol Res.* 36 (7): 887-95 (2003).

CHATTARJEE, SABYASACHI; KUMAR, GOPINATHA SURESH. Targeting the heme proteins hemoglobin and myoglobin by janus green blue and study of the dye–protein association by spectroscopy and calorimetry. *RSC Advances*, v. 4, n. 80, p. 42706-42715, 2014. The Royal Society of Chemistry. DOI: 10.1039/C4RA06600F.

CHAVES, Nayara Alves. *Influência do desequilíbrio redox sobre o metabolismo energético de eritrócitos falcêmicos*. 2019. Dissertação (Mestrado em Biociências, Letras e Ciências Exatas) — Universidade Estadual Paulista

(Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2019.

CHEN, Y. Y.; YU, X. Y.; CHEN, L.; VAZIRI, N. D.; MA, S. C.; ZHAO, Y. Y. Sinalização REDOX no envelhecimento renal e oportunidade para intervenção terapêutica por meio de produtos naturais. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 141, p. 141-149, 2019. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.012.

CHENG, D.; TANG, J.; WANG, X.; ZHANG, X.; WANG, S. *Effect of aluminum (Al) speciation on the erythrocyte antioxidant defense process: Correlations between lipid membrane peroxidation and morphological characteristics*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 157, p. 201-206, 2018. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.039.

Chowdhury S, Saikia SK. Use of Zebrafish as a Model Organism to Study Oxidative Stress: A Review. *Zebrafish*. 2022 Oct;19(5):165-176. doi: 10.1089/zeb.2021.0083. Epub 2022 Sep 1. PMID: 36049069.

CHOWDHURY, R.; RAMOND, A.; O'KEEFFE, L. M.; SHAHZAD, S.; KUNUTSOR, S. K.; MUKA, T.; GREGSON, J.; WILLEIT, P.; WARNAKULA, S.; KHAN, H.; CHOWDHURY, S.; GOBIN, R.; FRANCO, O. H.; DI ANGELANTONIO, E. Environmental toxic metal contaminants and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, Londres, v. 362, p. k3310, 29 ago. 2018. doi: 10.1136/bmj.k3310. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/362/bmj.k3310>. Acesso em: 20 março de 2024. 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. *Journal of Medical Case Reports*, v. 8, p. 266, 1 ago. 2014. doi: 10.1186/1752-1947-8-266. PMID: 25084829; PMCID: PMC4145832.

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/NEJMr022471. PMID: 14585942.

CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superóxido dismutase. Uma função enzimática da eritrocupreína (hemocupreína). *Journal of Biological Chemistry*, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5).

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.*, v. 23, n. 8, p. 399-406, 2012. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.008. PMID: 22742812; PMCID: PMC3408802.

DANIEL, J. W.; GAGE, J. C.; LEFEVRE, P. A. The metabolism of phenylmercury by the rat. *Biochemical Journal*, v. 129, n. 4, p. 961-967, out. 1972. doi: 10.1042/bj1290961. PMID: 4655829; PMCID: PMC1174242.

DAVIDSON WD, T. K. Factors affecting pentose phosphate pathway activity in human red cells. *Br J Haematol.*, v. 23, n. 3, p. 371-385, 1972

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.

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

Devlin T.M. Manual de bioquímica: com correlações clínicas. 7a ed. São Paulo: Blucher, (2011).

DONG, Tian Yu; LI, Hanxuan. Riscos neurológicos decorrentes da bioacumulação de contaminantes de metais pesados: foco no mercúrio. *Toxicology*, publicado pela primeira vez em 19 jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.24119>.

DRISCOLL, C. T.; MASON, R. P.; CHAN, H. M.; JACOB, D. J.; PIRRONE, N. Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects. *Environmental Science & Technology*, v. 47, n. 10, p. 4967-4983, 21 maio 2013. doi: 10.1021/es305071v. Epub em: 3 maio 2013. PMID: 23590191; PMCID: PMC3701261.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 1, n. 6, p. 529-539, dez. 2001. Disponível em: <https://doi.org/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.

Fardin PBA, Simões RP, Schreider IRG, Almenara CCP, Simões MR, Vassallo DV. Chronic Mercury Exposure in Prehypertensive SHRs Accelerates Hypertension Development and Activates Vasoprotective Mechanisms by Increasing NO and H₂O₂ Production. *Cardiovasc Toxicol.* 2020 Jun;20(3):197-210. doi: 10.1007/s12012-019-09545-6. PMID: 31338744.

