



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Instituto de Química e Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia

Reginaldo Correia da Silva Filho

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM CÉLULAS
LINFOMONONUCLEARES E DO STATUS REDOX CELULAR EM ERITRÓCITOS
DA POPULAÇÃO CIRCUNVIZINHA A LAGUNA MUNDAÚ (MACEIÓ-AL)
EXPOSTA A ESPÉCIES QUÍMICAS POTENCIALMENTE TÓXICAS**

Maceió – AL

2021

Reginaldo Correia da Silva Filho

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM CÉLULAS
LINFOMONONUCLEARES E DO STATUS REDOX CELULAR EM ERITRÓCITOS
DA POPULAÇÃO CIRCUNVIZINHA A LAGUNA MUNDAÚ (MACEIÓ-AL)
EXPOSTA A ESPÉCIES QUÍMICAS POTENCIALMENTE TÓXICAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito para recebimento do título de Doutor.

Área de concentração: Bioquímica e Biotecnologia

Orientador: Prof^o. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Catarina Rezende Leite

Maceió – AL

2021

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

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

- S586a Silva Filho, Reginaldo Correia da.
Avaliação da produção de espécies reativas em células linfomononucleares e do status redox celular em eritrócitos da população circunvizinha a laguna Mundaú (Maceió-AL) exposta a espécies químicas potencialmente tóxicas / Reginaldo Correia da Silva Filho. – 2021.
129 f. : il., grafs., tabs. color.
- Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.
Co-orientadora: Ana Catarina Rezende Leite.
Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2021.
- Bibliografia: f. 102-122.
Anexos: f. 124-129.
1. Espécies tóxicas (Química). 2. Células sanguíneas. 3. Estresse oxidativo. I. Título.

CDU: 66.0-916



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



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando REGINALDO CORREIA DA SILVA FILHO intitulada: "AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM CÉLULAS LINFOMONONUCLEARES E DO STATUS REDOX CELULAR EM ERITRÓCITOS DA POPULAÇÃO CIRCUNVIZINHA A LAGUNA MUNDAÚ (MACEIÓ-AL) EXPOSTA A ESPÉCIES QUÍMICAS POTENCIALMENTE TÓXICAS", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 5 de março de 2021, às 14h, por meio de videoconferência.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dra. Ana Catarina Rezende Leite
Coorientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dra. Isis Martins Figueiredo
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira
(IB/UNICAMP)

Prof. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto
(IQ/USP)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos familiares e amigos que estiveram me apoiando ao longo desses anos, contribuindo para minha formação profissional e pessoal. Agradeço a todos com muito carinho e estima.

AGRADECIMENTOS

Chegar ao final dessa etapa é um desafio, principalmente pessoal, para todos que se dedicam a carreira acadêmica e desejam através dela, ser e fazer algo significativo. É uma construção que demanda diferentes formas de esforço e acima de tudo, perseverança para acreditar que sempre haverá motivação, pois isso é essencial em qualquer processo.

Agradeço imensamente a minha família, que com gestos singelos, estão sempre acreditando que posso alcançar grandes objetivos. Esse foi um deles e grande parte dessa realização, foi devido a todo o empenho por parte de minha mãe, Maurizete, que acreditou que poderia dar ao menos um de seus filhos, todo o suporte que não pode ter ou dar aos meus irmãos. Minha gratidão é inestimável, assim como todo amor que existe entre nós. Meu mais sincero obrigado a minha família, por ser suporte e força.

Agradeço a professora Ana Catarina e ao professor Josué Carinhonha pela oportunidade de desenvolver este trabalho e através dele obter essa titulação que será significativa em meu desenvolvimento profissional.

Obrigado ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da UFAL pela oportunidade de estar no programa desenvolvendo esse trabalho.

Obrigado ao amigo Ábner Nunes, pelo suporte desde que me candidatei ao doutorado, assim como agradeço a sua família pelo acolhimento em sua casa. Obrigado por contribuir com este trabalho e também agradeço pelo carinho, pois sei que ganhei um irmão para toda a vida.

Agradeço também a Kleyton, por ter me dado suporte e acolhimento quando cheguei nesse lugar totalmente novo.

Aos companheiros do Laboratório de Metabolismo e Proteoma, onde passei um bom tempo frequentando seu espaço como laboratório, obrigado por serem pessoas tão boas e acolhedoras.

Ao amigo Nerveson Santos, quem esteve comigo em todo o processo deste doutorado e foi importante para que iniciássemos este trabalho. Espero ter contribuído também para sua formação, assim como você teve sua parcela na minha. Sua amizade me possibilitou novos horizontes. Muito obrigado.

A Márcia Valéria e Marleide, por terem se esforçado na busca por voluntários para participarem da pesquisa. Agradeço também aos voluntários pela disposição e contribuição para que a ciência gere benefícios para a sociedade.

Agradeço aos outros colaboradores desse trabalho, que empenharam tempo e dedicação para obtenção desses resultados. Obrigado a Mayara Santos, Talitta Ricarly, Chiara Marinho e Raphael Pinto.

Obrigado aos professores Francis Soares, Marcelo Duzzioni e Isis Figueiredo, que compuseram a banca de qualificação e foram importantes nas observações feitas a respeito dessa tese. Obrigado também as professoras Isis Figueiredo, Nadja Pinto e Helena de Oliveira que participaram como membros da banca de defesa e também deram grandes contribuições para melhoria dessa tese.

Obrigado aos laboratórios LINQA e ao LABIO pelo suporte. Agradeço aos amigos de laboratório com quem convivi esses anos e os tenho como verdadeiros amigos. Aos amigos, compartilhamos muitas vivências enriquecedoras. O apoio de vocês fez a jornada mais leve. Muito obrigado por tudo e um agradecimento especial a minha “super trupe”, Janaína, Amanda, Woodland, Francisco, Marina, Aryanna, Ari, Jaelson, Karol e Fátima, pois vocês foram muito solidários. Espero que as experiências permitam que vocês sejam inovadores em suas ações. Sucesso na caminhada de vocês.

Quero agradecer a amizade que construí com Thalita Sales, Wanessa e Meirielly. Pela ajuda e disposição de todas as vezes que precisei usar o espaço no laboratório ao qual fizeram parte. Somos sortudos por termos tanta afinidade e por termos nos apoiado tanto. Vocês são merecedoras de muitas vitórias.

Obrigado a Thayana pela ajuda na padronização de técnicas usadas no laboratório.

Aos amigos Ricardo Santos, Maisa Menezes, José Atil e Nilzete Oliveira e seus filhos. Em vocês eu encontrei um porto seguro para persistir com garra.

Obrigado a CAPES, CNPq e PPSUS pelo suporte financeiro que possibilitou o desenvolvimento das atividades acadêmicas e do projeto.

Agradeço ao Laboratório de Bioquímica e Bioquímica do Exercício, do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, onde foi minha primeira casa e onde tive todo suporte para adquirir o conhecimento necessário para desenvolvimento desta tese. Obrigado a professora Claudia Lagranha, com quem aprendi muito, aos meus amigos de laboratório, com quem cresci na academia e agradeço especialmente a professora Mariana Fernandes, por ser colaboradora e acima de tudo por sempre me dizer e mostrar que estava me preparando para a vida. Agradeço por nunca deixar de me conduzir. És minha maior referência, inspiração e minha força. Obrigado, com muito carinho e respeito.

Muito obrigado a todos que colaboraram de maneira direta e indireta.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra
alma humana.”

