



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB



MARCOS VINICIUS DOS SANTOS SALES

**Efeitos do Timerosal em eritrócitos: avaliação das mudanças
estruturais e mecanismo de ação**

Maceió
2021

MARCOS VINICIUS DOS SANTOS SALES

Efeitos do Timerosal em eritrócitos: avaliação das mudanças estruturais e mecanismo de ação

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Química Licenciatura, da Universidade Federal de Alagoas com requisito parcial à obtenção do título Licenciado em Química.

Orientadora: Prof. Dr. Ana Catarina Rezende Leite

Maceió, 19 de Julho de 2021

BANCA EXAMINADORA



Prof(a). Dr (a). Ana Catarina Rezende Leite.



Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos.



Prof. Dr. Júlio Cosme Santos da Silva.



Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely.



Ms. Ábner Magalhães Nunes.

Maceió

2021

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

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

S163e Sales, Marcos Vinicius dos Santos.

Efeitos do timerosal em eritrócitos : avaliação das mudanças estruturais e mecanismo de ação / Marcos Vinicius dos Santos Sales. – 2021.
45 f. : il.

Orientadora: Ana Catarina Rozende Leite.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química: Licenciatura) –
Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió,
2021.

Bibliografia: f. 37-43.

Apêndices: f. 44-45.

1. Compostos organometálicos. 2. Proteína - Mudança estrutural. 3.
Hemoglobina - Alterações funcionais. I. Título.

CDU: 547.1'13

SUMÁRIO

1. Revisão bibliográfica.....	6
1. Proteínas como ferramenta de estudo para toxicidade de metais bioacumulativos:.....	6
1.1. Mercúrio.....	6
1.2. Proteínas.....	8
1.3. Hemoglobina.....	10
1.4. Sangue.....	12
1.5. Timerosal.....	13
2. Metodologia	15
2.1. Químicos, reagentes e soluções.....	15
2.2. Coleta das amostras de sangue.....	15
2.3. Ensaio de captação de oxigênio	16
2.4. Determinação de grupos tióis livres totais.....	16
2.5. Fragilidade osmótica da membrana de Eri.....	16
2.6. Produção EROs em Eri.....	16
2.7. Espectroscopia Raman de Eri	17
2.8. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	17
2.9. Estudos teóricos: cálculos de acoplamento	18
2.10. Cálculo da Coordenada de reação	19
2.11. Análise estatística.....	20
3. Resultados	20
3.1. Efeito do TM na captação de oxigênio em Hb e Eri humanos	20
3.2. Conteúdo de tiol livre total em Hb e Eri.....	23
3.3. Fragilidade de membrana dos Eri na presença do TM.....	24
3.4. Efeito do TM na produção de ROS em Eri.....	25
3.5. Espectroscopia Raman aplicada no Eri.....	26
3.6. Propriedades biomecânicas dos eritrócitos	30
3.7. Cálculos de Acoplamento	32
4. Discussão	34
5. Conclusão	38
Referências.....	38
APÊNDICE A – Gráfico abstract	45
APÊNDICE B – Email de submissão do artigo	46

RESUMO

Thimerosal (TM) é um composto organometálico usado como conservante em muitos insumos farmacológicos. Um dos efeitos tóxicos do mercúrio está relacionado à mudança nas funções das biomoléculas, como proteínas e lipídeos, por exemplo. A hemoglobina humana (Hb) e os eritrócitos foram usados para avaliar a captação de O₂, considerando: concentração do TM, tempo de incubação, e temperatura. A influência do TM no conteúdo de sulfidrina, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e fragilidade da membrana também foram avaliados. Além disso, foi feito espectro Raman e experimentos relacionados a morfologia e elasticidade através da Microscopia de Força Atômica (AFM) dos Eri na presença/ausência do TM, bem como estudos de docking, foram realizados. A 37 °C, usando TM 2,50 µM (concentração mais alta) após 5 min de incubação na Hb e nos Eri, foi observado uma redução da captação de O₂ em torno de 50%, enquanto o HgCl₂, usado como controle positivo, apresentou pelo menos 62% de redução. O ensaio de tiol total na presença de NEM (bloqueador de SH) quantificamos a preservação de quase 60% desses grupos em Eri. Com base no perfil do espectro Raman de Eri-TM foi verificada diferenças estruturais no anel porfirínico e no conteúdo de lipídios da membrana. Finalmente, estudos usando AFM mostraram mudanças na morfologia e propriedades biomecânicas do Eri. Estudos teóricos confirmaram os resultados experimentais mostrando que os resíduos de Cys presentes na Hb estão envolvidos na ligação do TM. Considerando os resultados, o TM se liga à Hb humana por meio de resíduos Cys livres, causando alterações de conformação e levando a efeitos nocivos associados ao transporte de O₂.

Palavras-chave: Composto organometálico; Mudanças estruturais da proteína; Alterações funcionais;

1. Revisão bibliográfica

1. Proteínas como ferramenta de estudo para toxicidade de metais bioacumulativos:

1.1. Mercúrio

Está bem documentado que a exposição de seres humanos a elementos como mercúrio, arsênio, cádmio e chumbo pode levar a disfunções, sejam neurológicas (Nascimento et al., 2015), desenvolvimento do câncer (Zhang et al., 2012) e também doença cardíaca (Fillion et al., 2006). Entre esses elementos o mercúrio exhibe muitos estudos confirmando seus efeitos nocivos, principalmente efeitos neurotóxicos relacionados a alimentos contaminados ou fontes ambientais. Esses efeitos estão geralmente associados ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), problemas relacionados à atividade das enzimas antioxidantes e também ao esgotamento do sistema que neutraliza as EROs como um todo (Gruta et al., 2010).

Mercúrio (200,59 g/mol) é um elemento químico pertencente ao grupo 12 da família IIB da tabela periódica, seu número atômico é 80 e seu símbolo é Hg – encontrado na natureza na forma de um minério chamado de cinábrio (HgS) – é usado desde a época antes de cristo. Tem propriedades físicas como baixos pontos de ebulição (356,7 °C) e fusão (-38,89 °C), densidade de 13,55 g/cm³. Também é um metal que em temperatura ambiente se encontra no estado líquido e por isso recebeu nomes como prata-viva. Seus estados de oxidação mais comuns são 1+ e 2+, tem uma versatilidade na formação de compostos orgânicos e inorgânicos, porém quando aquecido a altas temperaturas são produzidos gases tóxicos e corrosivos (Miessler et. al. 2014).

É um metal que tem diversas aplicações, por exemplo, presente em eletrodos usados na fabricação em escala industrial de cloro ou hidróxido de sódio (soda cáustica), entretanto sua principal aplicação é na mineração devido a sua capacidade de solubilizar outros metais como o ouro e o zinco, formando uma liga conhecida como amalgama. Além disso, já foi usado em procedimentos odontológicos, termômetros, baterias, tintas, circuitos eletrônicos, lâmpadas fluorescentes e como conservante de alguns cosméticos e até em vacinas (QUALI 2020).

Como o mercúrio é uma substância presente na natureza, encontrado no solo, ar e

nas águas, está propenso a um ciclo geoquímico natural proveniente das emissões geradas em atividades vulcânicas, processos geotérmicos e até volatilização dos oceanos. O mercúrio presente na atmosfera é predominantemente o mercúrio elementar (Hg^0), porém através de reações de oxidação ele se converte em mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) e esse por ter uma reatividade maior é capaz de interagir com bactérias e se converter em espécies orgânicas como metilmercúrio (MeHg) ou em um ciclo complexo para formação de sais insolúveis (Bisinoti et. al. 2004, Wasserman et. al. 2001). Ações humanas como a mineração e o setor industrial, supracitados, acabam potencializando a contaminação do meio ambiente, muitas vezes aumentando sua concentração e conseqüentemente as reações que formam espécies de mercúrio mais agressivas que acumulam nesses ecossistemas, causando riscos a mais de 100 mil pessoas que trabalham ou vivem próximos dessas regiões principalmente na região Amazônica, por exemplo (Ministério do Meio Ambiente, 2013).

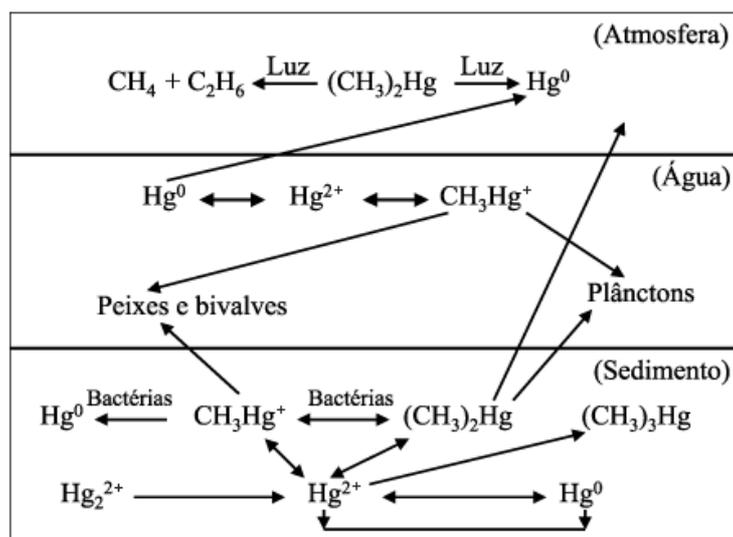


Fig. 1. Ciclo geoquímico do mercúrio. Fonte: Bisinoti et. al. 2004

O metilmercúrio (MeHg) que é um composto organometálico, apresenta uma série de complicações ao meio ambiente e a saúde humana por ter afinidade com tecido orgânico e é capaz de bioacumular. Na literatura existem vários estudos mostrando que esse composto pode causar danos nos órgãos como o cérebro, rim, fígado e coração (Sumathi et. al. 2018), atacando principalmente o sistema nervoso central devido a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica causando neurotoxicidade. A principal fonte de exposição humana é pela cadeia alimentar no consumo de frutos do

mar chegando em torno de 80 a 90% de tal contaminação (Mahaffey et al. 2004).

A teoria ácido-base duros e moles de Ralph Pearson postulada nos anos 60 descreve como a nuvem eletrônica de um íon ou um composto reage ao se aproximar de outro íon ou composto de carga oposta, chamada de polarizabilidade; sendo uma propriedade que determina a tendência das reações de compostos segundo o conceito de Lewis (Shriver et. al. 2008). Pearson afirma que bases moles (espécies capazes de doar pares de elétrons) interagem preferencialmente com ácidos moles (espécies capazes de receber pares de elétrons), o mesmo vale para bases duras e ácidos duros. E o mercúrio por ser caracterizado como um ácido mole tem alta afinidade com benzeno, íons como cianeto ou tiocianato, monóxido de carbono e grupos que apresentam tióis em sua estrutura (R-SH) como, por exemplo, a cisteína; sendo todos esses caracterizados como bases moles.

1.2. Proteínas

A cisteína ($C_3H_7NO_2S$) é uma biomolécula pertencente ao grupo dos aminoácidos que se enquadra no conceito de base mole conseqüentemente tem alta afinidade com o mercúrio e por conta disso é alvo de vários estudos. Os aminoácidos são compostos químicos formados por um carbono quiral ligado a um grupo amina, um grupo carboxila, um grupo R que pode ser qualquer cadeia carbônica e um hidrogênio; eles por si só já desempenham papéis importantes como neurotransmissores (Fitsanakis et. Al. 2005), por exemplo. Porém essa não é sua única função porque quando esses compostos se ligam entre si dão origem a outras classes de compostos como hormônios (insulina indispensável no metabolismo de carboidratos), proteínas (hemoglobina que é responsável pelo transporte de O_2 pelo corpo) enzimas (DNA-polimerase, a enzima que faz a replicação do DNA) e canais (bomba de sódio/potássio ATPase, faz influxo e efluxo de íons para desencadear um potencial de ação).

As proteínas assim como algumas enzimas são polímeros de aminoácidos denominadas de estruturas polipeptídicas. Apresentam quatro níveis estruturais dentre eles o primário que é a sequência de aminoácidos que constitui aquela proteína, esse é nível mais importante pois qualquer troca em um desses aminoácidos pode causar a disfunção dessa biomolécula, o que pode levar a uma enfermidade como a anemia falciforme, que nada mais é do que a consequência na troca de um resíduo de glutamato

por um resíduo de valina na estrutura da hemoglobina (Purnell 2019). O nível secundário que é dividido prioritariamente em dois subgrupos, o primeiro subgrupo é quando a estrutura primária assume uma conformação conhecida como α -hélice onde os aminoácidos são arranjados ao redor de um eixo imaginário, onde a cada 3,5 aminoácidos tem uma volta ao redor de um eixo imaginário e o segundo é quando assume uma conformação de zigue-zague conhecido como folha- β – um característica marcante desse nível secundário é que não há participação do grupo R na descrição da estrutura; mas esses não são os únicos existentes, tem um terceiro grupo formado por 4 aminoácidos que dá uma volta de 180° chamado de volta β que é usado pela proteína para conectar uma estrutura em outra, α -hélice com folha β , muito comum em proteínas globulares. O próximo nível é o terciário, que é caracterizado por ter uma única cadeia polipeptídica estabilizada por ligações de hidrogênio, pontes dissulfeto, interações eletrostáticas e forças de Van Der Waals podendo ou não já ser uma proteína funcional, por exemplo, a albumina que é uma proteína transportadora de ácidos graxos, a mioglobina que é responsável pela captação de oxigênio no músculo e a citocromo c que está associada a processos como respiração mitocondrial e morte celular. O último nível é o nível quaternário que se dá quando a proteína possui mais de uma cadeia polipeptídica por exemplo, a superóxido dismutase uma enzima do sistema antioxidante que tem como função catalítica a conversão do ânion radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Campbell & Farrell, 2015), o colágeno que tem função estrutural e a ácido graxo síntase que é a enzima responsável pela síntese de gordura (lipídeos).