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.

FILIP-CIUBOTARU F, MANCIUC C, STOLERIU G, FOIA L. NADPH oxidase: structure and activation mechanisms (review). *NOTE I. Rev Med Chir Soc Med Natlasi.*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.

FORSTERMANN, Ulrich; SESSA, William C. Nitric óxido sintases: regulação e função. *European Heart Journal*, v. 33, n. 7, p. 829-837, abril 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutase: role in redox signaling, vascular function, and disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 15, n. 6, p. 1583-1606. 2011.

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.

GIULIVI, Cecilia; DAVIES, Kelvin J. A. Mechanism of the formation and proteolytic release of H₂O₂-induced dityrosine and tyrosine oxidation products in hemoglobin and red blood cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 26, p. 24129-24136, 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M010697200>.

GLORIEUX, C.; CALDERON, P. B. Catalase, uma enzima notável: visando a enzima antioxidante mais antiga para encontrar uma nova abordagem para o tratamento do câncer. *Biological Chemistry*, v. 398, n. 10, p. 1095-1108, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>.

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.

GUAN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y. New insight into the binding interaction of hydroxylated carbon nanotubes with bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Bimolecular Spectroscopy*, China, v. 214, p. 556-563, jan. 2014.

HAJAM YA, RANI R, GANIE SY, SHEIKH TA, JAVAID D, QADRI SS, PRAMODH S, ALSULIMANI A, ALKHANANI MF, HARAKEH S, HUSSAIN A, HAQUE S, RESHI MS. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells*. 2022 Feb 5;11(3):552. doi: 10.3390/cells11030552.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015. 905 p. ISBN 9780198717478.

HANDY, D. E.; LOSCALZO, J. O papel da glutathione peroxidase-1 na saúde e na doença. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 188, p. 146-161, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.004>.

HE, Jian-Hui; GAO, Ji-Min; HUANG, Chang-Jiang; LI, Chun-Qi. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 42, p. 35-42, 2014. ISSN 0892-0362. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.01.006>.

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.

HOUSTON, M. C. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, v. 13, n. 2, p. S128-133, mar.-abr. 2007. PMID: 17405690.

JAN, A. T.; AZAM, M.; SIDDIQUI, K.; ALI, A.; CHOI, I.; HAQ, Q. M. R. Metais Pesados e Saúde Humana: Visão Mecanística da Toxicidade e Sistema de Contra-Defesa de Antioxidantes. *Revista Internacional de Ciências Moleculares*, v. 16, n. 12, p. 29592-29630, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms161226183>.

Karabaliev M, Tacheva B, Paarvanova B, Georgieva R. Change in Osmotic Pressure Influences the Absorption Spectrum of Hemoglobin inside Red Blood Cells. *Cells.* 2024 Mar 28;13(7):589. doi: 10.3390/cells13070589. PMID: 38607028; PMCID: PMC11011345.

KEUNEN E, REMANS T, BOHLER S, VANGRONSVELD J, CUYPERS A. Metal-Induced Oxidative Stress and Plant Mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences.* 2011; 12(10):6894-6918. <https://doi.org/10.3390/ijms12106894>.

KHAN, M. A. K.; WANG, F. Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 28, p. 1567-1577, 2009. doi: 10.1897/08-375.1.

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.bbabi.2010.01.034.

Li, J., Fu, A. & Zhang, L. Uma visão geral das funções de pontuação usadas para interações proteína-ligante em encaixe molecular. *Interdiscip Sci Comput Life Sci* **11**, 320–328 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>.

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione peroxidase-1 na saúde e na doença: dos mecanismos moleculares às oportunidades terapêuticas. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 15, n. 7, p. 1957-1997, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3586>.

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 H₂O₂ Generation and Mitochondrial Superoxide Dismutase Activity. *Curr Mol Pharmacol.* 13(1):76-83; 2020. doi: 10.2174/1874467212666190723144006.

MEADOWS-OLIVER, Mikki. Environmental Toxicants: Lead and Mercury. *Journal of Pediatric Health Care*, v. 26, n. 3, p. 213-215, 2012. ISSN 0891-5245. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2012.02.005>.

MERCURY as a global pollutant: sources, pathways, and effects. *Environmental Science & Technology*, v. 47, n. 10, p. 4967-4983, 2013.