Carl Jung

RESUMO

O Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM, ALAGOAS) fornece um grande subsídio para o comércio de peixes. Em Maceió, a lagoa Mundaú representa fonte de renda e alimento para a população. No entanto, a grande atividade antrópica fez com que este ecossistema sofresse processos de degradação. Como consequência, ele libera contaminantes que podem ser prejudiciais para o meio ambiente, como espécies químicas potencialmente tóxicas, que incluem mercúrio (Hg), chumbo (Pb), arsênio (As) e cádmio (Cd). Um trabalho recente do nosso grupo de pesquisa tem quantificado a presença de espécies químicas na laguna Mundaú, destacando concentrações elevadas de Hg e Pb. Nosso objetivo foi avaliar o nível de mercúrio no sangue e na urina de pescadores e correlacioná-lo com o nível de estresse oxidativo nas células sanguíneas. Mostramos neste estudo que os pescadores (grupo exposto) da Lagoa Mundaú (Maceió - Alagoas, Brasil) apresentam maiores concentrações de mercúrio total no sangue e na urina comparado com o grupo controle. Esse mercúrio pode influenciar em alterações no sistema redox, gerando a produção de espécies reativas de oxigênio, que está atrelada a diversas doenças de fórum metabólico, como diabetes tipo 2 e hipertensão. Nesse grupo de pescadores, há uma maior incidência dessas duas patologias. Nesse trabalho, as células linfomononucleares dos pescadores apresentam nível elevado de espécies reativas de oxigênio e destacamos que os eritrócitos apresentaram maior dano em biomoléculas, que inclui aumento da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas e diminuição do tiol total e alteração do estado redox celular, bem como diminuição da atividade das enzimas antioxidante (SOD, GPx e GST). Essas alterações no sistema antioxidante do grupo exposto ao ambiente aquático com mercúrio podem contribuir para gerar o estresse oxidativo, que também está relacionado com prejuízo na capacidade funcional da hemoglobina em se ligar ao oxigênio. A captação de oxigênio da hemoglobina diminuiu no grupo exposto e a membrana das células apresentou fragilidade osmótica aumentada em relação ao grupo controle, indicando fragilidade da membrana. Foram encontradas correlações entre mercúrio, estresse oxidativo. Esses resultados sugerem que o mercúrio no sangue de pescadores pode ser responsável por causar prejuízos no estado oxidativo das células sanguíneas e na capacidade funcional da hemoglobina, e fortalece a necessidade de se fazer um maior monitoramento ambiental nas águas do CELMM e dos possíveis efeitos biológicos causados na população circunvizinha.

Palavras-chave: Espécies químicas tóxicas, Células sanguíneas, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The Estuarine Lagoon Mundaú-Manguaba Complex (ALAGOAS) provides a large subsidy for the fish trade. In Maceió, the Mundaú lagoon represents a source of income and food for the population. However, the great anthropogenic activity has caused this ecosystem to undergo degradation processes. As a consequence, it releases contaminants that may be harmful to the environment, such as potentially toxic chemical species, which include mercury (Hg), lead (Pb), arsenic (As) and cadmium (Cd). Recent work by our research group has quantified the presence of chemical species in the Mundaú lagoon, highlighting high concentrations of Hg and Pb. We aimed to evaluate the mercury level in the blood and urine of fishermen and correlate it with the level of oxidative stress in blood cells. We show in this study that the fishermen (exposed group) of Mundaú Lagoon (Maceió - Alagoas, Brazil) have higher concentrations of total mercury in blood and urine than the control group. This mercury can influence changes in the redox system, generating reactive oxygen species production, which is linked to several diseases of the metabolic forum, such as type 2 diabetes and hypertension. In this work, fishermen's lymphomononuclear cells had a high level of reactive oxygen species and we highlight that the erythrocytes showed greater damage to biomolecules, which includes increased lipid peroxidation and protein oxidation and decreased total thiol and alteration of the cell redox state, as well as decreased activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx and GST). These alterations in the antioxidant system of the group exposed to the aquatic environment with mercury can contribute to generate oxidative stress, which is also related to impairment in the functional capacity of hemoglobin to bind to oxygen. The oxygen uptake of hemoglobin decreased in the exposed group and the cell membrane showed increased osmotic fragility in relation to the control group, indicating fragility of the membrane. Correlations were found between mercury and oxidative stress. These results suggest that mercury in the blood of fishermen may be responsible for causing damage to the oxidative state of blood cells and in functional capacity of hemoglobin, and strengthens the need for greater environmental monitoring in the waters of CELMM and the possible biological effects caused on the surrounding population.

Keywords: Toxic chemical species, Blood cells, Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estimativas de mortes causadas por poluição	20
Figura 2. Estimativa de causas de mortes global e idades mais afetadas por mortes relacionadas com poluição	21
Figura 3. Estimativa das mortes causadas por poluição total no mundo	24
Figura 4. Mapa físico do estado de Alagoas e as lagunas Mundaú e Manguaba que compõem o CELLM	27
Figura 5. Peixes e crustáceos aparecem mortos na Laguna Manguaba, Marechal Deodoro, AL	29
Figura 6: Estrutura da molécula de hemoglobina.	41
Figura 7: Transição do estado T (tenso) para o estado R (relaxado) da hemoglobina	42
Figura 8: Metabolismo energético e oxidativo nos eritrócitos	44
Figura 9: Esquema representado o sistema antioxidante e a geração de estresse oxidativo	50

RESULTADOS

Figura 1. Concentração de mercúrio total no sangue e urina	67
Figura 2. Produção geral de ERs de ânion radical superóxido mitocondrial	71
Figura 3. Exposição ao mercúrio ambiental aumentou dano em biomoléculas e diminuiu estado redox nos eritrócitos de pescadores	73
Figura 4. Atividade do sistema antioxidante enzimático em eritrócitos	75
Figura 5. Eritrócitos de pescadores expostos ao ambiente aquático com mercúrio possuem menor capacidade de captar oxigênio	76
Figura 6: Integridade de membrana de eritrócitos de pescadores apresentam maior fragilidade na osmolaridade em meio hipotônico	77

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Coordenadas cartesianas dos pontos de amostragem de água.	30
Tabela 2. Concentrações de elementos encontrados na laguna Mundaú e os limites preconizados pelo CONAMA e OMS	31

RESULTADOS

Tabela 3. Características demográficas	69
Tabela 4. Parâmetros de Bioquímica clínica	70
Tabela 5. Correlação de Spearman entre Hg no sangue e estresse oxidativo do grupo exposto	79

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Correlação de Spearman entre Hg no sangue e os parâmetros de Bioquímica clínica do grupo exposto	123
--	------------

LISTA DE ABREVIATURAS

AT(D)P	adenosina tri (di) – fosfato
Ca ²⁺	cálcio
CAT	catalase
CELMM	complexo estuarino lagunar Mundaú Manguaba
EGTA	etileno glico – bis(b-aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético
EROs	espécies reativas de oxigênio
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
Fe ²⁺	ferro ferroso
Fe ³⁺	ferro férrico
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
GST	glutaciona S-transferase
Hb	hemoglobina
H ₂ DCF-DA	diacetato de diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
LO [•]	radical alcóxil
LOO [•]	radical peróxil
MeHg	metilmercúrio
MetHb	metahemoglobina
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
NO [•]	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
NO ₃ ⁻	nitrato
[•] NO ₂	nitrito
O ₂	oxigênio
O ₂ ^{•-}	ânion radical superóxido

OH [•]	radical hidroxil
ONOO ⁻	peroxinitrito
ONOOH	ácido peroxinitroso
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells (células mononucleares do sangue periférico)
SOD	superóxido dismutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Panorama geral da poluição ambiental e contaminação da população	19
2.2	– O Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba	26
2.3	– Espécies químicas não essenciais com potencial tóxico associadas a poluição ambiental	32
2.3.1	– <i>Merúrio e indução de toxicidade</i>	33
2.3.2	– <i>Chumbo, Arsênio, Cádmio e indução de toxicidade</i>	35
2.4	– As Células do sangue periférico: eritrócitos e linfomonucleares	38
2.4.1	– <i>Eritrócitos (Células vermelhas do sangue)</i>	38
2.4.2	– <i>A hemoglobina (Hb)</i>	41
2.4.3	– <i>O metabolismo energético nos eritrócitos e sua participação em processos oxidativos</i>	43
2.5	– Células linfomonucleares (monócitos e linfócitos)	45
2.6	– Estresse oxidativo: geração de espécies reativas e sistemas antioxidantes	48
2.6.1	<i>Relação entre eritrócitos, células linfomonucleares e estresse oxidativo</i>	54
3	HIPÓTESE	58
4	OBJETIVOS	59
4.1	Objetivo Geral:	59
	Avaliar a produção de espécies reativas em células linfomonucleares e o status redox celular em eritrócitos da população circunvizinha a laguna Mundaú (Maceió-AL) exposta a espécies químicas potencialmente tóxicas.	59
4.2	Objetivos Específicos:	59
5	MATERIAIS E MÉTODOS	60
6	RESULTADOS	67
6.1	Exposição ambiental a espécies potencialmente tóxicas	67
6.1.1	<i>Quantificação das concentrações de Hg em amostras de sangue e urina</i>	67