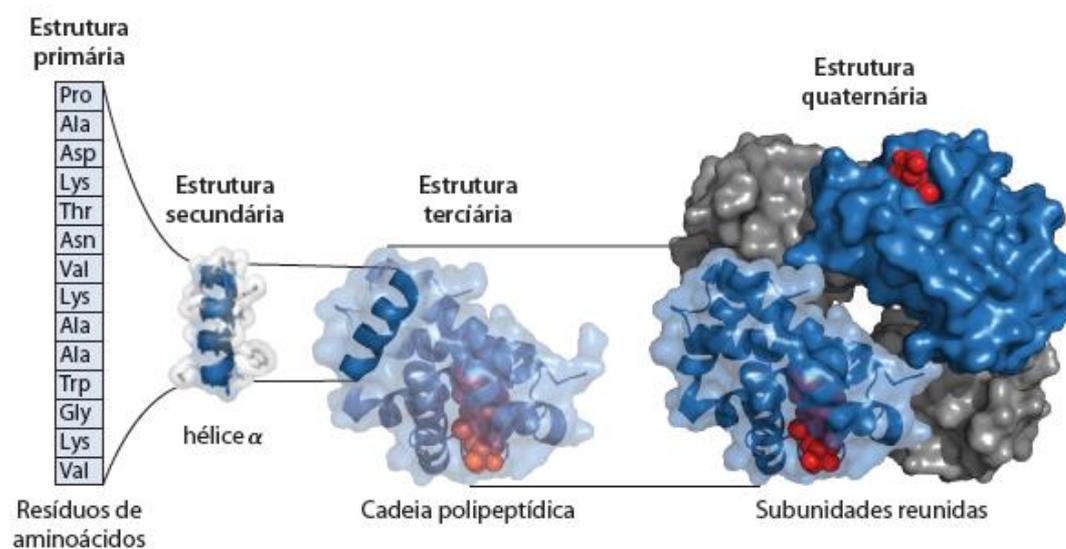


Fig. 2. Níveis estruturais de uma proteína. Fonte: Princípios da Bioquímica de Lehninger, 2019.

As funções das proteínas são diversas, por exemplo, ajudam na estruturação celular visto que a membrana de uma célula não é só composta de lipídeos; catalisam de processos bioquímicos quando assumem a forma de enzimas, como, a ATP-sintase que fornece energia através da produção do adenosina trifosfato (ATP) (Nicholls & Ferguson, 2013), que também é chamada de moeda energética. Temos proteínas que servem para o transporte de substâncias pelo corpo através das vias sanguíneas como as apoloproteínas (transportadoras de lipídeos) ou transporte intra e extracelular devido a semipermeabilidade das membranas que impede a passagem de alguns compostos por difusão, por exemplo, os GLUTs que são transportadores de glicose.

Além disso, as proteínas são divididas em duas grandes famílias. As fibrosas, que são proteínas com as cadeias polipeptídicas arranjadas de formas alongadas em geral constituída por apenas α -hélices ou folha β e estão associadas a função estrutural, suporte e proteção. E as globulares, que assumem uma forma esférica ou globular e possuem diversos tipos de estruturas secundárias, suas funções estão mais relacionadas a regulação e/ou atividade enzimática (Devlin, 2011).

1.3. Hemoglobina

A hemoglobina é uma proteína quaternária pertencente à família das globinas com quatro cadeias polipeptídicas sendo duas α e duas β que possuem quatro grupos prostéticos iguais, compostos ligados permanentemente a proteína que contribui para a função da mesma (Perutz et al. 1960). Para a hemoglobina esse grupo é o heme, existe um heme em cada cadeia polipeptídica, um composto orgânico de estrutura complexa formado por um anel de porfirínico e um átomo de ferro no estado de oxidação $2+$. Esse íon de ferro forma um complexo com o número de coordenação igual a 6 devido as suas quatro ligações com os átomos de nitrogênio pertencente ao anel, uma com o grupo R de um resíduo de histidina e a outra com uma molécula de oxigênio (O_2).

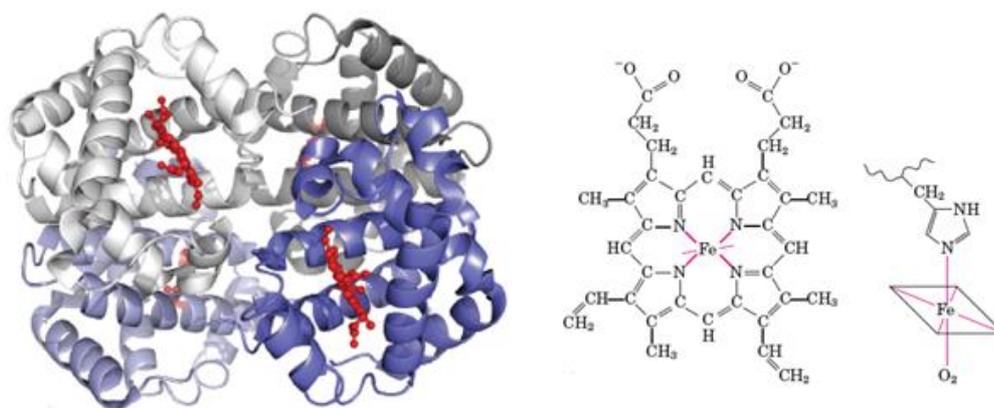


Fig. 3. Hemoglobina em sua estrutura quaternária e o heme. Fonte: Princípios da Bioquímica de Lehninger, 2019.

A interação entre proteína-ligante está sempre relacionada com a conformação da proteína e do seu ligante, ou seja, essa interação sempre pode afetar ou ser afetada pela disposição espacial de ambos. Além disso alguns ligantes tem a propriedade de se ligar de forma cooperativa, por exemplo, a principal função da hemoglobina é o transporte de oxigênio e a ligação que se forma entre ela e o O_2 é um exemplo desse processo, ou seja, à medida que uma molécula de O_2 se liga a conformação da proteína sai do seu estado tenso e muda para o estado relaxado tornando maior a afinidade da proteína pelo seu ligante e conseqüentemente mais fácil a ligação das demais moléculas de O_2 (Brzozowski et al. 1984).

Mesmo tendo essas características de cooperação e mudanças conformacionais, o oxigênio molecular não é o único ligante que pode interagir com o grupo heme e nem o que tem a maior afinidade pelo mesmo. Por exemplo, o heme também está presente em uma proteína terciária conhecida como mioglobina que é encontrada nos músculos e também tem a função de se ligar ao oxigênio, essa proteína foi muito utilizada para desvendar os aspectos funcionais da hemoglobina por ter uma estrutura semelhante com suas subunidades e por isso muita coisa que acontece com a mioglobina também acontece com a hemoglobina, como, por exemplo, o heme da mioglobina tem uma afinidade 200 vezes maior com o monóxido de carbono (CO) do que com o O_2 , e esse é um dos motivos que o CO é considerado tóxico. Entretanto, a geometria linear dessa ligação (Fe-CO) gera

um impedimento estérico entre o átomo de oxigênio e um resíduo de histidina diminuindo, assim, a probabilidade dessa ligação acontecer o que, em contra partida, não acontece com a ligação Fe-O₂ que tem uma geometria angular e que é estabilizada pela formação de uma ligação de hidrogênio entre o O₂ e esse resíduo (Devlin, 2011).

No corpo humano cerca de 96% da hemoglobina que sai do pulmão pelo sangue arterial está ligada ao O₂, sua trajetória pelo corpo começa atravessando o coração e depois para os demais tecidos. Porém após uma volta pelo corpo a saturação de oxigênio da proteína passa a ser cerca de 64%, ou seja, fixando algumas variáveis como temperatura a 37 °C e pressão a 1 atm teríamos que um volume de 100 mL de sangue equivale a 6,5 mL de O₂; isso em termos bioquímicos seria aproximadamente um terço da capacidade da hemoglobina (Nelson & Cox, 2019).

Além disso existem algumas formas de regulação da afinidade da proteína pelo seu ligante, o primeiro é a pressão de O₂ (pO₂) interna do corpo sendo diretamente proporcional a afinidade, a medida que a pressão diminui menor é a afinidade da proteína pelo seu ligante. O segundo é o efeito do pH descoberto por Christian Bohr em 1904 (Jensen et. al. 2004) que descreve como a hemoglobina perde a afinidade com o oxigênio à medida que o pH diminui e o meio fica mais ácido. O terceiro é a regulação pelo aumento da concentração de 2,3-bifosfoglicerato (BPG) que diminui a afinidade da hemoglobina pelo O₂ sendo liberado pelo corpo em condições de altas altitudes onde a pO₂ é menor fazendo com que a proteína libere mais oxigênio (López et. al. 2018); seu sítio de ligação é distante do sítio de ligação do O₂, localizado na cavidade da subunidade β quando a hemoglobina está tensionada.

Na literatura existem vários estudos feitos com essa proteína avaliando o comportamento da hemoglobina frente a uma droga. Paromita et. al. (2018) estudou a capacidade de interação da hemoglobina com o ibuprofeno mostrando que essa droga consegue interagir de forma espontânea. Além desses estudos de interação tem também estudos da própria estrutura da proteína, como, Drescher et al. (2013) que usou da espectroscopia Raman para estudar as mudanças estruturais da hemoglobina relacionando com a determinação do estado de oxigenação do heme em eritrócitos (Eri).

1.4. Sangue

O sangue humano é um fluido corporal constituído por diversos tipos de células,

sendo 55,3% de plasma, 0,7% de células brancas e 45% das hemácias. Para um homem (75 kg) e uma mulher (55 kg) o volume total de eritrócitos é de 2,12 L e de 1,39 L, respectivamente (Aires 1999). Sua função é basicamente o transporte de substâncias, como: oxigênio, monóxido de carbono, produtos metabólicos, hormônios, anticorpos e outros.

As hemácias ou eritrócitos são células vermelhas no formato de discos bicôncavos medindo cerca de 7 μm de diâmetro, tendo um tempo de vida de 120 dias e são produzidas através das células tronco. Em condições normais a quantidade de eritrócitos circulantes é constante. A síntese dessas células é mediada pela secreção da eritropoietina que é uma proteína secretada pelo rim que estimula a diferenciação das células tronco, durante esse processo a célula perde seu núcleo tornando-a a única célula do corpo com essa característica (Berne et. al. 2004), outra característica dessa células anucleadas é a sua incapacidade de se dividir dependendo inteiramente do seu processo de síntese, nele tem o envolvimento do citoesqueleto, uma rede de proteínas formando microtúbulos responsáveis pela estabilidade da célula (Nigra et. al. 2020). Além do mais o metabolismo dessas células é diferente por também não terem mitocôndrias e isso se dá porque a função primordial desta célula está diretamente ligada a função da hemoglobina, de ser transportadora de O_2 , sendo inviável assim consumi-lo através da fosforilação oxidativa (Srivastava et. al. 2017).

Um dos biomarcadores humanos mais adequados para o monitoramento da citotoxicidade por metais é o sangue por ser um material pouco invasivo, em comparação com um pedaço de tecido, e por fornecer células como os eritrócitos e os linfócitos circulantes que são os mais usados para responder a várias perguntas sobre tais efeitos (Branco et al. 2017). Principalmente em estudos de contaminação por metais, sendo as pesquisas mais comuns abordando tal toxicidade advinda por alimentação ou água, bem como através do consumo de produtos comerciais, como cosméticos e vacinas, sendo assim de grande preocupação para a população mundial. Um desses metais que vem sendo bastante estudado é o mercúrio, que tem um tempo de meia-vida de 57 ± 18 dias no sangue, porém o mercúrio só leva cerca de três dias para circular por todo o corpo (me-Ri Lee et. al. 2017).

1.5. Timerosal

Timerosal (TM) é um composto organomercural usado como conservante em dermo-cosméticos e vacinas desde 1930 (Humphrey et al. 2005). O teor de mercúrio corresponde a ~50% do TM em massa, considerado um metal tóxico e bioacumulativo (Carneiro et al. 2014) causando vários problemas biológicos, como, neurotoxicidade e danos nos rins (Bianchini et al. 2019, Choi et al. 2016). Estudos indicam que o TM em um meio aquoso libera etilmercúrio (EtHg^+) que pode sofrer processos de dealquilação se convertendo em outras espécies de mercúrio como metilmercúrio (MeHg^+) e mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) (Barregard et al. 2011). Diferentes espécies de mercúrio podem atravessar a barreira hematoencefálica causando efeitos tóxicos no cérebro, incluindo nocicepção prejudicada (Olczak et al., 2009) e diminuição da população de neurônios e astrócitos causada pelo aumento da citotoxicidade e apoptose (Teixeira et al., 2018). Um possível órgão-alvo das espécies de mercúrio são os rins, onde são observados problemas como apoptose das células renais por vias mitocondriais e pela regulação positiva de Bax agindo pelo menos como um agente pró-fibroso (Carneiro et al., 2015).

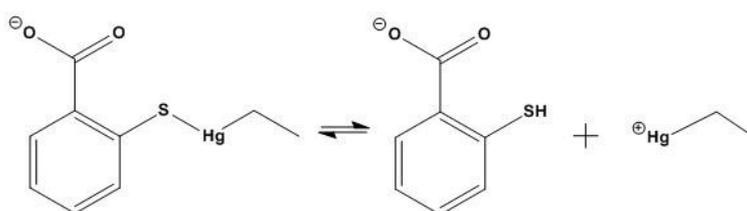


Fig. 4. Dissociação do timerosal em meio aquoso.

Carneiro et al. (2014) fez um estudo toxicocinético realizado com ratos Wistar após exposição a TM para avaliar a distribuição orgânica de mercúrio no corpo do animal, a bioacumulação em função do tempo e a conversão para outra espécie de mercúrio, depois de oito horas de exposição foi quantificado $13,76 \pm 1,48 \mu\text{g}$ de mercúrio total sendo 67% de mercúrio inorgânico e 33% de EtHg^+ . Além disso, há estudos de toxicidade *in vitro* utilizando proteínas de sangue puras, como a albumina sérica, que indicou que o TM induziu mudanças estruturais como o aumento de α -hélice e o aumento das taxas de fibrilação através de interações eletrostáticas do etilmercúrio liberado do TM com os aminoácidos positivos da cadeia (Santos et al. 2018).

Como foi descrito acima, o TM consegue reagir com biomoléculas de forma espontânea e prejudicar essas biomoléculas em seus aspectos estruturais e funcionais.

Outro exemplo de estudo feito nessa área é a da Silva et al. (2020) que descreveu como o TM reage espontaneamente com a Hb formando um aducto de proteína-HgEt que interage com o ácido tiosalicílico causando alterações na estrutura polipeptídica da hemoglobina e gerando produtos de glicação avançadas e agregados proteicos. Portanto, no presente trabalho tivemos como objetivo avaliar a toxicidade do TM contra os eritrócitos humanos, principalmente a hemoglobina, estabelecendo um possível mecanismo responsável pelas mudanças estruturais e morfológicas.