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.

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

Misra, HP e Fridovich, I. (1972) O papel do ânion superóxido na autooxidação da epinefrina e um ensaio simples para superóxido dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247, 3170-3175.

Mu H, Chen S, Liu F, Xiao J, Huang H, Zhang Y, Sun Y, Gao X, Lei H, Yuan X. Stereoselective interactions of lactic acid enantiomers with HSA: Spectroscopy and docking application. *Food Chem*. 2019 Jan 1;270:429-435. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.135. Epub 2018 Jul 20. PMID: 30174068.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 2, p. 168–178, 2007.

NEATHERY, M. W.; MILLER, W. J. Metabolism and toxicity of cadmium, mercury, and lead in animals: a review. *Journal of Dairy Science*, v. 58, n. 12, p. 1767-1781, dez. 1975. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(75)84785-0.

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

NESC, S.; TROMBETTI, F.; PIRINI, M.; VENTRELLA, V.; PAGLIARANI, A. Mercury and protein thiols: Stimulation of mitochondrial F1FO-ATPase and inhibition of respiration. *Chemico-Biological Interactions*, v. 260, p. 42-49, 25 dez. 2016. doi: 10.1016/j.cbi.2016.10.018.

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

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.

OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 2013. Available at: < <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264203709-en> >.

Olczak M., Duszczyk M., Mierzejewski P., Majewska M.D. Neonatal Administration of a Vaccine Preservative, Thimerosal, Produces Lasting

Impairment of Nociception and Apparent Activation of Opioid System in Rats. *Brain Res.* 1301:143-51 (2009).

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

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.

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.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Biomarkers of Oxidative Stress in Red Blood Cells. *Biomedical Papers*, v. 155, n. 2, p. 131-136, 2011. ISSN 12138118 18047521

RALSTON, S. H. et al. *Princípios e prática da medicina de Davidson*. 23. ed. Amsterdã: Elsevier, 2018.

Ramos, R., Cipriani, R., Guzman, H. M., & García, E. (2009). Chronology of mercury enrichment factors in reef corals from western Venezuela. *Marine Pollution Bulletin*, 58(2), 222-229.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.09.023>.

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.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, v. 233, p. 357-363, 1994. DOI: 10.1016/S0076-6879(94)33041-7.

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.

RODRIGUES, A. D.; RIBEIRO, L. R. Sistemas sanguíneos, incompatibilidade e procedimentos alternativos à transfusão. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 2, p. 13007–13027, 2021.

SALES NETO, A. T. DE. Marcação de antígenos eritrocitários do sistema ABO com nanopartículas fluorescente de semicondutores Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

SALES, M. V. S.; DA SILVA FILHO, R. C.; SILVA, M. M.; ROCHA, J. L.; FREIRE, R. O.; DE L. TANABE, E. L.; SILVA, E. C. O.; FONSECA, E. J. S.; FIGUEIREDO, I. M.; ROCHA, U.; SANTOS, J. C. C.; LEITE, A. C. R. Consequences of thimerosal on human erythrocyte hemoglobin: Assessing functional and structural protein changes induced by an organic mercury compound. *J Trace Elem Med Biol.*, 2022 Jan 10;71:126928. doi: 10.1016/j.jtemb.2022.126928.

Santos JCN, da Silva IM, Braga TC, de Fátima Â, Figueiredo IM, Santos JCC. Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). *Int J Biol Macromol*. 2018 Jul 1;113:1032-1040. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.116. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29476861.

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

SEKYONDA, Z.; AN, R.; GOREKE, U.; MAN, Y.; MONCHAMP, K.; BODE, A.; ZHANG, Q.; EL-GAMMAL, Y.; KITYO, C.; KALFA, T. A.; AKKUS, O.; GURKAN, U. A. Rapid measurement of hemoglobin-oxygen dissociation by leveraging Bohr effect and Soret band bathochromic shift. *Analyst*, 2024 Apr 29;149(9):2561-2572. doi: 10.1039/d3an02071a. PMID: 38501195; PMCID: PMC11056771.

SEKYONDA, Z.; AN, R.; GOREKE, U.; MAN, Y.; MONCHAMP, K.; BODE, A.; ZHANG, Q.; EL-GAMMAL, Y.; KITYO, C.; KALFA, T. A.; AKKUS, O.; GURKAN, U. A. *Rapid measurement of hemoglobin-oxygen dissociation by leveraging Bohr effect and Soret band bathochromic shift*. *Analyst*, v. 149, n. 9, p. 2561-2572, 2024. DOI: 10.1039/d3an02071a.