6.2	Características demográficas, exposição ambiental e bioquímica clínica dos grupos de estudo.	68
6.3	Perfil Bioquímico de pescadores da laguna Mundaú.....	69
6.4	Produção geral de ERs e ânion superóxido mitocondrial por PBMC de pescadores da laguna Mundaú.....	71
6.5	Biomarcadores de estresse oxidativo em eritrócitos de pescadores da laguna Mundaú	72
6.6	Atividade do sistema antioxidante enzimático em eritrócitos de pescadores da laguna Mundaú.....	74
6.7	Exposição a contaminantes inorgânicos reduz capacidade de captação de oxigênio dos eritrócitos de pescadores da laguna Mundaú	75
6.8	Exposição a contaminantes inorgânicos causam mudanças na fragilidade osmótica dos eritrócitos de pescadores da laguna Mundaú	76
6.9	Estudo de correlação entre Hg no sangue e parâmetros de estresse oxidativo no grupo exposto	78
7	DISCUSSÃO	80
7.1	A presença de espécies químicas com potencial tóxico na laguna Mundaú, distúrbios metabólicos e patologias associadas em pescadores expostos.....	80
7.2	Contaminantes inorgânicos e produção de espécies reativas em células mononucleares do sangue periférico	82
7.3	Modulação do status redox em eritrócitos	84
7.4	Exposição ambiental, sistema antioxidante enzimático e detoxificação de xenobióticos	89
7.5	Prejuízo na captação de oxigênio por eritrócitos de pescadores expostos ao ambiente contaminado	95
7.6	Efeito da exposição de pescadores ao ambiente contaminado na integridade da membrana dos eritrócitos	97
7.7	Estudo de correlação entre mercúrio no sangue e parâmetros de estresse oxidativo e Bioquímica clínica.....	99
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
	REFERÊNCIAS.....	102
9	MATERIA SUPLEMENTAR	123
9.1	Correlação de Spearman entre Hg no sangue e parâmetros de Bioquímica clínica do grupo exposto	123
	ANEXOS	124

Anexo A – Termo de Livre Consentimento e Esclarecimento (TCLE)	124
Anexo B – Questionário Epidemiológico.....	127
Anexo C – Artigos publicados em colaboração	128

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho tem como principal objetivo investigar como as espécies químicas potencialmente tóxicas, provenientes da exposição ambiental (i.e., contato com água e consumo de alimentos provenientes da laguna), podem afetar a atividade antioxidante de alguns tipos celulares de pescadores que vivem no entorno da laguna Mundaú, localizado na cidade de Maceió-AL. Essas espécies tóxicas, dentre elas o mercúrio, chumbo, arsênio e cádmio, são descritas na literatura como elementos associados a patologias, que inclui hipertensão, diabetes, aterosclerose, doenças autoimunes, distúrbios neurológicos, renais e até mesmo câncer (STEFFENSEN *et al.*, 1994; CENTENO *et al.*, 2002; MENKE *et al.*, 2009; RICE *et al.*, 2014; KUO *et al.*, 2017). Todas essas patologias também são descritas como patologias associadas ao estresse oxidativo, uma situação que gera dano celular e que a longo prazo pode culminar no aparecimento das doenças já citadas. Além disso, também é reportado que as espécies químicas potencialmente tóxicas podem induzir o estresse oxidativo (FARINA *et al.*, 2013).

Para que seja possível associar esses fatores nessa população de pescadores de Maceió, este trabalho foi direcionado da seguinte forma:

Primeiro foi feita uma revisão da literatura que aborda o contexto geral da poluição no mundo e no Brasil, expondo como ocorre esse tipo de exposição da população. Em seguida, foi abordado informações relevantes sobre o Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba, que relatam sua importância ecológica, econômica e como isso é afetado pela poluição e, conseqüentemente, como a saúde da população sofre com essa situação. Continuando com a temática da poluição, foi feita uma breve revisão dos principais contaminantes abordados nesse estudo (Hg, Pb, As e Cd), focando principalmente em suas características e como eles afetam a saúde e o ambiente. Posteriormente, foi iniciada uma descrição das características do modelo experimental utilizado no estudo, os pescadores (sangue), destacando os eritrócitos e as células linfomononucleares, para que se pudesse compreender suas principais funções. Por último nesta revisão da literatura, discorreu-se acerca do tema central que é o estresse oxidativo e como as espécies químicas podem levar a essa situação.

O trabalho segue apresentando os objetivos e hipótese do trabalho, depois os materiais e métodos empregados para avaliar os objetivos específicos propostos. Após a sessão de

materiais e métodos, são descritos os resultados obtidos, a discussão dos mesmos baseada em dados da literatura e por último, foram feitas as considerações finais acerca deste trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Panorama geral da poluição ambiental e contaminação da população*

A poluição é um problema ambiental que afeta tanto o estado de saúde quanto a condição social da população. Atualmente, a poluição é considerada a maior causa de morte ambiental, chegando a superar o índice de mortalidade causado por algumas doenças, como por exemplo, AIDS, tuberculose e malária e até mesmo mortes por formas violentas (LANDRIGAN et al., 2017; HORTON, 2017; GBD, 2016). O maior índice dessas mortes afeta desproporcionalmente pessoas pobres e em situação de vulnerabilidade. Aproximadamente 92% da população afetada por doenças causadas por poluição possuem renda baixa e renda média. Segundo o mapa global (**Fig. 1A**) do índice de mortes atribuídas à poluição (GBD, 2016), países subdesenvolvidos são os mais afetados pela poluição e a população de renda média baixa e renda média alta são as que apresentam maior taxa de mortalidade (**Fig. 1B**). Corroborando com dados do Global Burden of Disease Study (GBD), em 2012 a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que ambientes não saudáveis foram a causa de morte de 12,6 milhões de pessoas, que representa 23% da mortalidade global – e por 26% da morte de crianças abaixo dos 5 anos (WHO, 2014; WHO, 2016; WHO, 2016^a).

Vale salientar, que a poluição causa mais mortes que diversos fatores de risco (**Fig. 2A**) e que crianças e idosos se encontram em maior grupo de risco de acometimento de doenças relacionadas à poluição. Estima-se que cerca de 9 milhões de mortes prematuras sejam causadas por poluição. Além disso, mesmo a exposição a pequenas doses de poluentes em janelas de vulnerabilidade, como desenvolvimento intrauterino e primeira infância, podem levar a doenças, incapacidade ou ainda ser a causa de morte em crianças. Também pode ser destacado que não apenas as crianças apresentam grande taxa de mortalidade associada com a poluição, mas também idosos se encaixam nesse grupo de risco (**Fig. 2B**) (LANDRIGAN et al., 2017; GBD, 2016).