2. Metodologia

2.1. Químicos, reagentes e soluções

Todos os produtos químicos e reagentes foram obtidos comercialmente pela Sigma-Aldrich. A hemoglobina humana (Hb) foi utilizada a 15,4 μM , timerosal (TM) e cloreto de mercúrio (HgCl_2) foram preparados em uma solução de estoque de 2,5 mM. Nos experimentos foi empregado tampão fosfato (10 mM) com NaCl 100 mM, pH = 7,4 \pm 0,1. DTNA (ácido ditodinicotínico) a 325 μM foi utilizado na determinação total do tiol, e NEM (N-etilmaleimida) foi preparado em uma solução de estoque de 2,5 mM.

2.2. Coleta das amostras de sangue

A coleta de sangue dos 13 participantes (CAAE 02840318.2.0000.5013) foi realizada por punção venosa usando tubo de vácuo Olen contendo EDTA-K3 (198 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A idade dos participantes foi em torno de 20,38 \pm 2,02, sem diferenciação do sexo. Para os eritrócitos (Eri) se separarem do plasma, o sangue total foi centrifugado a 2345 g por 10 minutos à temperatura ambiente (\pm 28 °C). Para os ensaios de espectroscopia Raman, os glóbulos vermelhos foram purificados usando tampão fosfato 0,2 M e centrifugados por 3 vezes à 14654 g por 12 min a 4 °C (Drescher et al. 2013). O Eri foi submetido à quantificação total da proteína aplicando o método Bradford (Bradford, 1976) para que todos os traçados tivessem 325 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, e uma solução BSA (3 mg mL^{-1}) foi utilizada como padrão para determinação proteica. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes da doação.

2.3. Ensaio de captação de oxigênio

A captação de oxigênio por Hb humana e eritrócitos foi medida utilizando um eletrodo oxígrafo (Instrumento Hansateh), em uma câmara de vidro de 1,0 ml equipada com um agitador magnético e termostato. A concentração inicial de oxigênio no meio de reação foi de 225 e 200 nmol O₂/ml à 28 e 37 °C, respectivamente (Robinson & Cooper, 1970). Em todos os experimentos, o eletrodo de oxígrafo foi calibrado (zero) com Na₂S₂O₄.

Todo o procedimento com Hb pura foi realizado em ambiente inerte, utilizando argônio (99,9%) para atingir essa condição. A Hb (5 µM) foi solubilizada no tampão padrão e mantida nesta condição sem oxigênio, e o TM foi testado em duas concentrações diferentes (1,25 e 2,50 µM), a escolha foi feita baseada na faixa de concentração usada nos artigos citados desse trabalho.

2.4. Determinação de grupos tióis livres totais

A quantificação de grupos tióis livres totais (expresso em equivalente de cisteína) nas amostras foi realizada utilizando ácido 6 6'-ditiodinicotínico (DTNA). Neste ensaio, foi preparado um branco para cada condição. O NEM foi usado para bloquear grupos tióis, neste caso, a incubação por 5h antes da medição foi necessária. A determinação foi realizada no espectrofotômetro (AJX-6100PC, Micronal) à 344 nm. A cisteína (Cys) foi usada como padrão na curva analítica (1 - 20 µM) para quantificar o teor total de tiol livre.

2.5. Fragilidade osmótica da membrana de Eri

Para a determinação da fragilidade osmótica, foram utilizadas três soluções aquosas de NaCl para simular um meio isotônico (0,9% m/v NaCl) e dois sistemas hipotônicos (0,5 e 0,2% m/v NaCl). O sinal foi registrado em um espectrômetro (AJX-6100PC, Micronal) por 5 min (a cada 15 s) à 540 nm e 28 °C (Cavalcanti et al., 2003). Os resultados foram analisados como variação percentual na densidade óptica.

2.6. Produção EROs em Eri

A geração EROs foi monitorada por espectrofluorometria (RF5300 Shimadzu), utilizando 2,7-Diclorodihidrofluoresceto diacetato (H₂-DCF-DA). Esta sonda ao reagir com qualquer das espécies reativas se oxida formando DCF que é um corante fluorescente

não seletivo que permite quantificar a produção de EROS. Foi monitorado em $\lambda_{ex} = 488$ nm e $\lambda_{em} = 525$ nm, com uma largura de 3 nm para excitação e emissão.

2.7. Espectroscopia Raman de Eri

Os espectros Raman dos eritrócitos foram realizados em um microscópio de fluorescência confocal (LabRamHR Evolution, Horiba, EUA) equipado com um detector de sinapses, um detector CCD refrigerado. Todas as medições foram realizadas usando uma objetiva 50X (NA = 0,80), um laser de diodo CW de 785 nm e um tamanho de spot de ~ 2 μm . A mesma objetiva coletou a luz de espalhamento Raman subsequente após interação com a amostra na geometria de retroespalhamento. A potência do laser irradiado nas amostras foi de cerca de 20 mW, e 10 espectros (30 s de tempo de ação e 30 s de tempo de acumulação) foram coletados de cada amostra em 10 posições de spot diferentes. Todos os experimentos foram obtidos de uma gota de sangue colocado em uma placa de silício, registrado no intervalo 300 - 1800 cm^{-1} a 22 °C. O instrumento Raman foi calibrado usando a banda de fônon de silício (520 cm^{-1}) como uma referência. Para a análise, cada espectro foi processado por correção de linha de base usando a função de processamento do LabSpec6 Raman Software, e então todos os espectros foram importado para o software Origin (OriginPro 2020, EUA) para análise estatística do efeito do TM na Hb presente nas hemácias (Eri). A análise de dados foi baseada no Análise de Componentes Principais (PCA), em que cada espectro coletado teve um algoritmo de correção de fundo por LabSpec 6 e suavizado. Então, espectros individuais são normalizados em relação à área total sob a curva Raman, permitindo uma melhor comparação das formas espectrais e intensidades relativas da banda Raman entre as amostras. Por fim, gráficos bidimensionais foram construídos com uma combinação diferente de pontuações para os dois primeiros componentes principais.

2.8. Microscopia de Força Atômica (AFM)

Os Eri expostos ou não ao TM (2,50 μM por 5 min) foram fixados em paraformaldeído e solução salina tamponada com fosfato (1:1). Em seguida, uma pequena quantidade de Eri foi aderida a poli-L-lisina (PLL, Bio-technie, EUA) em vidro redondo esterilizado de acordo com a descrições do fabricante. As medições das imagens da morfologia celular e elasticidade foram obtidas usando uma configuração AFM padrão (Multiview 4000 TM, Nanonics, Israel) com um microscópio óptico combinado (BXFM,

Olympus, Japão). Esta combinação permitiu o posicionamento lateral da ponta AFM sobre a região nuclear da célula com precisão de escala micrométrica. O sistema AFM foi acusticamente isolado para reduzir qualquer interferência por ruído ambiente durante as medições, e o instrumento foi fixado em uma mesa de amortecimento ativa para suprimir o ruído mecânico. A topografia celular foi de imagens em modo de toque com uma taxa de varredura de 0,3-1 Hz, e as imagens AFM foram processadas com software WSxM (Horcas et. al. 2007). Imagens do AFM também foram usadas para avaliar parâmetros de altura e diâmetro das células. Além disso, a modificação de Sneddon do modelo Hertziano foi utilizado para caracterizar as curvas força-distância a fim de obter o recuo elástico das células (Snnedon et. al. 1965, Hertz 1881). Os experimentos do AFM foram realizados usando um ponta de varredura com um raio de curvatura típico <20 nm, um cantilever de $320 \mu\text{m}$ de comprimento, um constante de mola de $<1 \text{ N m}^{-1}$ e uma frequência nominal de 38 kHz. Do cantilever a constante da mola foi calibrada ajustando o espectro de potência a um harmônico simples oscilador (Burnham et. al. 2003), e a força de indentação máxima para o cantilever foi fixada em 20 nN. As medições da curva força-distância foram realizadas movendo a ponta do cantilever em direção à amostra com uma velocidade de carga constante de $5 \mu\text{m s}^{-1}$. Todas as curvas força-distância experimentos foram realizados com a mesma ponta.

2.9. Estudos teóricos: cálculos de acoplamento

Com o objetivo de entender como acontece a interação entre Hb humana e TM ou EtHgCl, foi usado os cálculos de acoplamento molecular flexível que foi feito em parceria com o grupo do Laboratório de Química Computacional Pople da Universidade Federal de Sergipe (UFS). A estrutura da Hb foi coletada no Banco de Dados de Proteínas – PDB, depositado com o código 1LFL (Biswal, 2002). As estruturas de TM e EtHg⁺ foram otimizadas utilizando o método químico quântico semiempírico PM6 (Stewart et al., 2007). Os cálculos de acoplamento foram realizados no software de Otimização Genética para Acoplamento de Ligand (GOLD), versão 5.3 (Hasan et al., 2019; Jones et al., 1997). Este programa segue um protocolo de acoplamento baseado em um algoritmo genético que explora a flexibilidade conformacional do ligante para os resíduos de interação da ligação de hidrogênio do receptor. Neste tipo de cálculo, os ligantes são considerados flexíveis enquanto o receptor permanece fixo. Os locais de ancoragem foram avaliados utilizando-se a função de condicionamento GoldScore. Esta função de pontuação do

algoritmo genético é um método otimizado para calcular as posições de ligação do ligante. O cálculo é feito usando a seguinte equação:

$$\text{Fitness} = S(hb_{\text{ramt}}) + 1.375 \times S(vd_{\text{mext}}) + S(hb_{\text{int}}) + 1.000 \times S(\text{int}) \quad \text{equação (1)}$$

E

$$S(\text{int}) = S(vdw_{\text{int}}) + S(\text{tors}) \quad \text{equação (2)}$$

Onde $S(hb_{\text{ramt}})$ é a energia de ligação hidrogênio-proteína-ligante; $S(vdw_{\text{ram}})$ é a energia de interação Van der Waals entre proteína e ligante; $S(hb_{\text{int}})$ é a energia de ligação intramolecular de hidrogênio e $S(vdw_{\text{int}})$ é a contribuição devido à tensão torcional intramolecular no ligante (Hasan et al., 2019). A simulação foi realizada através do acoplamento local das estruturas de ligantes e proteínas que foram carregadas no servidor, e o local de acoplamento foi definido com o resíduo dentro de 10 Å de Cys93. A eficiência de busca do algoritmo genético foi definida como "automática", e a opção "rescisão antecipada" foi desativada. O número de "GA runs" foi definido como 100 (SA) e (comprimento de peptídeo \times 10).

2.10. Cálculo da Coordenada de reação

Nesta etapa, as geometrias do estado fundamental TM, EtHgCl e Cys foram calculadas usando o método PM6 semi-empírico (Stewart et. al. 2007). Este mesmo modelo também foi usado para a completa otimização da geometria Hb humana. Em seguida, as reações de coordenação foram realizadas usando o software MOPAC2016 (Stewart, 2016). As palavras-chave utilizadas foram: PM6 (PM6 Hamiltoniano), XYZ (selecionou o sistema de coordenadas cartesianas), GNORM = 0,0001 (saída do comando quando a norma de gradiente caiu para abaixo de 0,0001). Coordenação entre os ligantes e o fragmento Cys ou Hb livre foi realizado através da aproximação entre ambos, onde a distância assumiu 110 valores, variando de 12 a 1,1 Å, diminuindo para 0,1 Å em cada etapa. Cálculos envolvendo Cys, tanto ele quanto os ligantes, foram mantidos livres durante a abordagem; portanto, ângulos e distâncias dos átomos para os sistemas foram permitidos variar livremente. Para cálculos envolvendo a proteína, apenas os ligantes foram mantidos livres. Esta decisão foi tomada para fazer o cálculo do tempo de processamento em nosso cluster viável.

2.11. Análise estatística

Os dados representam a média \pm erro. As comparações estatísticas foram realizadas por análise unilateral de variância (ANOVA unilateral) empregando Dunnett ou Tukey como pós-teste. Para todos os resultados de AFM, os dados são expressos como média \pm desvio padrão (SD). Para mostrar que todos os dados foram normalmente distribuídos, um teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizada, e a significância estatística das diferenças no diâmetro e altura parâmetros e o módulo de elasticidade entre dois grupos de células foi avaliado usando um teste t de Student independente de duas amostras com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Efeito do TM na captação de oxigênio em Hb e Eri humanos

Primeiramente avaliamos a função primária da hemoglobina humana, que é a ligação com oxigênio, na presença de TM. Com a finalidade de ampliar tal investigação, avaliamos essa função utilizando algumas variáveis como uma incubação de 5 min entre Hb e TM; também observamos outro ponto, a temperatura, por isso estudamos o efeito do TM na Hb a 28 e 37 °C. Nos primeiros resultados já observamos que o TM leva a uma diminuição na captação de oxigênio, e esse comportamento foi dependente da concentração (**Fig. 5A e 5B**). A temperatura de 37 °C foi a condição que leva ao esgotamento mais significativo na função de hemoglobina em se ligar ao oxigênio. Os resultados utilizando os 1,25 e 2,50 μM de TM, diminuem a captação de oxigênio da Hb em torno de 41% e 58%, respectivamente, quando comparados ao controle (**Fig. 5A e 5B**). Recentemente, nosso grupo comprovou que o mecanismo de ação do TM na Hb humana é através de grupos sulfidrilas livres (Cys93) (Silva et al., 2020). Para reforçar esse achado, realizamos experimentos de captação de oxigênio na presença do TM utilizando NEM, um bloqueador de grupos tiol. Como nossos resultados foram mais significativos nessas condições experimentais de TM (1,25 μM) e 5 min de incubação, realizamos este experimento fixando essas condições. Os resultados mostraram uma melhora na captação de oxigênio de 27% (5 min) ao comparar os sistemas Hb-TM sem bloqueador de tiol e previamente incubado com NEM (**Fig. 5C e 5D**).