Shi Q., Luo S., Jia H., Feng L., Lu X., Zhou L., Cai J. Insulin-producing cells could not mimic the physiological regulation of insulin secretion performed by pancreatic beta cells, *Nanoscale Res. Lett.* 8:90 (2013).

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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 219, p. 112337, 2021. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112337. ISSN 0147-6513.

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.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SLIMEN BELHADJ, I.; NAJAR, T.; GHRAM, A.; DABBEBI, H.; BEN MRAD, M.; ABDREBBAH, M. Espécies reativas de oxigênio, estresse térmico e dano mitocondrial induzido por oxidação. Uma revisão. *Jornal Internacional de Hipertermia*, v. 30, n. 7, p. 513-523, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>.

SOLECKI, R.; GOTTSCHALK, M.; MAHRO, U. Nephrotoxische Effekte von Phenylquecksilberazetat: Akute Wirkungen bei der Ratte. *Ergebnisse der Experimentellen Medizin*, v. 46, p. 459-461, 1985.

- SOLECKI, R.; HOTHORN, L.; HOLZWEISSIG, M.; HEINRICH, V. Análise computadorizada de achados patológicos em ensaios de longo prazo com acetato fenilmercúrico em ratos. In: CHAMBERS, P. L.; CHAMBERS, C. M.; WIEZOREK, W. D.; GOLBS, S. (eds). *Desenvolvimentos recentes em toxicologia: tendências, métodos e problemas*. Arquivos de toxicologia, v. 14. Berlim: Springer, Heidelberg, 1991. doi: 10.1007/978-3-642-74936-0_21.
- SOUZA, J. R.; BARBOSA, A. C. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. *Revista Química Nova na Escola*, Seção Química e Sociedade, n. 12, p. nov. 2000.
- 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.
- SUMNER, JAMES B.; DOUNCE, ALEXANDER L. Crystalline catalase. *Science*, v. 85, n. 2206, p. 366-367, 9 abr. 1937. DOI: 10.1126/science.85.2206.366.
- TCHOUNWOU, P. B.; YEDJOU, C. G.; PATLOLLA, A. K.; SUTTON, D. J. Heavy metal toxicity and the environment. *Experientia Supplementum*, v. 101, p. 133-164, 2012.
- 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.
- TONOMURA, K., MAEDA, K., FUTAI, F. *et al*. Stimulative Vaporization of Phenyl-mercuric Acetate by Mercury-resistant Bacteria. *Nature* 217, 644–646 (1968). <https://doi.org/10.1038/217644b0>.
- UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. Minamata Convention on Mercury. UNEP, 2013. Disponível em: <http://www.mercuryconvention.org/>. Acesso em: 31 maio 2024.
- VAN ZWIETEN, R.; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. *Free Radic Biol Med*, v. 67, p. 377-86, Feb 2014. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24316370> >.
- VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell*, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2007. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.03.016.
- 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.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *10 chemicals of public health concern*. 1 jun. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/photo-story/photo-story-detail/10-chemicals-of-public-health-concern>. Acesso em: 20/02/2024.

WU, Yuan-Seng; OSMAN, Ahmed I.; HOSNY, Mohamed; ELGARAHY, Ahmed M.; ELTAWEL, Abdelazeem S.; ROONEY, David W.; CHEN, Zhonghao; RAHIM, Nur Syafiqah; SEKAR, Mahendran; GOPINATH, Subash CB; MAT RANI, Nur Najihah Izzati; BATUMALAIE, Kalaivani; YAP, Pow-Seng. A toxicidade do mercúrio e seus compostos químicos: mecanismos moleculares e implicações ambientais e para a saúde humana: uma revisão abrangente. *ACS Omega*, v. 9, n. 5, p. 5100-5126, 2024. DOI: 10.1021/acsomega.3c07047

YAWATA, Y. Cell membrane: the red blood cell as a model. [S.l.] John Wiley & Sons, 2006.

YAWATA, Y. Cell Membrane: The Red Blood Cell As a Model. *Cell Membrane: The Red Blood Cell As a Model*, p. 133-150 2003.