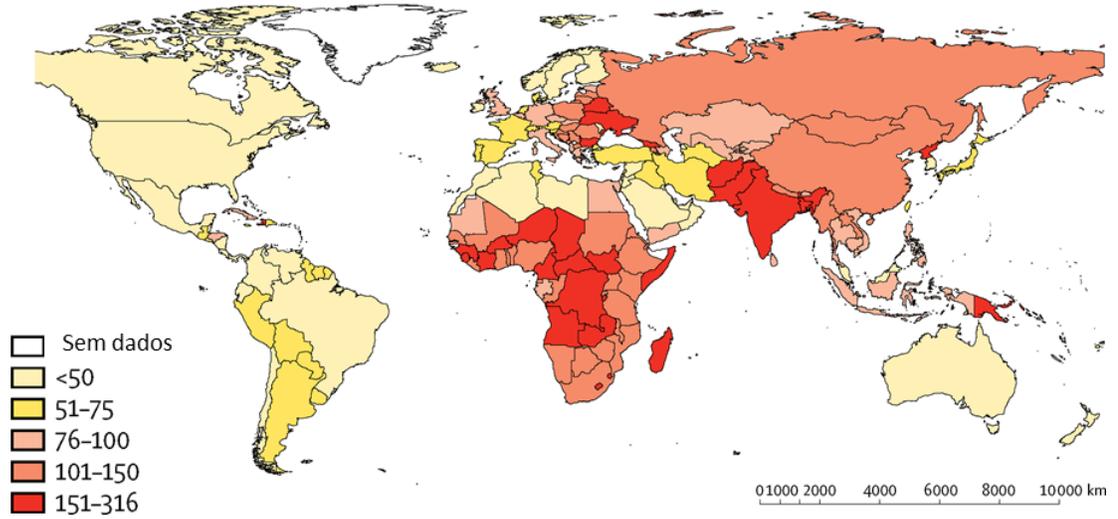
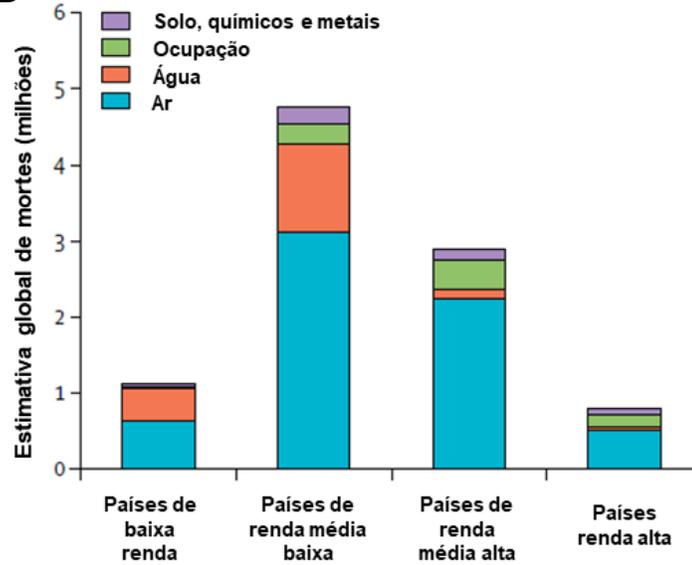
A**B**

Figura 1: Estimativas de mortes causadas por poluição. (A) Número de mortes por 100.000 pessoas que são atribuídas a todos os tipos de poluição. **(B)** Estimativa de mortes por fatores de risco da poluição e nível de renda de países. Fonte: Adaptado de GDB, 2016.

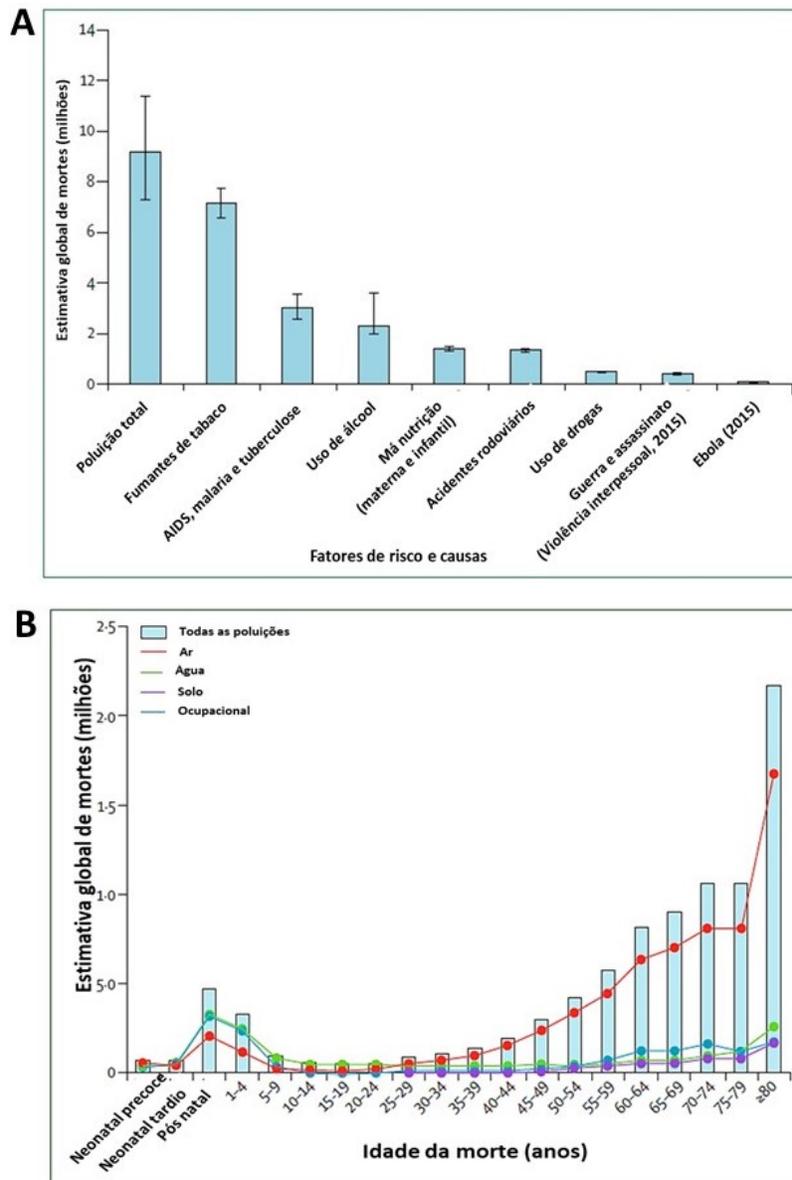


Figura 2: Estimativa de causas de mortes global e idades mais afetadas por mortes relacionadas com poluição. (A) Estimativa global das causas de morte (milhões). **(B)** Correlação da estimativa de mortes e idade de acometimento das mortes por poluição. Fonte: Adaptado de GBD, 2016.

Segundo a União Europeia, a poluição é definida como qualquer forma de matéria indesejada e muitas vezes perigosa, que é introduzida nos ambientes da Terra por meio do

homem e tanto ameaça como prejudica a saúde humana, bem como os ecossistemas (UNION, 2010; LANDRIGAN, PHILIP J. *et al.*, 2018). Uma das grandes causas da poluição no mundo é o crescimento das cidades. Esse efeito se destaca quando se compara com cidades de países que estão em fase de crescimento industrial. Assim como as indústrias, a agricultura mecanizada, a geração de energia e utilização de veículos a base de combustível derivado do petróleo, se destacam como viés de poluição do ambiente aéreo, contaminantes do solo e da água e geração de poluentes químicos (LANDRIGAN, P. J. *et al.*, 2018). As estratégias que envolvem o entendimento científico da poluição e seus riscos à saúde tem crescido significativamente, permitindo entender qual a relação dos poluentes com o aparecimento de doenças, principalmente as doenças não-comunicáveis (SOREK-HAMER, JUST e KLOOG, 2016). Atualmente a poluição tem se encaixado como uma das maiores causas de doenças não-comunicáveis, como por exemplo as doenças respiratórias, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas e até mesmo câncer (GBD, 2015). Das principais fontes de doenças respiratórias e cardiovasculares, causadas por poluição do ar, se destacam os materiais particulados. Com tamanho que varia de 0,005 µm a 100 µm de diâmetro, essas partículas, que tem a capacidade de se depositar no trato respiratório, podem ser compostas de diversas classes de químicos orgânicos e inorgânicos, como os metais de transição e os com potencial tóxico, íons, hidrocarbonetos e microrganismos (FAJERSZTAJN *et al.*, 2013). Quanto a contaminação da água, metais, fármacos, patógenos, alimentos contaminados e pesticidas tem sido associado a distúrbios endócrinos, desconfortos gastrintestinais, problemas renais e problemas no sistema reprodutor (RITTER *et al.*, 2002; HUGHES *et al.*, 2011; EGGERS *et al.*, 2018). Exposição à contaminantes no ambiente de trabalho também leva ao acometimento de doenças como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer de pulmão. Isso ocorre por exemplo em trabalhadores expostos ao ambiente industrial, cuja contaminação pode ser gerada pelas partículas presentes na poeira, benzenos, arsênio, cádmio, crômio e outros poluentes (MACDONALD GIBSON *et al.*, 2013).