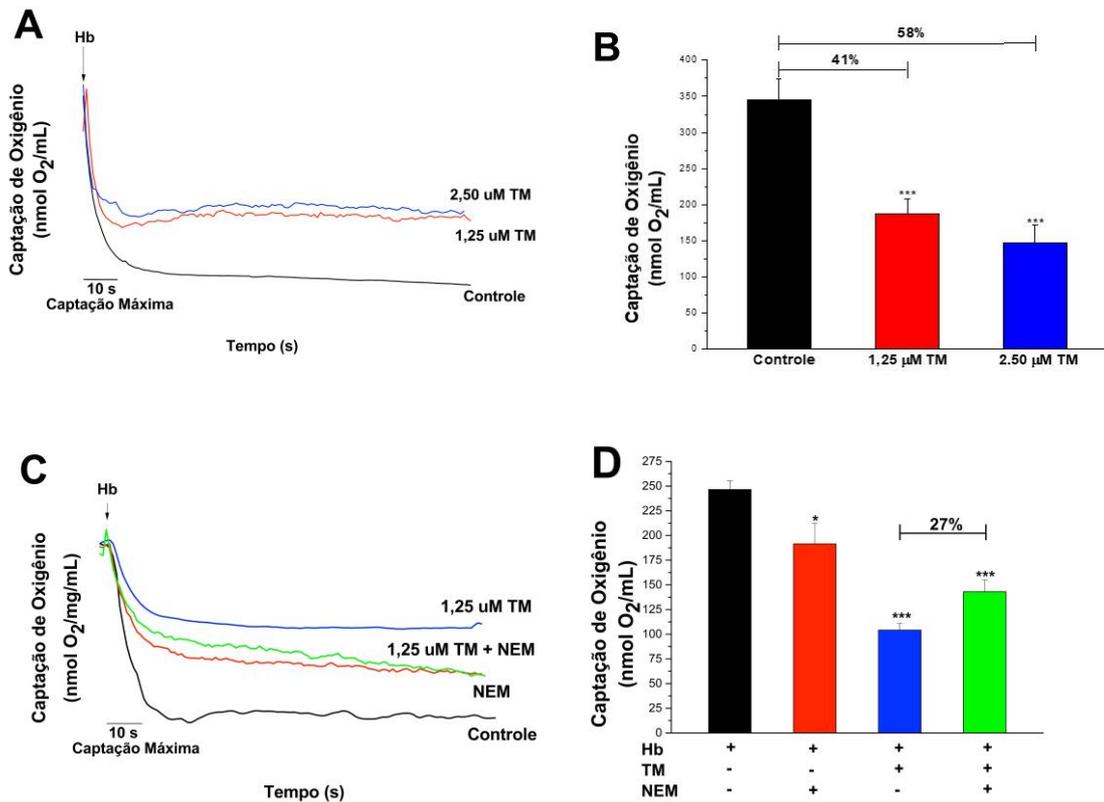


Figura 5. Hb exposta ao TM possui baixa capacidade de captação de oxigênio. (A) Linha representa o consumo de oxigênio dos grupos Controle e Hb exposta a 37 °C. (B) Quantificação da capacidade máxima de consumo de oxigênio durante 10 s, ***p <0,0001. (C) Linha representa o consumo de oxigênio dos grupos Controle e Hb a 28 °C na presença do NEM. (D) Quantificação da capacidade máxima de consumo de oxigênio durante 10 s nas condições experimentais relacionadas, ***p <0,0001. As setas indicam a adição da Hb. Os dados representam cinco experimentos independentes realizados em duplicata. ANOVA one way foi aplicada com Dunnett's e Tukey como pós-teste, respectivamente.

Diante de tais resultados decidimos investigar os efeitos do TM na fonte natural de Hb, o eritrócito humano (célula vermelha). Tendo um sistema complexo como células, os achados mostraram que à 28 °C tanto na maior concentração de timerosal (2,50 μM) quando na menor (1,25 μM) houve uma redução 51% e 38% respectivamente na captação de O₂ (Fig. 6A e 6B). Quando avaliado os resultados de captação de oxigênio à 37°C, a redução para 2,50 μM foi de 61% , e para 1,25 μM a redução foi de 50% (Fig. 6C e 6D). Mostrando-nos que a maior concentração causou a redução mais acentuada na absorção

de O₂. Um experimento controle foi feito usando HgCl₂ com Eri à 37 °C (5 min), e esses resultados foram dose-dependente, semelhante àqueles que encontraram para TM com inibições de 53% (1,25 μM) a 62% (TM 2,50 μM) (**Fig. 6E e 6F**).

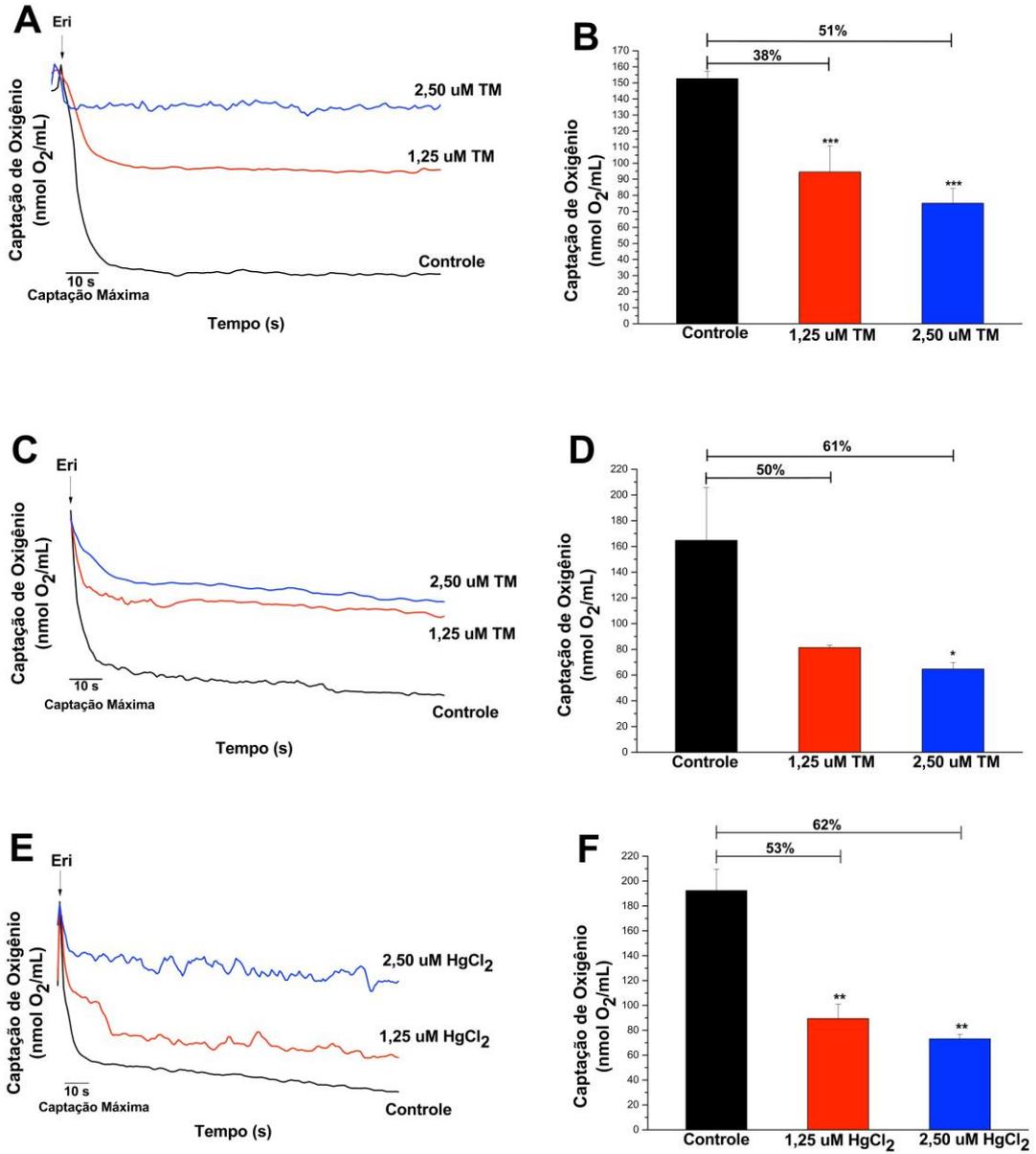


Figura 6. Eritrócitos expostos ao TM possuem baixa capacidade de captação de oxigênio. (A) Linha representa o consumo de oxigênio dos grupos Controle e Eri exposta a 28 °C. (B) Quantificação da capacidade máxima de consumo de oxigênio durante 10 s, ***p <0,0001. (C) Linha representam a captação de oxigênio dos grupos Controle e Eri exposta a 37 °C. (D) Quantificação da capacidade máxima de consumo de oxigênio durante 10 s, *p <0,0512. (E) A linha representa o consumo de oxigênio dos grupos Controle e Eri exposta a 37 °C usando HgCl₂. (F) Quantificação da capacidade máxima de consumo de oxigênio durante 10 s usando HgCl₂, **p <0,0025. As setas indicam a adição da Eri. Os dados representam pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. ANOVA one way foi aplicada com Dunnett como pós-teste.

3.2. Conteúdo de tiol livre total em Hb e Eri

Para provar que o possível mecanismo do TM em se ligar à hemoglobina é via tiol livre (Cys93), foi utilizado o DTNA como sonda espectrofotométrica. Neste conjunto de experimentos, NEM foi empregado como um controle (como um bloqueador de tiol); esta condição foi usada anteriormente em experimentos de consumo de oxigênio. Vale ressaltar que as amostras de Eri foram incubadas 5h antes de adicionar TM (após 5 min de incubação). Assim, conteúdo de tiol livre foi determinado com e sem a adição de NEM. A média das concentrações de tiol livre na presença de TM (sem NEM) foram $83,5 \pm 21,2$ e $52,7 \pm 25,3 \mu\text{M mg}^{-1}$ de proteína para Hb e Eri humanas, respectivamente (**Figura 7A e 7B**). Em contraste, esses sistemas na presença do bloqueador de tiol, as concentrações médias reduziram para $14,9 \pm 0,1$ e $21,8 \pm 4,8 \mu\text{M mg}^{-1}$ de proteína respectivamente. O conteúdo de tiol nos sistemas Hb + TM ou Eri + TM foram atribuídos à liberação de ácido tioalíclico (TSA) do TM, contribuindo para a concentração de tiol, uma vez que o DTNA não é uma sonda seletiva (para tiol aromático ou alifático). Desta forma, o NEM foi empregado para bloquear o livre tiol e provar que o TM reage através de resíduos Cys livres.

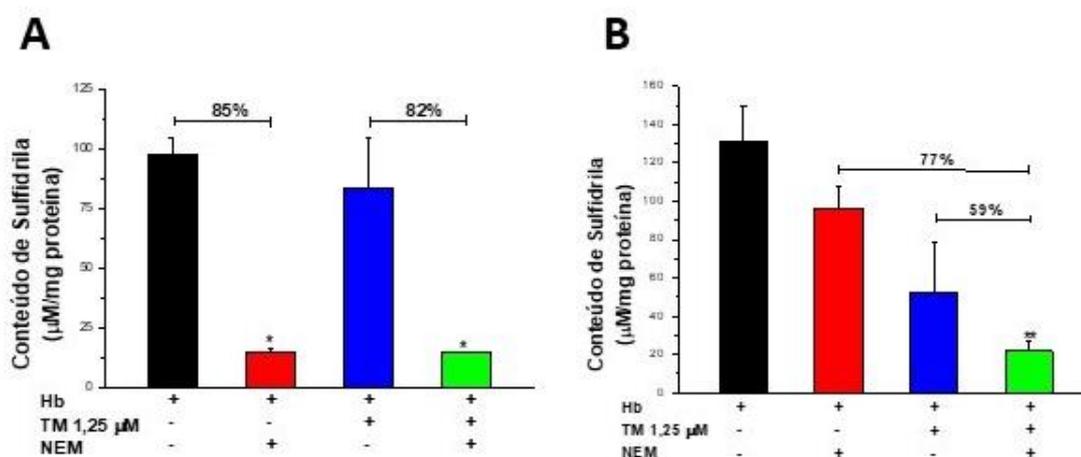


Figura 7. Conteúdo de tiol em Hb e Eri humanos. Quantificação de grupos tiol de Hb (A) e Eri (B) reduzidos incubados por 5 min com TM (* $p < 0,0040$ e ** $p < 0,0002$), respectivamente. Este conjunto de experimentos foi realizado a 28 °C, incubado por 5 min com TM (1,25 μ M) e, quando indicado, NEM. Os dados representam pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, respectivamente. ANOVA one way foi aplicada com Dunnett como pós-teste.

3.3. Fragilidade de membrana dos Eri na presença do TM

Tendo em vista os resultados apresentados, observamos que o TM é capaz de atravessar a membrana dos Eri e reagir com as Cys livres da Hb sem a necessidade de qualquer agente permeabilizante, dessa forma, o TM pode causar algum dano na membrana. Assim avaliamos a fragilidade osmótica do Eri contra três concentrações diferentes de NaCl, uma isotônica e duas hipotônicas. As células foram previamente incubadas com TM (1,25 e 2,50 μ M) por 3 ou 5 min em temperatura ambiente (28 °C). Cada condição (0,2; 0,5 e 0,9% m/v) foi avaliada em função do tempo (s). A fragilidade da membrana não foi afetada pelo TM em nenhuma das condições testadas (**Figuras 8A-C**). Diante de tais resultados, provavelmente, as concentrações de TM usadas em nossos estudos são incapazes de causar danos à membrana dos eritrócitos.