ZHANG, Q. F.; LI, Y. W.; LIU, Z. H.; CHEN, Q. L. Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos-larvae. *Aquatic Toxicology*, v. 181, p. 76-85, dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.029>.

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.

UNIVERSIDADE
FEDERAL DE ALAGOAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Células sanguíneas como modelo para estudo de toxicidade por metais pesados

Pesquisador: Ana Catarina Rezende Leite

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 02840318.2.0000.5013

Instituição Proponente: Universidade Federal de Alagoas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.099.328

Apresentação do Projeto:

A exposição de seres humanos à metais pesados como Hg, As, Se, Cd e Pb, podem levar a diversas patologias como por exemplo: disfunções neurológicas, desenvolvimento de câncer e ainda doenças cardiovasculares. Dentre tais metais pesados o Hg e seus derivados exercem efeitos mais conhecidos e estudados por serem bioacumulados no organismo. A contaminação por metais pesados, sendo por alimentação ou água, bem como através do consumo de produtos comerciais, como cosméticos e vacinas, são de grande preocupação para a população mundial. Estudos sobre contaminação por tais metais se fazem necessários principalmente identificando os níveis de acumulação no organismo, sendo assim o uso de células pouco invasivas, como as contidas no nosso sangue são de grande interesse como biomarcadoras. O nosso sangue compreende uma gama de células e componentes que são essenciais para o transporte não apenas de oxigênio, mas de todos os nutrientes que são essenciais para a sobrevivência do nosso organismo com um todo. O sangue é composto de células que são divididas em dois grande grupos: as células vermelhas, que são os eritrócitos (hemácias), e as células brancas, que são os linfócitos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, plaquetas dentre outras. Cada uma dessas células desempenha um papel específico, dentro desse universo complexo que compõe o sangue, temos as hemácias como sendo uma das células de grande importância e interesse por ser a carreadora de oxigênio para nossas células. As hemácias possuem a hemoglobina como proteína que é composta por quatro subunidades.

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município:

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

Telefone: (82)3214-1041

Cada uma dessas cadeias contém um heme. O heme é definido como sendo uma estrutura composta por um anel porfirínico e que possui em seu interior um Fe^{3+} que é o responsável pela ligação com o O_2 . Por ser uma célula que carrega oxigênio, ela tem um metabolismo diferente das demais células, ou seja, ela não faz fosforilação oxidativa por não conter mitocôndria. Esse é um artifício sofisticado que tem haver com a tensão do oxigênio que é carregada por ela. Contudo os eritrócitos (hemácias) possuem um sistema redox poderoso, que responde frente às diversas alterações no ambiente. Tal sistema redox compreende não apenas as enzimas antioxidantes (SOD, Catalase e GPx) mas diversos grupos derivados de sulfidrilas e que podem ser alterados por contaminação por metais. Na linha de que compostos derivados de Mercúrio são potencialmente tóxicos para nossos eritrócitos, vale destacar que alguns desses compostos fazem parte de consumíveis do nosso dia-a-dia e que não tem nenhum tipo de fiscalização ou de normatização por parte dos órgãos competentes no que confere níveis confiáveis e não tóxicos para a nossa saúde. Dentre tais compostos vale destacar o Timerosal, um composto usado como conservante, que em solução aquosa gera o etil-mercúrio, este por sua vez pode se ligar em grupos sulfidrilas livre e modificar suas funções. Tais efeitos do Timerosal foram recentemente comprovados na albumina, uma importante proteína do nosso sistema sanguíneo sendo carreadora de ácidos graxos. Sendo assim nosso projeto se propõe a avaliar de uma forma ampla, tanto nos eritrócitos, quanto nas células linfomononucleares, de voluntários, os efeitos do Mercúrio e seus derivados na sua função e no sistema redox.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário:**

O objetivo do presente projeto é avaliar os possíveis efeitos de metais pesados, a exemplo do Mercúrio e seus derivados no sistema redox de células sanguíneas bem como de seus componentes.

Objetivo Secundário:

Avaliar os possíveis efeitos do Mercúrio e seus derivados nos eritrócitos e células linfomononucleares de humanos: A atividade dos eritrócitos em captar oxigênio; Produção de espécies reativas de oxigênio; O estado redox a partir do conteúdo de glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG) e da razão GSH/GSSG e grupos sulfidrilas livres; A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx); Avaliação de marcadores secundários do estresse oxidativo, como lipídeos oxidados, carbonilas oxidadas, DNA oxidado.