Ao longo do século XX e XXI, a sociedade humana vem se deparando com diversas mudanças ambientais, como a poluição ambiental, mudanças climáticas e a grande perda da biodiversidade do planeta. Dentre as causas dessas mudanças, os desastres químicos tem sido alvo de discussão. Alguns exemplos de desastres químicos ambientais e suas principais consequências podem ser citados. Em 1956, na baía de Minamata, Japão, a doença de Minamata foi descoberta, tendo como sua causa a contaminação por metil mercúrio (MeHg) induzida pelo consumo de peixes contaminados. Essa doença chegou a matar cerca de 1043

pacientes dos 2252 diagnosticados. Na Escandinávia, 1960, a chuva ácida contendo dióxido de enxofre e nitrogênio, causou declínio dos peixes presentes em rios e lagos. Na Antártica, desde 1980 foi descoberto o buraco na camada de ozônio ocasionado pela emissão de clorofluorcarbonetos. Em 1984 ocorreu na Índia a tragédia de Bhopal, um acidente industrial que provocou vazamento de gás isocianeto de metila e matou mais de 2000 pessoas em poucos dias e milhares sofreram com morbidade e deficiências permanentes. Na Ucrânia de 1986, o acidente em Chernobyl espalhou material radioativo causando incidência de câncer/carcinoma de tireoide em crianças e adolescentes. No Alasca, 1989, estimou-se que o vazamento de 260.000 barris de óleo Exxon Valdez causou a mortandade de cerca de 100.000 a 300.000 aves marinhas. Na Espanha a catástrofe de Doñana, 1998, aproximadamente 5 milhões de m³ de pirita ácida de iodo contendo zinco (Zn), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e arsênio (As), causou morte massiva de peixes, invertebrados e aves (ALI e KHAN, 2016).

No Brasil, estima-se que cerca de 489 mortes por milhão estão relacionadas com a poluição total (**Fig. 3**). Mesmo com a estimativa desse dado, os estudos publicados acerca da poluição no Brasil ainda são muito escassos, fazendo necessário uma maior abordagem dos tipos de poluição que estão mais relacionados com prejuízos à saúde da população brasileira e do meio ambiente. Apesar disso, alguns estudos tentaram encontrar indícios relevantes da poluição em alguns estados brasileiros, relacionados a concentrações de arsênio (As) associado ao material particulado (MP) atmosférico em Paracatu (MG) (MATOS, 2014), determinação de arsênio, cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn) nos sedimentos da bacia do Rio Ribeira de Iguape (SILVA, 2014) e identificação de valores de referência para chumbo, cádmio e mercúrio no sangue em população adulta da Região Metropolitana de São Paulo (KUNO, 2009). No Rio de Janeiro, ao investigar a presença de metais na Lagoa Ricardo de Freitas, os pesquisadores encontraram toxicidade em organismos marinhos (crustáceo e ouriço-do-mar) relacionada com a presença de Cd, Zn, Pb e Cu (VEZZONE *et al.*, 2019).

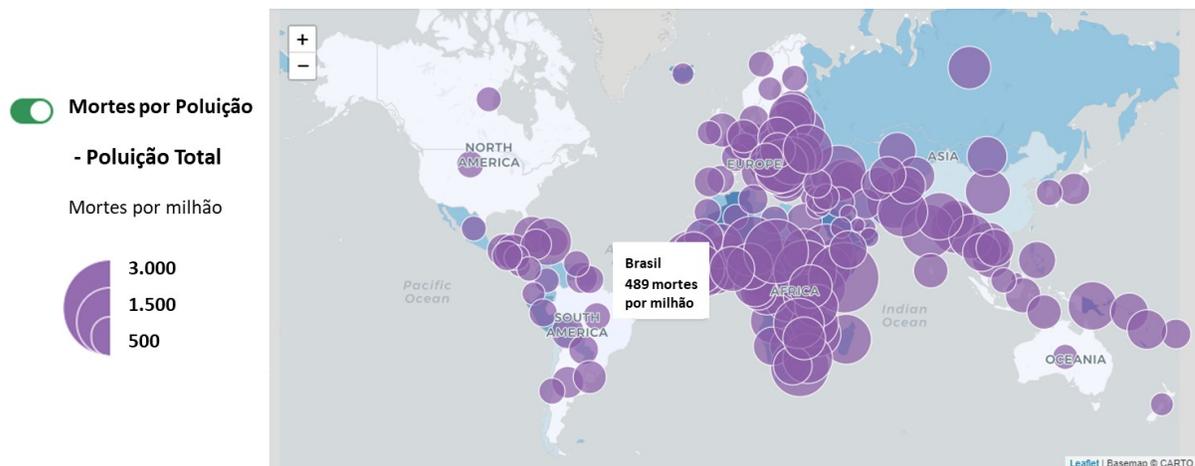


Figura 3: Estimativa das mortes causadas por poluição total no mundo. A figura destaca especificamente o número de mortes no Brasil. Fonte: Adaptado de <https://www.pollution.org/>. Acessado em julho de 2019, às 12:46h.

As pesquisas científicas relacionadas a poluição que são produzidas no Brasil, ainda precisam avançar bastante para que seja de conhecimento geral o real quadro em que o país se encontra em relação a este tema, abordando as suas principais causas e consequências. Uma pesquisa sobre a produção científica que aborda a poluição no mundo como tema, apontou que entre março de 1983 e março de 2013, o Brasil produziu em média cerca de 10 artigos relacionados a poluição do ar, da água e material particulado (FAJERSZTAJN *et al.*, 2013). Os trabalhos que envolvem poluição e seus efeitos deletérios estão cada vez mais ganhando importância diante da atual situação ambiental que o planeta se encontra. No entanto, os danos causados ao meio ambiente e as formas de vida do planeta não são tão recentes.

No Brasil, também houve casos de desastres ambientais que trouxeram prejuízos. Em 1980 as indústrias do polo petroquímico de Cubatão (SP), conhecido como Vale da Morte, despejou gases tóxicos que culminou em problemas respiratórios em bebês, nascimentos com deformidade e contaminação do solo e água da região, além de provocar chuva ácida. Em Goiânia, 1987, o arrombamento de material radioativo causou exposição à césio 137, provocando causas de morte e contaminação do solo, da água e do ar. Entrando no século XXI, no ano 2000 um vazamento de óleo na Baía de Guanabara provocou morte da fauna local e contaminação de municípios próximos. Em 2011 no Rio de Janeiro, a empresa Chevron

despejou aproximadamente 3000 barris de petróleo na Bacia de Campos, chegando a provocar 160 km de mancha de óleo e morte de animais (GONÇALVES, 2017). Em algumas condições, a presença de espécies químicas tóxicas pode existir de forma natural, como é o caso do solo da Amazônia, rico em mercúrio. Na Bacia do Rio Negro, cada quilo de solo contém cerca de 172 microgramas de mercúrio. Fora a condição natural, qualquer desastre que possa vir acontecer pode provocar contaminação em larga escala, como em caso de alteração ambiental e garimpo que utiliza mercúrio para ligação com o ouro. Nesse caso, o mercúrio inorgânico que é convertido em MeHg (orgânico), uma das formas mais tóxicas, pode ser absorvido por pequenas algas, que são consumidas por pequenos peixes que servem de alimento para peixes maiores e que por ventura, são consumidos pela população (FORSBERG *et al.*, 2017; ARRIFANO *et al.*, 2018). Também é importante destacar que, em janeiro de 2019, a barragem Córrego do Feijão, em Brumadinho (MG), causou um desastre ambiental na região, soterrando treze milhões de metros cúbicos de lama tóxica na região. Além de ter causado mais de 250 vítimas, as consequências do desastre envolvem uma grande extensão de água que se tornou imprópria para uso e a destruição de florestas nativas (GREENPEACE, 2019).