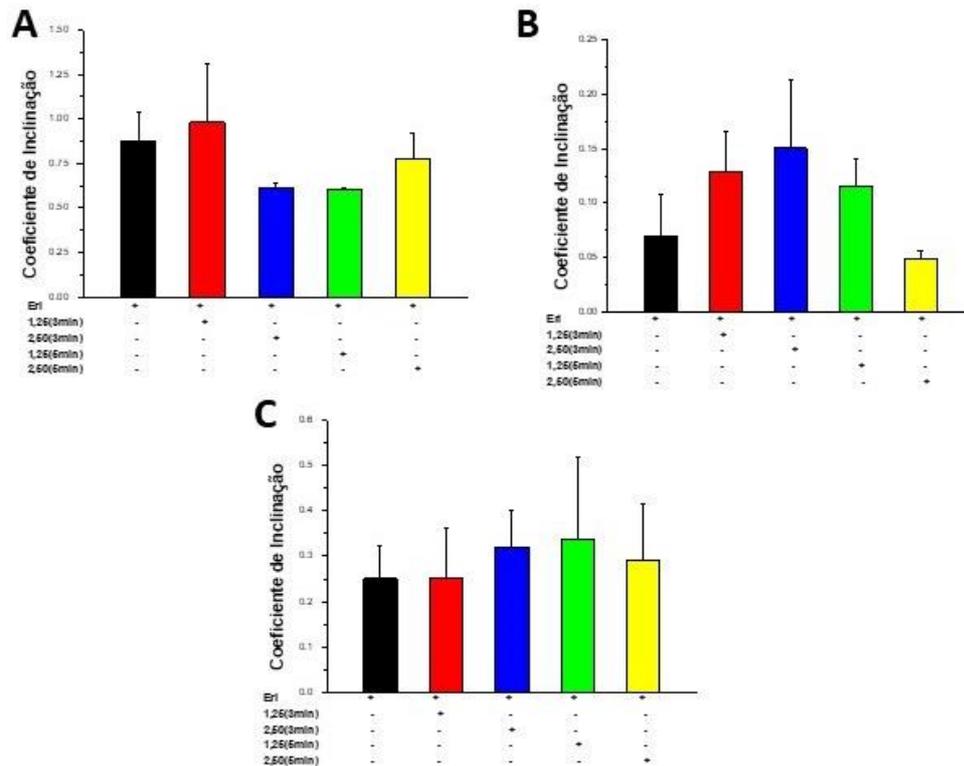


Figura 8. Fragilidade da membrana em Hb e Eri humanos. (A) meio hipotônico (NaCl 0,2% m/v, $p=0,5203$) (B) meio hipotônico (NaCl 0,5% m/v, $p= 0,3745$) (C) meio isotônico (NaCl 0,9% m/v, $p= 0,9793$). Os dados representam pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, respectivamente. ANOVA one way foi aplicada com Dunnett como pós-teste.

3.4. Efeito do TM na produção de ROS em Eri

Vários estudos mostram que as espécies de mercúrio podem levar a um aumento na produção de EROS em sistemas biológicos (Ahmad et al. 2019). Dessa forma, decidimos investigar a produção da espécies reativas em Eri causada pelo TM. Eri foram incubados por 5 min com TM (1,25 e 2,50 μM) em temperatura ambiente. Nas concentrações de TM avaliadas, a produção EROS não difere significativamente (**Fig. 9**).

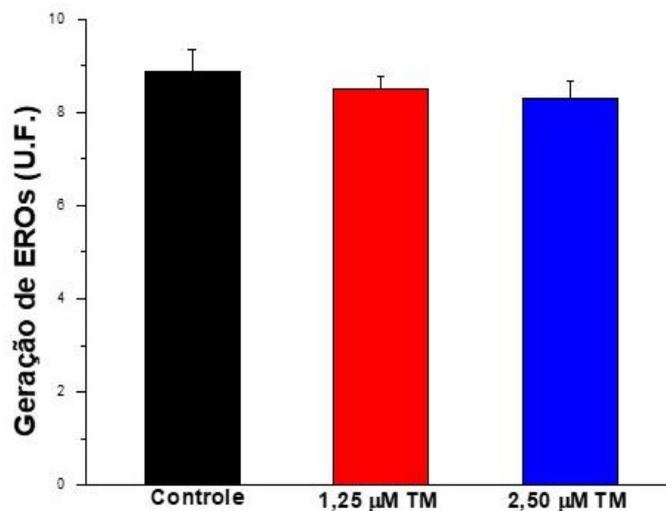
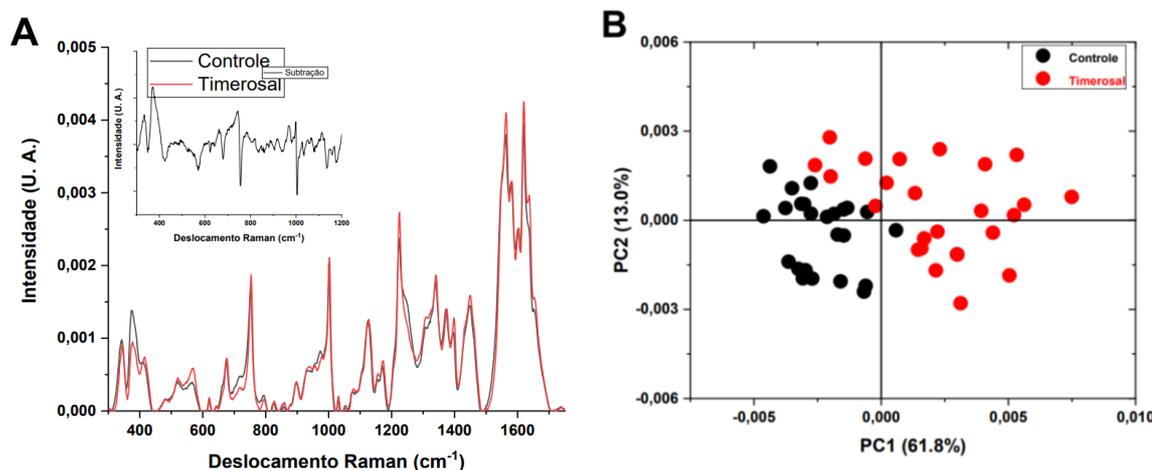


Figura 9. Geração de EROs em Hb e Eri humanos. (F) Quantificação da geração de EROs em Eri humano. Os dados representam pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, respectivamente. ANOVA one way foi aplicada com Dunnett como pós-teste.

3.5. Espectroscopia Raman aplicada no Eri

Para entender melhor os efeitos do TM e avaliar se ele causa mudanças em algumas biomoléculas dos Eri, usamos a espectroscopia Raman para detecção em duas situações diferentes: controle (Eri sem TM) e as células tratadas (Eri exposto ao TM à 107,4 mg/mL). Os espectros Raman do controle e dos tratados foram normalizados na faixa de 300-1800 cm^{-1} sob excitação do laser de 785 nm (**Figura 10A**). Como esperado, os picos Raman dos Eri são predominantemente originados da Hb intracelular, lipídios de membrana e outras proteínas, muitos anéis pirrólicos (1400-1300 cm^{-1}), bandas de porfirina (674 e 752 cm^{-1}), bandas associadas a ligação Fe-O₂ (~570 cm^{-1}) e também foram observados modos de vibração associados com a deformação CH₂/CH₃, principalmente das cadeias laterais de aminoácidos, de lipídios ou de proteína de membrana (~1450 cm^{-1}) e ainda no aminoácido fenilalanina (proteínas ~1003 cm^{-1}). As atribuições da banda inteira, coordenadas da banda local e componentes celulares obtidos dos Eri sob excitação de laser de 785 nm estão resumidos na **Tabela 1**. Conforme exibido na **Figura 10A**, há uma grande semelhança entre o padrão de intensidades vibracionais e frequências de cada espectro Raman médio, porém quando os espectros Raman das células de controle e tratadas são cuidadosamente comparadas, mudanças na intensidade

relativa e pequenos deslocamentos espectrais podem ser observados para alguns modos vibracionais. Para ficar mais claro, a inserção na **Figura 10A** exibe a diferença do espectro Raman de controle versus células tratadas e a variabilidade da intensidade dos picos é claramente evidente. No entanto, a inspeção visual não é suficiente para resolver pequenas e complexas diferenças nos espectros Raman. Neste contexto, usamos métodos multivariados, como PCA, para se tornar uma ferramenta útil para discriminação de dados espectrais. A análise foi realizada nos dados espectrais Raman pré-processados de ambos os glóbulos vermelhos de controle e tratados, **Figura 10B** mostra o gráfico de dispersão dos primeiros dois componentes principais, considerando apenas duas dimensões do domínio transformado, ou seja, PC1 e PC2. Como pode ser observado, o gráfico de pontuação das células de controle PC1 e PC2 facilmente distintas (pontos pretos) das células tratadas com TM (pontos vermelhos), indicando diferenças espectrais significativas entre eles. PC1 foi o principal contribuinte (61,8%); enquanto o PC2 ocupava (13%). Para a determinação da capacidade de distinção do PCA e a identificação de importantes recursos do Raman, o perfil de carregamento do PC1 onde mostra as influências positivas e negativas da droga sob o espectro é mostrado na **Figura 10C**. O gráfico de carregamento mostra a região dos espectros Raman onde são evidentes as diferenças entre o controle e as células tratadas. A partir do carregamento de correlação positiva de PC1 foram observados que em 415, 520, 569, 622, 676, 1078 e 1125 cm^{-1} são as regiões onde espera-se que o TM causa grande influência nas propriedades conformacionais dos Eri, bem como na ligação Fe-O₂ e nos modos de alongamento vibracionais dos lipídios de membrana. É importante enfatizar que estes picos no gráfico de carregamento estão de acordo com os espectros Raman originais e têm pesos consideráveis para discriminação entre as células de controle e tratadas.



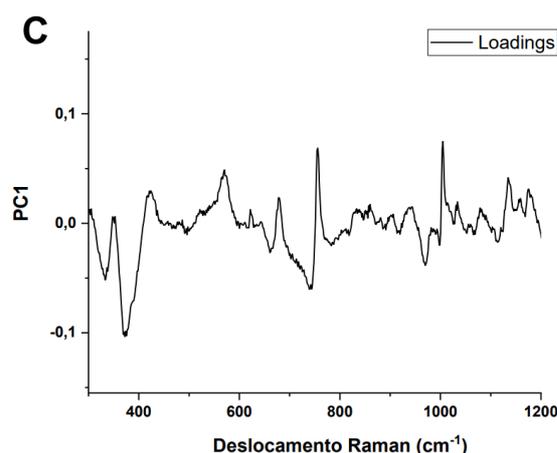


Figura 10. Análise de espectroscopia Raman de Eri. (A) Espectros Raman do controle (linha preta) e tratadas (linha vermelha). A inserção mostra a diferença entre os espectros Raman (tratados com controle). (B) Os gráficos de PCA mostram a discriminação de dados com base nas células de controle (pontos pretos) e nas células tratadas (pontos vermelhos). A variação percentual capturada por cada PC é mostrada entre parênteses ao longo de cada eixo. (C) O carregamento do gráfico PC1 para as células controles e tratadas. Os dados representam pelo menos três experimentos independentes realizados em 10 aquisições cada.

Tabela 1. Atribuições dos sinais Raman obtidos dos glóbulos vermelhos (Eri) sob excitação de 785 nm. Coordenadas e atribuições são baseadas nas referências: Drescher et. al. 2013, Atckins et. al. 2017, Premasiria et. al. 2012.

Posição da Banda (cm^{-1})

Controle (Eri)	Exposto (Eri + TM)	Mudança espectral (controle para exposto)	Atribuições vibracionais	Atribuições dos componentes celulares
341	346	+	γ_8	
375	375		$\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{C}_\alpha)$	
411	415	+	$\text{TM}(\text{Fe-O-O})$ dobra	
564	570	+	(Fe-O-O) alongamento	
675	676	+	$\text{TM}(\text{pyr deform})_{\text{sim}}, \gamma_7$	
752	753	+	γ_7 (pyr respirando), γ_{15}	

942	942		γ_{46}	
895	898	+	p:C-C esqueleto	
1001	1003		$\text{TM}(\text{CH- anel no plano})_{\text{sim}}$ (Phe)	
1029	1032	+	δ (=CbH ₂) _{assim}	Phe: deformação CH do anel no plano
1125	1127	+	γ (C [⊖] -Metil), γ_5	
1170	1173	+	γ (pyr meio anel) _{assim} , γ_{30} (deoxiHb)	
1223	1224	+	$\text{TM}(\text{CmH})$, γ_{13} ou γ_{42}	Proteínas: C–N alongamento e C–C alongamento
1311	1308	-	$\delta(\text{CmH})$, γ_{21}	
1338	1339	+	$\nu(\text{pyr meio anel})_{\text{sim}}$, γ_{41}	Proteínas: $\text{TM}(\text{CH})$; CH ₂ , CH ₃
1372	1375	+	$\nu(\text{pyr meio anel})_{\text{sim}}$, γ_4 (oxiHb)	Proteínas, lipídeos: $\text{TM}(\text{CH}_3)_{\text{sim}}$
1394	1398	+	$\nu(\text{pyr um quarto de anel})$, γ_{20}	Proteínas: COO ⁻ alongamento simétrico
1447	1449	+	$\text{TM}(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$	Lipídeos: $\text{TM}(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$
1561	1564	+	γ (C [⊖] C [⊖]), γ_{11}	Proteínas, lipídeos: amida II
1579	1583	+	$\nu(\text{C}\alpha\text{Cm})_{\text{assim}}$, γ_{37}	Trp
1601	1604	+	γ (Ca=Cb), γ (C=C) _{vinil}	Phe
1619	1620	+	γ (Ca=Cb), γ (C=C) _{vinil}	Tyr
1638	1638		ν_{10} , $\nu(\text{C}\alpha\text{Cm})_{\text{assim}}$	Amida I (α)
1654	1652	+		proteínas, lipídeos: amida I,

Como mencionado o Eri é composto de varias biomoléculas, e para estimar as modificações conformacionais e mudanças de lipídios da membrana dos Eri devido a presença do TM, escolhemos as bandas estruturalmente sensíveis na região de 1000-1300 cm^{-1} . Nesta região, o pico em torno de 1125 cm^{-1} origina-se dos lipídeos na conformação trans e as bandas em torno de 1078 cm^{-1} são atribuídas às conformações gauche. Para este efeito, a razão I_{1125}/I_{1078} foi usada para monitorar a transição de fase da membrana eritrocitária. Os valores estão resumidos na **Tabela 2**. Como pode ser observado a proporção de até 24% após a membrana celular interagir com timerosal. Conforme relatado na literatura, esta diminuição pode indicar algumas modificações na composição da membrana, desorganização no empacotamento da cadeia lateral e um aumento no

número de conformações gauche das células tratadas em comparação com as células de controle.

Tabela 2: Razão de intensidade de pico I_{1125}/I_{1078} antes e depois dos Eri interagirem com o Timerosal.