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,**Bairro:** Cidade Universitária**CEP:** 57.072-900**UF:** AL**Município:****E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com**Telefone:** (82)3214-1041

UNIVERSIDADE
FEDERAL DE ALAGOAS



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os incômodos e possíveis riscos à sua saúde física e/ou mental são: Possivelmente durante a coleta de sangue, na qual podem ocorrer dor; Hematomas, acidente com perfurocortantes; Punção acidental de uma artéria; Se sentir desconfortável psicologicamente por ter participado do projeto. Este procedimento será realizado por profissional da saúde com experiência e segundo as boas práticas individuais que seguem tal procedimento visando eliminar tais riscos. E caso ocorra algum desses incômodos caberá ao profissional responsável pela coleta orientar o paciente das medidas a serem realizadas para saná-lo. Se houver a necessidade de acompanhamento psicológico tal paciente será encaminhado ao setor responsável no Hospital Universitário da UFAL, onde o projeto será realizado

Benefícios:

Os benefícios esperados com a sua participação no projeto de pesquisa, mesmo que não diretamente são:

Obtenção de conhecimento quanto a

existência ou não de toxicidade frente ao Timerosal e demais sub-produtos de Mercúrio.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto busca avaliar através de experimentação "in vitro" efeitos de metais pesados como o mercurio no sistema redox de células sanguíneas

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequadamente apresentados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Por estar de acordo cm as recomendações da resolução 466/12 sugerimos sua aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo Aprovado

Prezado (a) Pesquisador (a), lembre-se que, segundo a Res. CNS 466/12 e sua complementar 510/2016:

O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber cópia do TCLE, na íntegra, por ele assinado, a não ser em estudo com autorização de declínio; V.S^a. deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município:

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

Telefone: (82)3214-1041

**UNIVERSIDADE
FEDERAL DE ALAGOAS**



estudo somente após análise das razões da descontinuidade por este CEP, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata;

O CEP deve ser imediatamente informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É responsabilidade do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas a evento adverso ocorrido e enviar notificação a este CEP e, em casos pertinentes, à ANVISA;

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial;

Seus relatórios parciais e final devem ser apresentados a este CEP, inicialmente após o prazo determinado no seu cronograma e ao término do estudo. A falta de envio de, pelo menos, o relatório final da pesquisa implicará em não recebimento de um próximo protocolo de pesquisa de vossa autoria.

O cronograma previsto para a pesquisa será executado caso o projeto seja APROVADO pelo Sistema CEP/CONEP, conforme Carta Circular nº. 061/2012/CONEP/CNS/GB/MS (Brasília-DF, 04 de maio de 2012).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1168325.pdf	30/10/2018 16:40:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_completo_outubro.pdf	30/10/2018 16:39:41	Ana Catarina Rezende Leite	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoEritrocitoscommetaispesados_ver_sao4.pdf	28/10/2018 00:45:53	Ana Catarina Rezende Leite	Aceito
Cronograma	CronogramadeExecucaomodificado.pdf	28/10/2018 00:22:18	Ana Catarina Rezende Leite	Aceito
Outros	Questionarioprimeiraversaometais.pdf	12/07/2018 00:20:57	Ana Catarina Rezende Leite	Aceito
Declaração de	anuenciaequipe.pdf	12/07/2018	Ana Catarina	Aceito

**UNIVERSIDADE
FEDERAL DE ALAGOAS**



Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 57.072-900

UF: AL

Município:

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

Telefone: (82)3214-1041

Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	anuenciaequipe.pdf	00:13:47	Rezende Leite	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	12/07/2018 00:12:45	Ana Catarina Rezende Leite	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termoanuencia.pdf	12/07/2018 00:10:46	Ana Catarina Rezende Leite	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuenciamarcos.pdf	12/07/2018 00:10:19	Ana Catarina Rezende Leite	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuenciareginaldo.pdf	12/07/2018 00:10:05	Ana Catarina Rezende Leite	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuenciajosue.pdf	12/07/2018 00:09:53	Ana Catarina Rezende Leite	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	12/07/2018 00:09:02	Ana Catarina Rezende Leite	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MACEIO, 21 de Dezembro de 2018

**Assinado por:
Luciana Santana
(Coordenadora)**

UNIVERSIDADE
FEDERAL DE ALAGOAS