Esses são alguns dos casos mais intrigantes na história que relatam todo o potencial tóxico de substâncias e espécies inorgânicas nocivas à saúde humana, à outras espécies de animais e ao meio ambiente em geral. A poluição, tida como uma consequência da atividade antropogênica desenvolvida pelo homem, tem influenciado largamente a exposição ambiental a contaminação por químicos, poluindo ambientes que possuem água fresca essencial para a biodiversidade de rios, lagos, lagoas e mares. Dessa contaminação, é gerada principalmente distúrbios ecológicos que afetam diretamente a cadeia trófica (SARAH *et al.*, 2019). Por exemplo, o zooplâncton que é a base de muitos organismos aquáticos para obtenção de energia e nutrientes, são vulneráveis a contaminação presente nos ecossistemas aquáticos, podendo ter sua população reduzida e quando contaminados, podem servir como organismos bioacumuladores de contaminantes, perpetuando a contaminação na cadeia alimentar marinha (XIONG, W. *et al.*, 2019), bem como a contaminação aquática pode gerar contaminação do ecossistema terrestres (SCHULZ *et al.*, 2015).

Tendo em vista todos esses fatores atrelados a poluição, é imprescindível os estudos acerca dos possíveis contaminantes ambientais e seus efeitos em diversos organismos. Neste trabalho nos propusemos a investigar os possíveis efeitos tóxicos da exposição a espécies

químicas em pescadores do município de Maceió – AL, que desempenham atividade pesqueira no Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM). A falta de estudos que realizem monitoramento ambiental no CELMM se torna o principal motivo para investigar como a saúde da população da região é afetada. Assim, esse estudo servirá como subsídio científico para que outros pesquisadores possam ter com base teórica, dados que forneçam informações de como se dá a relação contaminantes inorgânicos-dano celular e com isso, se estabeleçam possíveis mecanismos atrelados aos prejuízos na saúde causados pela poluição.

2.2 – O Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba

O Complexo Estuarino-Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM) é formado por duas lagunas costeiras, a laguna Mundaú e a laguna Manguaba, que juntas percorrem cerca de 55 km² do estado de Alagoas (**Fig.4**). Geograficamente ele está situado entre os paralelos 09° 34' 00" e 09° 48' 00" de latitude Sul, e os meridianos 035° 44' 00" e 035° 58' 00" de longitude Oeste de Greenwich. Esse complexo estuarino é composto pelo Rio Mundaú, que desagua na laguna de mesmo nome e pelo Rio Paraíba do Meio que desagua na laguna Manguaba, fazendo desse ecossistema um dos mais importantes para o estado de Alagoas devido a sua atividade pesqueira, sua grande produtividade e problemas ambientais. A cidade de Maceió é banhada pela laguna Mundaú, que também banha os municípios de Santa Luzia do Norte, Marechal Deodoro, Pilar e Coqueiro Seco (LIMA, 1990; SALLES, 1995; CORREIA, 2008; TAMANO, 2015). Os ambientes costeiros e estuarinos se comportam como uma fonte de alimentos para a população que consome principalmente pescados. O CELMM é caracteristicamente classificado como um ambiente socioeconômico importante para o litoral de Alagoas, destacando sua grande importância para Maceió, se tornando essencial um monitoramento dos processos naturais e reações ambientais que por ventura são provocadas pela atividade antrópica (ANA, 2004).

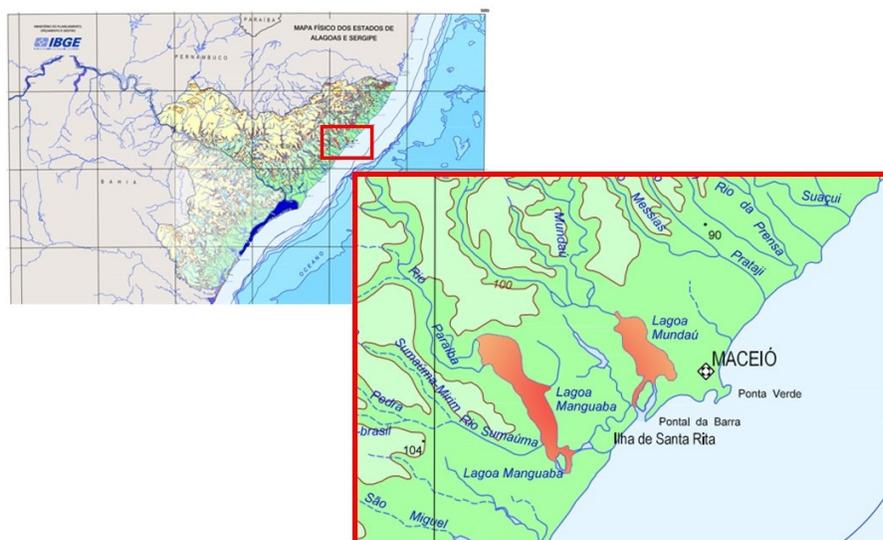


Figura 4: Mapa físico do estado de Alagoas e as lagunas Mundaú e Manguaba que compõem o CELMM. Fonte: Adaptado do IBGE. Disponível em: www.ibge.gov.br.

Este complexo estuarino, especialmente em Maceió, é tido como um berçário para espécies de peixes jovens e moluscos e alterações nas condições ambientais podem prejudicar essas espécies tão importantes para a atividade comercial da região. As atividades antrópicas derivadas da cana de açúcar e crescimento urbano e também a poluição industrial contribuem para modificação das condições eutróficas nas lagunas. Como os rios são uma forma de transportar poluentes, esses possíveis descartes influenciam na salinidade da água e também podem provocar mortandade das espécies do complexo lagunar (OLIVEIRA, 1993). O grande processo de exploração dos recursos naturais tem ocasionado grande degradação do ecossistema em torno do CELMM. Os principais fatores para essa degradação são os desmatamentos nas áreas costeiras, indústria química Salgema S.A e a cloro-química na restinga do Pontal da Barra em Maceió e no Tabuleiro de Marechal Deodoro, grande ocupação territorial das camadas de baixa renda em torno das encostas e cursos d'água, lançamento de efluentes sanitários nas águas e vazamento no polo cloro-químico gerando poluição hídrica (ANA, 2004).

A laguna Mundaú, local onde realizamos nosso estudo por ser a que banha a cidade de Maceió, é caracterizada como uma laguna de água salobra ou estuário, já que suas águas sofrem influência das águas provenientes de rios e do mar. Seu processo de degradação afeta direta e indiretamente a população que vive em seu entorno. Aproximadamente 260 mil pessoas vivem em torno da laguna, dos quais 5 mil são pescadores (BRASIL, 2006). Segundo

a Secretaria de Pesca e Agricultura - SEPAQ, no estado de Alagoas residem cerca de 38 colônias de pescadores registradas pela Federação dos Pescadores do Estado de Alagoas – FEPEAL (PESCA, 2019).