Grupos		Proporção de mudanças
Controle	5,17	-
TM	3,95	24%

3.6. Propriedades biomecânicas dos eritrócitos

Para analisar o efeito do TM na morfologia dos Eri empregamos microscopia de força atômica (AFM), uma ferramenta poderosa que permite observar as características nanoestruturais e propriedades biomecânicas de amostras biológicas, incluindo células, biomoléculas e biomateriais (Bozna et. al. 2011, Shi et. al. 2013). Nossos resultados mostraram que o controle Eri (sem TM) exibiu uma forma arredondada com uma superfície lisa (**Figura 11A**). Embora o Eri na presença de TM também possua uma forma arredondada, a superfície era bastante rugosa (**Figura 11B**). Com base nas imagens obtidas do AFM, analisamos a distribuição em relação aos parâmetros de diâmetro e altura das células na presença e na ausência do TM. O Eri tratado com TM apresentou um diâmetro maior em relação ao controle (**Figura 11C**), o qual apresentou valores médios de diâmetro de $8,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (TM) e $7,9 \pm 0,9 \mu\text{m}$ (controle). Além disso, analisando as alturas dos Eri, encontramos que as células tratadas com TM apresentaram uma altura inferior do que o controle. Estes dados corroboram com a análise morfológica descrita a partir das imagens do AFM (**Figuras 11A e 11B**). Além da morfologia, também avaliamos a elasticidade dos Eri usando módulo de Young. Esta propriedade biomecânica pode inferir o estado fisiológico e/ou doentio de células (Lee et. al. 2007, Wu et. al. 2009). Ajustamos o modelo Hertz às curvas força-deslocamento (**Figura 11D**), diante disso nossos resultados mostraram que o controle Eri exibiu um valor médio de módulo de Young de $50,9 \pm 10,0 \text{ Pa}$, enquanto o sistema exposto ao TM foi de $43,3 \pm 8,3 \text{ Pa}$ (**Figura 11E**), revelando uma diminuição de 14,9% nos valores do módulo de elasticidade. Esses resultados sugerem que existe uma correlação entre as mudanças morfológicas e a

elasticidade dessa célula, uma vez que se sabe que os componentes da membrana, como lipídios e proteínas são cruciais na determinação da elasticidade celular.

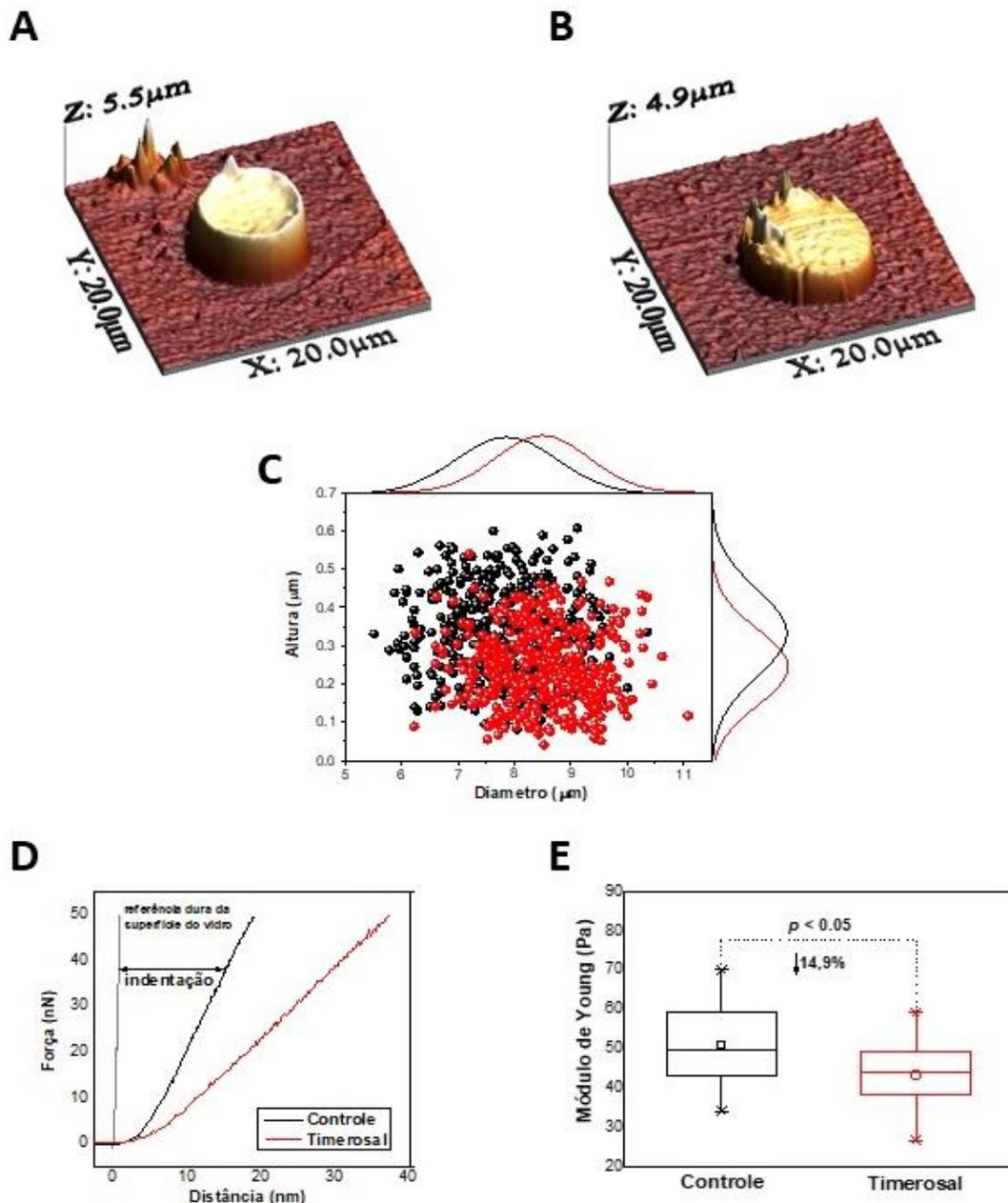


Figura 11. Experimentos de microscopia de força atômica (AFM). (A) Imagens representativas AFM do Eri controle e (B) tratadas com TM. (C) Distribuição das células em relação para diâmetro e altura. (D) Exemplo das curvas força-distância geradas usando AFM. (E) Boxplots do módulo de Young do Eri na ausência (controle) e presença de TM. O módulo de Young médio é mostrado pela linha horizontal dentro de cada caixa. Os dados de 7C e 7E representam pelo menos quatro experimentos independentes realizados 70 medições cada. O teste t de Student para amostras não pareadas foi aplicado, *p < 0,05.

3.7. Cálculos de Acoplamento

Com a reforçar nossos dados realizamos experimentos teóricos, onde foi observado que o TM atinge uma distância de 4,5 Å da Cys93 na Hb e apresenta energia de interação de 20,65 kcal mol⁻¹ (**Figura 12A**), além dos grupos heme, alteraram sua estrutura, corroborando com resultados experimentais anteriores (**Figuras 12B e 12C**). Um segundo estudo de ligação foi então realizado para entender como a interação entre EtHg⁺ e a Cys93 ocorre. O EtHg⁺ atingiu uma distância de 2,2 Å da Cys93 presente na Hb com a energia de interação de 13,44 kcal mol⁻¹ (**Figura 12D e 12E**). O docking também mostra que a estabilização hidrofóbica do grupo EtHg⁺ por aminoácidos (Cys93) o que também foi observado ao encaixar a molécula de EtHg⁺ livre (**Figura 12F**) e foi confirmado que o heme é distorcido em um movimento de translação. Além disso, a proteína sofreu alteração em sua estrutura, apresentando RMSD = 7.382 Å. Em ambas simulações (Hb com TM e EtHg⁺), foi possível comprovar alterações estruturais da proteína induzido pelos ligantes avaliados. Por fim, observamos que a interação ocorre com EtHg⁺ e Cys livres nesses sistemas, liberando o grupo ácido tiossalíclico.

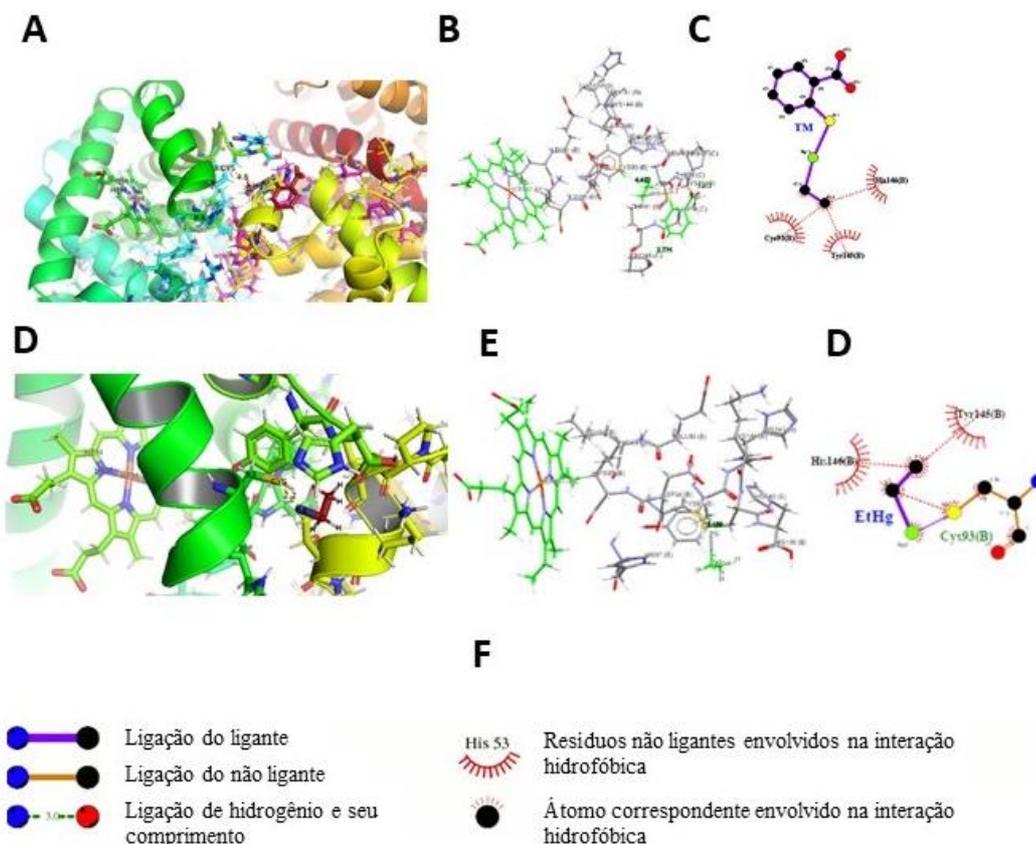


Figura 12. Docking molecular das mudanças da Hb na presença do TM. A) e B) Os encaixes moleculares com Timersal são exibidos como as representações de fitas, bolas e paus. C) Ligplot mostrando a interação hidrofóbica entre Tyr145, His146, Cys93 (mostrado em vermelho) e o TM. D) e E) Docking molecular da hemoglobina com EtHg⁺ é exibido como representações de fitas, bolas e paus. F) Lig plot mostrando a interação hidrofóbica entre Tyr145, His146 (mostrado em vermelho) e EtHg⁺, bem como, a ligação química entre EtHg⁺ e Cys93.

A distorção do grupo heme é outro fator que afeta a propriedade biológica da Hb (Horta et. al. 2011), conforme comprovado nos resultados experimentais. As simulações de computador realizadas sugerem que quando o EtHg⁺ ou o TM estão presentes no sistema Hb, o grupo heme muda devido à uma distorção causada por um movimento de translação (Figura 13).

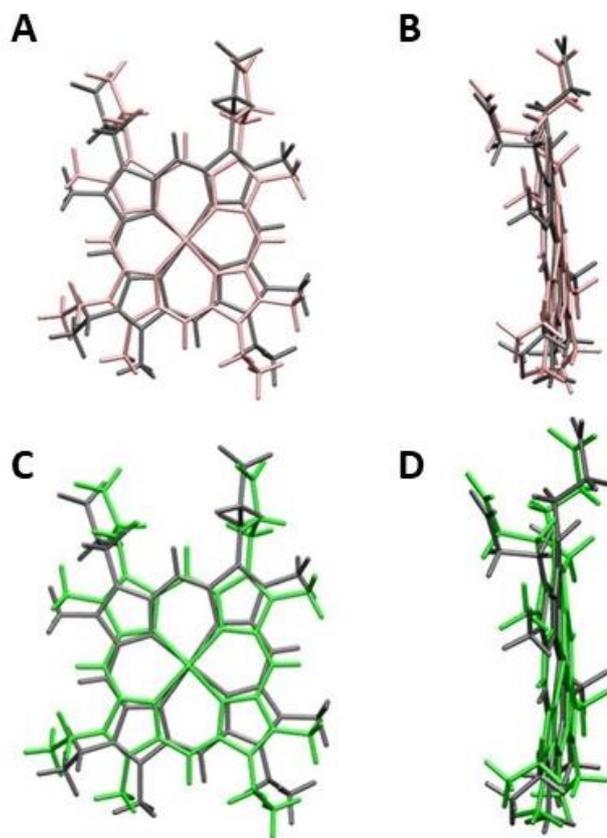


Figura 13. A perda da planaridade no sistema Hb. A) e B) Sobreposição dos grupos hemes do pós-docking com o Timerosal (em rosa) e a Hb extraída do PBD (em cinza). **C) e D)** Sobreposição de grupos hemes do pós-docking com EtHg^+ (em verde) e a Hb extraída do PBD (em cinza).

4. Discussão

Está muito bem documentado que as espécies de mercúrio têm maiores efeitos tóxicos sobre o sistema biológico, como, por exemplo, no organismo humano; este metal e seus compostos têm mostrado uma afinidade por alguns tecidos e órgãos, como cérebro, músculos, rins e coração (Carneiro et. al. 2014); portanto, o uso do TM é motivo de preocupação. Janzen et. al. (2011) demonstrou que o TM em meio aquoso se dissocia em ácido tiosalicílico e EtHg^+ , o último reage com a Hb. As espécies de mercúrio têm uma alta afinidade com compostos de enxofre, e nosso grupo anteriormente já tinha provado que o TM pode se ligar a proteínas humanas (albumina) através de resíduos Cys livres com base em estudos biofísicos experimentais (Santos et. al. 2018).

Portanto, no presente estudo, verificamos a influência da concentração do TM, temperatura e tempo de incubação, usando dois sistemas comparativos com diferentes

graus de complexidade, Hb e Eri humano. As variáveis escolhidas são cruciais para a verificação da função da proteína de forma sistemática. Em geral, como esperado, foi observado que em alta concentração de TM (2,50 μM), 5 min de incubação à 37 °C houve uma redução na capacidade da Hb de se ligar ao O₂. Nosso trabalho anterior com Hb humana revelou que a razão estequiométrica entre Hb e TM é de 1:2, e como nessa proteína duas Cys93 são altamente reativas, sugerimos que a ligação ocorre nesses resíduos (Silva et. al. 2020). A temperatura da reação foi fundamental para o aumento dos danos causados pelo TM e isso está diretamente relacionado com a cinética da reação que é favorecida com o aumento da mesma, visto que, a uma temperatura fisiológica (37 °C) a hemoglobina possui uma dinâmica maior favorecendo a reação entre ela e o O₂ e conseqüentemente mais propensa ao ataque do timerosal (Mairbaur et. al. 2012). Porém, essa maior afinidade pelo seu ligante é perdida sendo resultado da distorção dos hemes em um movimento de translação. Mudanças de conformação em proteínas como a formação de aducto e desnaturação são bem conhecidos. Wang et. al. (2016) mostrou que o sulfonato de perfluorooctano causou danos no sangue humano, induzindo a desnaturação da Hb e desestabilizando a estrutura da proteína.

Para fins comparativos, realizamos um experimento de controle usando HgCl₂, concluindo que os resultados usando TM ou HgCl₂ são estatisticamente semelhantes. Assim, o TM mostra toxicidade semelhante ao mercúrio inorgânico neste modelo experimental, no que diz respeito à redução da capacidade da Hb de se ligar ao oxigênio. Vale ressaltar que o mercúrio inorgânico é tóxico para Eri devido à sua capacidade de inativar o transporte de oxigênio pela Hb (Ahmad et. al. 2019). Além disso, o uso de um bloqueador de grupos -SH (NEM) provou o envolvimento de tiol, mostrando uma influência benéfica sobre o transporte de O₂, o que melhora nossa hipótese de que algumas Cys vicinais estão envolvidas em mudanças estruturais na Hb e que levam a uma mudança fundamental em sua função primária.

Dando continuidade aos conhecimentos dos efeitos danosos do TM, verificamos se tal composto poderia levar a qualquer variação na fragilidade da membrana dos Eri, realizamos experimentos olhando para os desafios da osmolaridade, mas para nossa surpresa, a fragilidade não varia significativamente na presença do TM. Porém, dados do nosso grupo (Silva-Filho et. al. 2021) em que pessoas foram expostas a ambientes poluídos, incluindo altos níveis de mercúrio na água por um longo tempo (anos), apresentaram diferenças estatísticas neste parâmetro. Nesse contexto, Suwalsky et al. (2016) mostra que a exposição de Eri ao TM à 40 μM prejudicou a membrana de tais

células. Nesse mesmo sentido Okuda et al. (1976) mostram que após 12 dias de exposição ao metilmercúrio, as mudanças na morfologia dos eritrócitos e fragilidade mostraram aumentos significativos em ratos Wistar.

O mesmo acontece com a produção de EROs, devido ao curto tempo de exposição nossos resultados mostraram que não existe nenhuma diferença significativa. Entretanto, já é muito bem documentado que uma das vias de danos causados por mercúrio é pela via de produção dessas espécies (Chin Chan et. al. 2017). Assim como Teixeira et. al. (2018) mostraram que os danos causados pelo mercúrio (HgCl_2) no cérebro é consequência da produção de EROs gerando uma condição de estresse oxidativo. Dessa forma podemos afirmar que a via que o timerosal toma para gerar os danos descritos não é pela via de produção de EROs e sim pela interação com as cisteínas da proteína.

Nesse contexto, para reforçar esses dados, experimentos foram realizados utilizando a espectroscopia Raman. Uma técnica que pode encontrar modificações em biomoléculas usando células com e sem interrupção mecânica ou agente químico. Os modos vibracionais de Hb obtidos com excitação a laser de 785 nm foi descrita anteriormente (Drescher et. al. 2013). O resultado do PCA obtido descreve que o TM provoca dispersão da amostra e, conseqüentemente, altera os espectros de cada grupo, o que significa que a exposição do Eri ao TM causa mudanças conformacionais na hemoglobina intracelular, lipídios da membrana dos eritrócitos e nas proteínas de membrana dessas células. De forma semelhante aos nossos resultados, Jin et. al. (2004) descobriram que uma variação na cadeia α da hemoglobina leva a um comprometimento no transporte de oxigênio, esta mudança fisiológica foi esclarecida examinando em espectroscopia Raman distorções da estrutura heme causadas por um deslocamento do ferro do heme em coordenação com uma tirosina específica.

Nos espectros Raman dos Eri na presença de TM foi possível ver deformação nas cadeias laterais de aminoácidos e também alterações nos lipídios da membrana, provavelmente afetando os fosfolipídios, uma das biomoléculas mais abundantes nas membranas celulares. Neste sentido sobre alterações de membrana e alterações causadas por TM, avaliamos as alterações morfológicas usando AFM. Esta técnica fornece uma plataforma multifacetada para caracterizar propriedades biofísicas das células. A exposição ao TM causou mudanças morfológicas no Eri, uma vez que tornou a superfície da membrana rugosa e promoveu um encolhimento/achatamento das células. As imagens do AFM também foram usadas para avaliar os parâmetros de altura e diâmetro dos Eri, obtendo resultados que corroboram com os dados relacionados à morfologia. Além desses

parâmetros, outras propriedades biofísicas celulares que podem ser avaliadas por meio da AFM (como elasticidade, nanoestrutura, força de adesão, rigidez e outros), e propriedades fornecem percepções fundamentais sobre as células (Lee et. al. 2007). Para quantificar como o TM afeta as propriedades mecânicas do Eri, avaliamos a elasticidade celular usando o módulo de Young. Análise das curvas força-distância e a aplicabilidade biológica deste modelo foram descritos em grande detalhe em trabalhos anteriores (Souza et. al. 2014, Lins et. al. 2018, Botelho et. al. 2019). Nossos resultados mostraram que o TM leva a uma diminuição da elasticidade da membrana quando comparado ao controle. As mudanças morfológicas evidenciaram a toxicidade do TM que pode ter causado efeitos na mudança do citoesqueleto e o aumento de a rugosidade da membrana, mas essa é uma limitação do estudo visto que não foi feito nenhum experimento diretamente relacionado ao citoesqueleto.

Outra forma de investigar as modificações vistas em Eri, especificamente na hemoglobina causadas pelo TM foi o de realizar alguns experimentos usando estudos teóricos (docking molecular), esta é uma abordagem onde podemos provar de maneira precisa quais as Cys presentes na hemoglobina que interagem com o TM. Nossos estudos revelaram que o principal produto da clivagem do TM, o EtHg^+ , é que reage precisamente na Cys93 livre disponível. Uma pesquisa no Cambridge Structural, o banco de dados (CSD) (Groom et. al. 2016) mostra que a distância da ligação química EtHg-S ocorre na faixa de 2,34 a 2,37 Å, e as interações fracas são consideradas se as distâncias entre os as espécies são 2,8 - 3,5 Å (Donald et. al. 1974). Com base nesses valores, o encaixe do TM na Hb sugere que a interação direta não é favorável devido ao impedimento estérico que o composto de mercúrio sofre no ambiente químico. No entanto, sugere-se que o grupo heme passa por mudanças relevantes em sua estrutura, uma vez que EtHg^+ presente no TM parece interagir hidrofobicamente com os aminoácidos (Tyr145, His146 e Cys93) ao seu redor. Esta interação pode estabilizar o EtHg^+ liberado do TM, e o ocorre interação/ligação entre Cys93 e EtHg^+ . O acoplamento envolvendo o EtHg^+ e a molécula de Hb mostrou que a distância entre as espécies de EtHg^+ e Cys93 é de apenas 2,2 Å, e a energia de interação é igual a 13,44 kcal mol⁻¹. A formação de um produto químico com ligação entre duas espécies, EtHg^+ e Cys93, vai de acordo com os resultados apresentados em nosso trabalho publicado anteriormente (Silva et. al. 2020). O docking também mostra que a estabilização hidrofóbica do grupo EtHg^+ por um aminoácido (Cys93) também foi observada ao encaixar a molécula de EtHg^+ . Assim, para entender por que a interação ocorre ao usar EtHg^+ e não usando TM, aproximações isoladas foram feitas entre os

resíduos Cys com ambos sistemas. É possível notar que quando o TM é coordenado livremente com a Cys, a interação ocorre com a liberação do ácido tiossalíclico, corroborando assim com os resultados observados experimentalmente e por encaixe.

5. Conclusão

Diante dos nossos resultados é possível afirmar que a exposição ao TM, um conservante usado em vacinas, entre outros produtos comumente usados em nosso dia a dia, causa danos a uma das proteínas mais abundantes e vitais em nosso sangue, a Hb presente nas células vermelhas (Eri). O mecanismo que propomos ser o usado pelo Timerosal é através da interação com algumas Cys livres específicas, o que leva a mudanças na estrutura da proteína, que em última instância afeta esta biomolécula em sua função primária de ligação e transporte do oxigênio levando ainda a alterações na morfologia da célula que carrega tal proteína, o eritrócito.

Referências

Aires M.M.. Fisiologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (1999).

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

Araújo M.V., Queiroz A.C., Silva J.F.M., Silva A.E., Silva J.K.S., Silva G.R., Silva E.C.O., Souza S.T., Fonseca E.J.S., Câmara C.U., Silva T.M.S., Moreira M. Flavonoids Induce Cell Death in *Leishmania Amazonensis*: In Vitro Characterization by Flow Cytometry and Raman Spectroscopy. *Analyst.* 7;144(17):5232-5244 (2019).

Berne R.M. et. al.. Fisiologia. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, (2004).

Bianchini M.C., Gularte C.O.A., Nogara P.A., Krum B.N., Gayer M.C., Bridi J.C., Roos D.H., Roehrs R., Fachineto R., Pinton S., Ávila D.S., Hirth F., Rocha J.B.T., Puntel R.L. Thimerosal inhibits *Drosophila melanogaster* tyrosine hydroxylase (DmTyrH) leading to changes in dopamine levels and impaired motor behavior: implications for neurotoxicity. *Metallomics.* 20;11(2):362-374 (2019).

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

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.* 72:248-254 (1976).

Branco V., Caito S., Farina M., Rocha J.B.T., Aschner M., Carvalho C. Biomarkers of mercury toxicity: Past, present and future trends. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 20(3): 119–154 (2017).

Botelho R.M., Tenorio L.P.G., Silva A.L.M., Tanabe E.L.L., Pires K.S.N., Gonçalves C.M., Santos J.C., Marques A.L.X., Allard M.J., Bergeron J.D., Sebire G., Silva E.C.O., Souza S.T., Fonseca E.J.S., Borbely A.U., Borbely K.S.C. Biomechanical and functional properties of trophoblast cells exposed to Group B Streptococcus in vitro and the beneficial effects of uvaol treatment, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1863:1417–1428 (2019).

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).

Burnham N.A., Chen X., Hodges C.S., Matei G.A., Thoreson E.J., Roberts C.J., Davies M.C., Tendler S.J.B. Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers, *Nanotechnology* 14:1–6 (2003).

Biswal B.K., Vijayan M. Structures of human oxy- and deoxyhaemoglobin at different levels of humidity: variability in the T state. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 58: 1155-1161 (2002).

Brzozowski U., Derewenda Z., Dodson E., Dodson L., Grabowski H., Liddington R., Skarzynski T., Valley D. Bonding of Molecular Oxygen to T State Human Haemoglobin. *Nature.* 307(5946):74-6 (1984).

Barregard L., Rekić D., Horvat M., Elmberg L., Lundh T., Zachrisson O. Toxicokinetics of Mercury after Long-Term Repeated Exposure to Thimerosal-Containing Vaccine. *Toxicol Sci.* 120 (2): 499-506 (2011).

Campbell M.K.; Farrell S.O. *Bioquímica.* 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning, (2015).

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).

Carneiro M.F., Souza J.M.O., Gruta D., Batista B.L., Oliveira V.C.O., Barbosa Jr. A systematic study of the disposition and metabolism of mercury species in mice after exposure to low levels of thimerosal (ethylmercury). *Environ Res.* 134:218-27 (2014).

Carneiro M.F., Morais C., Pequeno D.M., Vesey D.A., Barbosa F. Jr., Gobe G.C. Thimerosal Induces Apoptotic and Fibrotic Changes to Kidney Epithelial Cells In Vitro. *Environ Toxicol.* 30 (12): 1423-33 (2015).

Colotti L., Boffi U., Verzili D., Coletta H., Chiancone E. The homodimeric hemoglobin from *Scapharca* can be locked into new cooperative structures upon reaction of Cys92, located at the subunit interface, with organomercurials. *FEBS Lett.* 21;314(3):481-5 (1992).

Chi Z., Liu R., Yang B., Zhang H. Toxic Interaction Mechanism Between Oxytetracycline and Bovine Hemoglobin. *J Hazard Mater.* 15;180(1-3):741-7 (2010).

Choi J., Won N., Park J., Jang S., Eom C., Choi Y., Park Y.I., Dong M.. From the Cover: Ethylmercury-Induced Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagic Cell Death: Involvement of Autophagosome-Lysosome Fusion Arrest. *Toxicol Sci.* 154(1):27-42 (2016).

Chin Chan M., Bautista E., Cruz I.A., Quintanilha-Vega B., Segovia J. Inorganic mercury prevents the differentiation of SH-SY5Y cells: Amyloid precursor protein, microtubule associated proteins and ROS as potential targets. *J Trace Elem Med Biol.* 41:119-128 (2017).

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

Drescher D., Büchner T., McNaughton D., Kneipp J. SERS reveals the specific interaction of silver and gold nanoparticles with hemoglobin and red blood cell components. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15:5364-5373 (2013).

Donald M.D. *Organometallic Reaction Mechanisms of the Nontransition Elements.* A volume in *Organometallic Chemistry A series of Monographs.* Academic Press. (1974).

Fillion M., Mergler D., Passos C.J.S., Larribe F., Lemire M., Guimarães J.R.D. A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. *Environ Health* ., 10, 5-29 (2006).

Filho I.P.T., Pedro J.R.P., Narayanan V.S., Nguyen N.M., Roseff S.D., Spiess B.D. Perfluorocarbon Emulsion Improves Oxygen Transport of Normal and Sick Cell Human Blood in Vitro. *J Biomed Mater Res A.* 102(7):2105-15 (2014).

Fitsanakis V.A., Aschner M. The importance of glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid transport and regulation in manganese, mercury and lead neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1;204(3):343-54 (2005).

Grotto D., Valentini J., Fillion M., Passos C.J.S., Solange C.G., Mergler D., Barbosa F.Jr. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Sci Total Environ.*, 408, 806-811 (2010).