A pesca artesanal no Brasil é geralmente realizada por homens enquanto que as mulheres participam do beneficiamento dos peixes e mariscos. Dentre os impactos decorrentes da atividade antropogênica realizada nos estuários, destaca-se introdução de espécies invasoras, a pesca predatória e a poluição por esgotos e também o aumento da demanda por alimentos juntamente com a pesca ilegal contribui para a diminuição dos estoques nativos e com isso afeta a população dependente da renda gerada pelo CELMM. Vale salientar, a utilização de apetrechos de pesca como rede de espera e tarrafa, que geralmente contém em sua estrutura o chumbo, um metal potencialmente tóxico tanto para homem quanto para a fauna local (SANTOS e SAMPAIO, 2013).

A conservação dos ecossistemas do CELMM é de vital importância para a população. A crescente poluição do ecossistema aquático merece cada vez mais atenção. Recentemente, precisamente no dia dezesseis de junho de 2019, na laguna Manguaba, Marechal Deodoro, uma grande quantidade de peixes apareceu morta sem ainda se saber o que levou a mortandade desses peixes (**Fig.5**). O Instituto do Meio Ambiente (IMA), acredita que uma diminuição do conteúdo de oxigênio dissolvido tenha sido a principal causa de morte dos peixes, que possivelmente foi causado em função das chuvas que revolve a matéria orgânica, responsável pela geração de gás sulfídrico originado da decomposição da matéria orgânica. Não é a primeira vez que esse fato acontece. Em abril, foi registrada a morte de peixes e crustáceos (ALAGOAS, 2019). Mesmo suspeitando da possível causa de mortandade desses peixes, o IMA alertou que não seria seguro o consumo desses peixes já que não se sabe ao certo o que levou a sua morte. Há ainda especulações que a causa seja devido a grande poluição gerada pelo homem, seja vinda de descartes domésticos, como também de descartes industriais.



Figura 5: Peixes e crustáceos aparecem mortos na Laguna Manguaba, Marechal Deodoro, AL. (A) Fonte: G1 Alagoas; (B) Foto: Rodrigo Rocha - TV Ponta Verde.

A preservação dos estuários proporciona um ambiente favorável para o desenvolvimento das espécies presentes e serve com uma fonte confiável de alimentos para a população, gerando também uma renda a partir da sua comercialização. Estuarinos são ambientes complexos, de grande diversidade biológica, apresentam dinâmica e por isso sofrem com a atividades antrópicas que ali são desenvolvidas (DAY, 2012). Dessas atividades, a poluição gerada está diretamente relacionada com alterações nesses organismos aquáticos, podendo causar alterações celulares que prejudicam seu desenvolvimento, crescimento e comercialização (FERREIRA *et al.*, 2019).

O CELMM carece de estudos que monitorem a qualidade das espécies que são comercializadas pelo estado de Alagoas provindos da pesca. Além do grande comércio de peixes, o molusco bivalve sururu (*Mytella falcate*) também é bastante consumido e comercializado (BRASIL, 2006). Em 2009, foi realizada uma análise das concentrações de As, Pb, Hg e Cd de regiões do CELMM em Maceió e Coqueiro Seco, porém encontrou-se valores não detectáveis ou abaixo dos limites preconizados pela Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (Portaria 685/98) (SANTOS, 2009). Esses bivalves, bem como os peixes existentes nesse ecossistema, servem com bioindicadores de poluição ambiental e dos possíveis efeitos tóxicos que podem ser causados à saúde humana (DE SOUZA MACHADO *et al.*, 2016; MEARNNS *et al.*, 2018).

Entre junho de 2017 e setembro de 2018, Santos, M.C. (2019) realizou coletas de 10 pontos (**Tabela 1**) da laguna Mundaú para determinação da concentração de diferentes espécies potencialmente tóxicas. Esses pontos foram selecionados de acordo com proximidade ao polo cloroquímico, elevada/baixa ocupação populacional, locais de pesca do

sururu e emissários de liberação de esgoto. Abaixo estão descritas as coordenadas geográficas dos pontos (P) de coleta estabelecidos pelo autor, estando o ponto 01 mais próximo da Colônia de Pescadores Vieira Lima Z-02, Pontal da Barra, e o ponto 02 mais próximo da Colônia de Pescadores Mesquita Braga Z-16, Trapiche da Barra, de onde foi selecionada a amostra populacional do grupo Exposto para esse trabalho.

As espécies químicas Hg, Pb, As e Cd estão dentre as 126 substâncias tóxicas indicadas pela Agência para Substâncias Tóxicas e Lista de Prioridades de Registros de Doenças de Substâncias Perigosas. Os valores descritos abaixo (**Tabela 2**) se referem as concentrações totais mínimas e máximas dentre as amostragens, que foram detectadas, bem como são mostrados os limites máximos preconizados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (Resolução 357° de 2005) e Organização Mundial da Saúde (OMS) para águas salobras. Nessas análises, o autor mostra que as concentrações de As estão abaixo do que é estabelecido pelas duas legislações utilizadas como referência. Quanto ao Pb, os limites mínimo e máximo representam valores detectados cerca de 11,4x e 123x maior na laguna Mundaú, do que foi preconizado. A concentração máxima de Hg na água foi 7,8x maior do que o estabelecido pelo CONAMA e 15,6x maior do que o estabelecido pela OMS. Os valores de Cd estiveram abaixo do limite de quantificação (<LOQ).

Tabela 1 - Coordenadas cartesianas dos pontos de amostragem de água.

Pontos de coleta (Designação populacional)	Coordenadas Geográficas	
	Latitude - S	Longitude - W
<i>P01 – Braskem</i>	09° 66' 35,10"	35° 76' 58,76"
<i>P02 – Papodromo</i>	09° 67' 28,67"	35° 76' 77,49"
<i>P03 – Campo do Botinha</i>	09° 66' 35,10"	35° 76' 58,76"
<i>P04 – Ponto do lixo</i>	09° 65' 49,71"	35° 76' 60,27"
<i>P05 – Campo do Cosme</i>	09° 64' 84,93"	35° 75' 92,30"
<i>P06 – Levada (esgoto)</i>	09° 65' 40,89"	35° 74' 93,04"
<i>P07 – Mutange</i>	09° 64' 66,40"	35° 75' 01,39"
<i>P08 – Chã de bebedouro</i>	09° 62' 67,25"	35° 75' 93,34"
<i>P09 – Final do bebedouro</i>	09° 60' 94,69"	35° 77' 96,55"
<i>P10 – Meio da lagoa Mundaú</i>	09° 63' 37,75"	35° 77' 07,10"

Fonte: Adaptado de Santos, M.C, 2019. Dados não publicados.

Tabela 2 – Concentrações de elementos encontrados na laguna Mundaú e os limites preconizados pelo CONAMA e OMS. A tabela indica os valores mínimos e máximos encontrados para os elementos listados, em comparação com os limites indicados por duas legislações.

Elemento	[mínima] µg/L	[máxima] µg/L	Valor máx. [µg/L] (CONAMA) ¹	Valor máx. [µg/L] (OMS) ²
<i>Arsênio (As)</i>	0,08	1,80	10	10
<i>Chumbo (Pb)</i>	114,0	1230,0	10	10
<i>Mercúrio (Hg)</i>	0,012	1,56	0,2	0,1
<i>Cádmio (Cd)</i>	<LOQ		5	3

¹Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para água salobra (classe 1); ²Organização mundial de saúde (OMS) para água própria para consumo. Valores referentes ao elemento total, sem especificação. Fonte: Adaptado de Santos, M.C., 2009. Dados não publicados. <LOQ: abaixo do limite de quantificação.

Esses dados coletados por Santos (2019) sugerem que a população de pescadores da laguna Mundaú se encontra em condição de vulnerabilidade, uma vez que dependem da pesca como renda familiar e consumo próprio, além do contato direto com a água contaminada por altos níveis de Hg e Pb.

Este estudo acerca da presença de espécies químicas potencialmente tóxicas no CELMM e sua relação com o estresse oxidativo em pescadores, está sendo o primeiro desenvolvido no estado de Alagoas, que mostrará os efeitos dessa relação na população residente entorno da laguna Mundaú. Uma vez que as condições ambientais diferem de região para região e de população para população, este estudo servirá para entender como se comporta os traços de contaminação ambiental e como é caracterizado o status redox dessa população, afim de se obter dados que permitam ser comparados com resultados encontrados na literatura a respeito do tema.