Gibson M.A., Sarpong-kumankomah S., Nehzati S., Graham N.G., Gailer J. Remarkable differences in the biochemical fate of Cd²⁺, Hg²⁺, CH₃Hg⁺ and thimerosal in red blood cell lysate. *Metallomics.* 9:1060-1072 (2017).

- Groom C.R., Bruno I.J., Lightfoot M.P., Ward S.C. The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater.* 72(2):171-9 (2016).
- Horcas I., Fernandez R., Gomez-Rodriguez J.M., Colchero J., Gomez-Herrero J., Baro A.M. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology, *Rev. Sci. Instrum.* 78:013705 (2007).
- H. Hertz. Uber den kontakt elastischer korper, *J. Reine Angew. Math.* 92:245–260 (1881).
- Hasan Md.N., Bhuiya M.N.M.A., Hossain M.K. In silico molecular docking, PASS prediction, and ADME/T analysis for finding novel COX-2 inhibitor from *Heliotropium indicum*. *Journal Of Complementary Medicine Research.* 10(3):142-154 (2019).
- Horta B.A.C., Alencastro R.B. Structural and dynamic effect of changing the disulfide contact pattern of the endothelial vascular growth factor. *Rev. Virtual Quim.* 3(1):37-50 (2011).
- Jensen F.B. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiol Scand,* 182(3):215-27 (2004).
- Janzen R., Schwarzer H., Sperling H., Vogel H., Schwerdtle T., Karst L. Adduct formation of thimerosal with human and rat hemoglobin: a study using liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry (LC/ESI-TOF-MS). *Metallomics.* 3:847–852 (2011).
- Jones G., Willett P., Glen R.C., Leach A.R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J MolBiol.* 267:727–748.5 (1997).
- López V., Moraga F.A., Llanos A.J., Ebensperger G., Taborda M.I., Uribe E. Plasmatic Concentrations of ADMA and Homocystein in Llama (*Lama glama*) and Regulation of Arginase Type II: An Animal Resistent to the Development of Pulmonary Hypertension Induced by Hypoxia. *Front Physiol,* 29:9:606 (2018).
- Lins M., Silva E., Silva G., Souza S., Medeiros N., Fonseca E., Smaniotto S. Association between biomechanical alterations and migratory ability of semaphorin-3A-treated thymocytes, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1862:816–824 (2018).
- Lee G.Y., Lim C.T. Biomechanic approaches to studying human diseases, *Trends Biotechnol.* 25:111–118 (2007).
- Li Z.Y., Su C.Y., Ding B. Molecular Dynamics Simulation of β -Adrenoceptors and Their Coupled G Proteins. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 23(14):6346-6351 (2019).
- Li Y., He B., Nong Q., Qu G., Liu L., Shi J., Hu L., Jiang G. Characterization of mercury-binding proteins in rat blood plasma. *Chem Commun (Camb).* 54(54):7439-7442 (2018).
- Mitchell P. Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. *Glynn Research Laboratories.* 66-1 (1966).

Mahaffey K.R., Clickner R.P., Bodurow C.C. Blood organic mercury and dietary mercury intake: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 and 2000. *Environ Health Perspect*, 112(5):562–570 (2004).

MIESSLER, G.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. *Química Inorgânica*. 5ª ed. São Paulo: Pearson Education, (2014).

Mercúrio (Hg). QUALI segurança alimentar. Disponível em: <https://www.quali.pt/contaminantes/1558-mercurio-hg>. Acesso em: 11 de outubro de 2020.

Mairbäurl H., Weber R.E. Oxygen transport by hemoglobin. *Compr Physiol*. 2(2):1463-8, (2012).

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

Nicholls, D. G., S. J. Ferguson. *Bioenergetics 4*. Academic Press. An Elsevier Science Imprint. London, UK. (2013).

Nigra A.D., Casale C.H., Santander V.S. Human erythrocytes: cytoskeleton and its origin. *Cell Mol Life Sci*. 77(9):1681-1694 (2020).

Nascimento S.N., Barth A., Göethel G., Baierle M., Charão M.F., Brucker N., Moro A.M., Bubols G.B., Sobreira J.S., Sauer E., Rocha R., Gioda A., Dias A.C., Salles J.F., Garcia S.C. Cognitive deficits and ALA-D-inhibition in children exposed to multiple metals. *Environ Res.*, 136, 387-395 (2015).

Okuda J., Tsuzuki Y. Changes of some properties of blood of rats administered with methylmercury chloride. *Chem. Pharm. Bull.* 25 (2): 209-214 (1976).

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).

Os riscos do mercúrio. Ministério do Meio Ambiente, 15 de janeiro de 2013. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/noticias/os-riscos-do-mercurio>. Acesso em: 12 de novembro 2020.

Premasiria W.R., Lee J.C., Ziegler L.D. Surface Enhanced Raman Scattering of Whole Human Blood, Blood Plasma and Red Blood Cells: Cellular Processes and Bioanalytical Sensing. *J Phys Chem B*. 116(31): 9376-9386 (2012).

Paromita S., Sikdar J., Roy A., Haldar R. Binding of Ibuprofen to Human Hemoglobin: Elucidation of Their Molecular Recognition by Spectroscopy, Calorimetry, and Molecular Modeling Techniques. *J Biomol Struct Dyn*. 36(12):3137-3154 (2018).

Perutz M.F., Rossman M.G., Cullis A.F., Muirhead H., Will G., North A.C.T. Estrutura da hemoglobina: uma síntese tridimensional de Fourier com resolução de 5,5 Å, obtida por análise de raios-x. *Natureza*. 185: 416–422 (1960).

Purnell M.C. The interaction of valine and glucose and the influence on the spectrin-actin complex in sickle cell disease. *Discov Med*, 28(155):219-227 (2019).

Qin O., Cheng Y., Hu W., Zhou H., Tan Y., Gou S., Jin X., Tao L., Du L., Wang J., Wang X., Zou Y., Maibach H. Patch Test in Chinese in Shanghai With Cosmetic Allergy to Cosmetic Series and Products. *J Cosmet Dermatol*. (2019).

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

Stewart, J. J. P. MOPAC2016, Version: 18.117L. (2016).

Shriver D.F. et. al.. *Química Inorgânica*. 4^a ed. Porto Alegre: Bookman, (2008).

Sumathi T., Jacob S., Gopalakrishnan R. Methylmercury exposure develops atherosclerotic risk factors in the aorta and programmed cell death in the cerebellum: ameliorative action of *Celastrus paniculatus* ethanolic extract in male Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res Int*, 25(30):30212-30223 (2018).

Sneddon I.N. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile, *Int. J. Eng. Sci.* 3:47–57 (1965).

Souza S.T., Agra L.C., Santos C.E., Barreto E., Hickmann J.M., Fonseca E.J.. Macrophage adhesion on fibronectin evokes an increase in the elastic property of the cell membrane and cytoskeleton: an atomic force microscopy study, *Eur. Biophys. J.* 43:573–579 (2014).

Silva M.M., Dantas M.D.A., Filho R.C.S., Sales M.V.S., Almeida J.X., Leite A.C.R., Goulart M.O.F., Grillo L.A.M., Barros W.A., 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*, 19;154:661-671 (2020).

Srivastava A., Evans K.J., Sexton A.E., Schofield L., Creek D.J. Metabolomics-Based Elucidation of Active Metabolic Pathways in Erythrocytes and HSC-Derived Reticulocytes. *J Proteome Res.* 16(4):1492-1505 (2017).

Suwalsky M., Zambrano P., Gallardo M.J., Villena F., Jemiola-Rzeminska H., Strzalka K. Effects of Thimerosal on Lipid Bilayers and Human Erythrocytes: An In Vitro Study. *J. Membr Biol.* 249(6):823-831 (2016).

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).

Santos J.C.N., da Silva I.M., Braga T.C., de Fátima, Figueiredo I.M., Santos J.C.C. Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in

physiological conditions: spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). *Int J Biol Macromol.* 113:1032-1040 (2018).

Silva E.C.O., Santos F.M., Ribeiro A.R.B., Souza S.T., Barreto E., Fonseca E.J.D.S. Drug-induced anti-inflammatory response in A549 cells, as detected by Raman spectroscopy: a comparative analysis of the actions of dexamethasone and p-coumaric acid. *Analista.* 144(5):1622-1631 (2019).

Stewart J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements. *J. Mol. Model.* 13 (12):1173–1213 (2007).

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

Teixeira F.B., de Oliveira A.C.A., Leão L.K.R., Fagundes N.C.F., Fernandes R.M., Fernandes L.M.P., da Silva M.C.F., Amado L.L., Sagica F.E.S., de Oliveira E.H.C., Crespo-Lopez M.E., Maia C.S.F., Lima R.R. Exposure to Inorganic Mercury Causes Oxidative Stress, Cell Death, and Functional Deficits in the Motor Cortex. *Front Mol Neuro sci.* 15;11:125 (2018).

Trümpler S., Meermann B., Nowak S., Buscher W., Karst U., Sperling M. In vitro study of thimerosal reactions in human whole blood and plasma surrogate samples. *J Trace Elem Med Biol.* 28(2): 125-130 (2014).

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).

Wu Y., Lu H., Cai J., He X., Hu Y., Zhao H., Wang X.. Membrane surface nanostructures and adhesion property of T lymphocytes exploited by AFM, *Nanoscale Res. Letters.* 4:942 (2009).

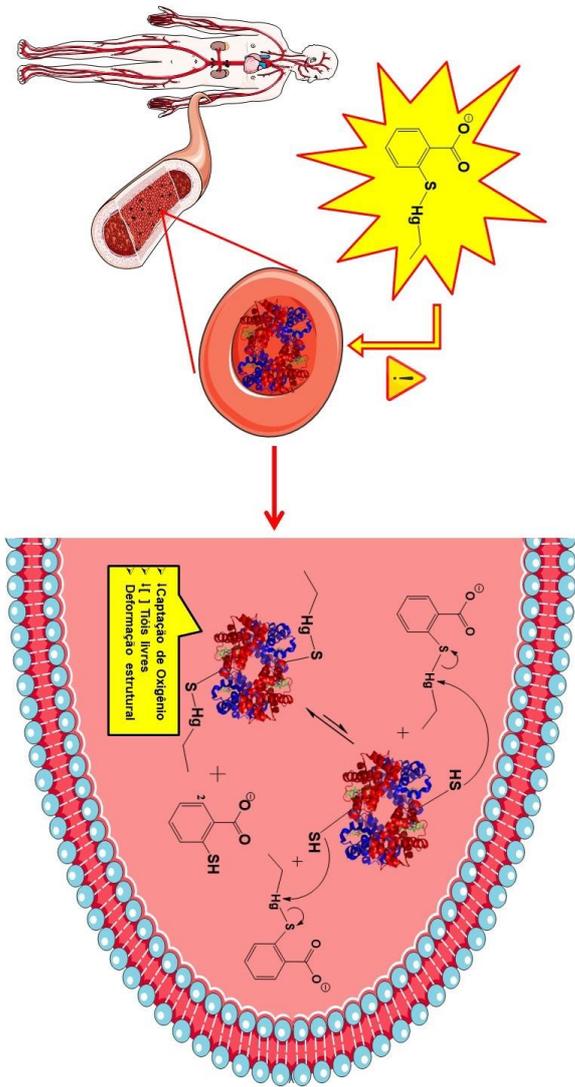
Wrobel T.P., Piergies N., Pieta E., Kwiatek W., Paluszkiewicz C., Fornal M., Grodzicki T. Erythrocyte hemeoxygenation status indicated as a risk factor in prehypertension by Raman spectroscopy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1864(11): 3659-3663 (2018).

Wallace A.C., Laskowski R.A., Thornton J.M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* 8:127-134 (1995).

Zhang X., Giovannucci E.L., Smith-Warner S.A., Wu K., Fuchs C.S., Pollak M., Willett W.C., Ma J. A prospective study of intakes of zinc and heme iron and colorectal cancer risk in men and women. *Cancer Causes Control.* 12,1627-1637 (2011).

Zachariah E., Bankapur A., Santhosh C., Valiathan M., Mathur D. Probing oxidative stress in single erythrocytes with Raman Tweezers. *J Photochem Photobiol B,* 2;100(3):113-6 (2010).

APÊNDICE A – Gráfico abstract



APÊNDICE B – Email de submissão do artigo

04/07/2021

Gmail - Confirm co-authorship of submission to Chemico-Biological Interactions



Marcos Vinicius <marcosvdssv@gmail.com>

Confirm co-authorship of submission to Chemico-Biological Interactions

1 mensagem

Chemico-Biological Interactions <em@editorialmanager.com>
Responder a: Chemico-Biological Interactions <cbi@elsevier.com>
Para: "Marcos V.S. Sales" <marcosvdssv@gmail.com>

19 de abril de 2021 11:38

This is an automated message.

Journal: Chemico-Biological Interactions

Title: Thimerosal on human erythrocyte hemoglobin: assessing structural changes towards the mechanism of action

Corresponding Author: Miss Ana Catarina Rezende Leite

Co-Authors: Marcos V.S. Sales; Reginaldo C. da Silva Filho; Marina M. Silva; Jeanyne L. Rocha; Ricardo O. Freire, PhD; Eloiza Lopes de Lira Tanabe; Elaine C. O. Silva, PhD; Samuel T. Souza, PhD; Eduardo J. S. Fonseca, PhD; Isis M. Figueiredo, PhD; Ueslen Rocha, PhD; Josué Carinhanha C. Santos, PhD

Manuscript Number:

Dear Sales,

Miss Ana Catarina Rezende Leite submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, Editorial Manager, and you have been listed as a Co-Author of this submission.

Elsevier asks Co-Authors to confirm their consent to be listed as Co-Author and track the papers status. In order to confirm your connection to this submission, please click here to confirm your co-authorship: <https://www.editorialmanager.com/chembioint/l.asp?i=138417&l=L75KJ4E0>

If you have not yet registered for the journal on Editorial Manager, you will need to create an account to complete this confirmation. Once your account is set up and you have confirmed your status as Co-Author of the submission, you will be able to view and track the status of the submission as it goes through the editorial process by logging in at <https://www.editorialmanager.com/chembioint/>

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at ana.leite@qb.ufal.br; anacatarinar@gmail.com

Thank you,

Chemico-Biological Interactions

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=e911fde4df&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1697480049065381365&simpl=msg-f%3A1697480049065381365>

1/2