2.3 – Espécies químicas não essenciais com potencial tóxico associadas a poluição ambiental

As espécies químicas metálicas potencialmente tóxicas que não apresentam um papel biológico em nenhuma dose, são consideradas xenobióticos e são capazes de promover efeitos danosos a saúde. Dentre essas espécies, se destacam o arsênio (As), mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e o cádmio (Cd) por serem os 4 metais xenobióticos mais tóxicos entre os 10 atualmente indicados pela Agência para Substâncias Tóxicas e Lista de Prioridades de Registros de Doenças de Substâncias Perigosas (ATSDR, 2017).

Esses contaminantes podem afetar principalmente ecossistemas onde há água fresca, pois são deles que dependem a população para obtenção de água potável e consumo de alimentos como peixes, moluscos e crustáceos. O manejo inadequado do descarte de resíduos provindos da atividade humana é responsável pela maior parte da contaminação ambiental por essas espécies tóxicas, além da própria condição ambiental que pode naturalmente haver a presença dessas espécies. Os contaminantes podem se depositar nos sedimentos de rios, lagos, estar presente nos mares e contaminar lagunas (MEENA *et al.*, 2018). Ambientes aquáticos são susceptíveis a diversos tipos de contaminação, principalmente os estuarinos por ter influência dos fluxos de água, proporcionando dessa forma maior distribuição dos contaminantes ao longo do curso d'água e seu depósito no sedimento (GEYER e MACCREADY, 2014).

A poluição do ambiente pode vir de diferentes fontes. Metais tóxicos como Cd, Pb, Cu e As podem ser resultantes da atividade em minas (VENKATESWARLU *et al.*, 2016), podem estar presentes em fertilizantes e sedimentos (LIN *et al.*, 2016; GONG *et al.*, 2019), descarte de lixo sólido (IHEDIOHA, UKOHA e EKERE, 2017), podem ser absorvido por plantas cujo solo está contaminado (ZHANG *et al.*, 2019) e podem vir de áreas industriais (SKALDINA, PERANIEMI e SORVARI, 2018). Consequentemente a população que entra em contato com essas fontes listadas, estão vulneráveis a contaminação.

De acordo com os órgãos de saúde, 90% da ingestão de metais e outros contaminantes ocorrem por meio do consumo de água e alimentos (ESPAÑA; RODRÍGUEZ; ROMERO, 2007). Segundo o Anuário de PeixeBR de Piscicultura 2019, Alagoas foi o estado que mais cresceu na produção de peixe em 2018 (135%), o que representa 8.250 t, das quais 6.600 t é referente a tilápia, 1.500 t a peixes nativos e 150 t a outros (Carpa, Truta e Panga) (ABR, 2019). Esses números fortalecem ainda mais a importância deste trabalho. Uma produção grandiosa de pescado provinda de um ambiente aquático provavelmente contaminado por

espécies tóxicas, aumenta a disseminação da contaminação humana e os riscos à saúde em larga escala. Vale salientar que além do pescado, outra fonte de comercialização do estado de Alagoas provém da venda de sururu. Em 2001, o estado chegou a produzir cerca de 217,9 toneladas de sururu.

2.3.1 – Mercúrio e indução de toxicidade

Mercúrio (Hg) é um metal tóxico existente na natureza na forma líquida, que sob pressão e temperatura ambiente possui uma tonalidade branca prateada, podendo rapidamente evaporar se espalhando pelo ar e permanecer na atmosfera por longos períodos. A exposição ao mercúrio pode ocorrer por exemplo, por meio de locais de mineração de mercúrio, incineradores médicos e municipais, instalações de reciclagem, pilhas, lâmpadas fluorescentes, baterias, como conservantes de vacinas, cosméticos e amalgamas dentárias (SOLENKOVA *et al.*, 2014). Quanto a sua especiação, o Hg elementar (inorgânico) (Hg^0) está presente na atmosfera em concentrações >98%, ao ser transportado para lagos, por meio do seu ciclo biogeoquímico sob ação de microorganismos aquáticos, o Hg inorgânico é transformado em sua forma orgânica metilmercúrio (MeHg), principalmente pela bactéria redutora de sulfato (*Desulfovibrio desulfuricans*), que age sob condições com pouca oxigenação e muita matéria orgânica, sendo a principal metiladora do Hg em sedimento estuarino (COMPEAU e BARTHA, 1985; WHO, 2005).

Quando ocorre intoxicação por mercúrio, alguns sintomas podem auxiliar na identificação da contaminação e diagnóstico. Os sintomas mais decorrentes da intoxicação por mercúrio incluem vômito, náuseas, gastroenterite, diarreia, dor abdominal, paladar metálico. Em casos de contaminação por MeHg, a neurotoxicidade é uma consequência porque essa forma orgânica é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, causando até a morte de neurônios (CLARKSON, MAGOS e MYERS, 2003; NELSON, 2011; RAFATI-RAHIMZADEH, KAZEMI e MOGHADAMNIA, 2014).

O Hg^0 atravessa facilmente as membranas celulares se depositando rapidamente nos tecidos. Sua alta capacidade lipofílica permite atravessar até mesmo a barreira hematoencefálica, atingindo diretamente o sistema nervoso central. Uma vez que o Hg^0 entra na corrente sanguínea, esse pode ser oxidado a íon mercúrico (Hg^{2+}) e essa forma divalente pode reagir com diversas moléculas intracelulares (canais iônicos, transportadores, enzimas, tíois não-proteicos). Como consequência, diversas funções celulares e processos de

detoxificação são prejudicados. Além do cérebro, os rins também são fortemente afetados pela toxicidade do mercúrio. Concentrações desse metal na urina serve como um biomarcador da presença do mercúrio no organismo e reflete a toxicocinética desse metal (RICE *et al.*, 2014; ANDREOLI e SPROVIERI, 2017). Um estudo com cultura de células humanas como modelo de neurotoxicidade induzida por mercúrio (0,3 - 30 μ M), mostrou que essa espécie química é capaz de causar morte celular, induzir liberação de caspases e produzir espécies reativas, além de interferir negativamente no ciclo celular (SUDO *et al.*, 2019). Já com ratos espontaneamente hipertensos, a exposição crônica com cloreto de mercúrio (0,07 μ g/kg/dia) acelera a hipertensão e induz produção de peróxido de hidrogênio (FARDIN *et al.*, 2019).

O Hg, principalmente na sua forma orgânica, MeHg, é absorvido pela pele, por via oral, por meio do consumo de alimentos e água contaminada e pelo trato gastrointestinal. O potencial tóxico dessa espécie vem da alta afinidade pelas estruturas celulares, como as proteínas, se ligando principalmente nos eritrócitos ao cair na corrente sanguínea. O mecanismo dessa toxicidade parece estar relacionado com sua alta afinidade por grupos sulfidrilas (-SH), presente nos tióis proteicos (cisteínas) e não-proteicos (principalmente o tripeptídeo glutaciona reduzida, GSH). Estequiometricamente, o MeHg se liga aos resíduos de cisteínas formando o complexo MeHg cisteína (MeHg-Cys) e se liga ao GSH formando o conjugado MeHg-GSH. A proporção da ligação do MeHg com a cisteína ou glutaciona é de 1:1.

Como o mercúrio tem afinidade por tiol proteico e isso pode inibir a atividade de enzimas, existe também a possibilidade dessa espécie causar o funcionamento inadequado do sistema antioxidante enzimático. O mercúrio é um elemento conhecido por sua afinidade com o selênio. Enzimas dependentes de selênio (selenoproteínas), são alvos fáceis de ligação com o mercúrio. Desse sistema das selenoproteínas, destacam-se as tioredoxinas redutases e glutaciona peroxidase. Ao se ligar nos sítios de selênio, o mercúrio pode inibir a atividade dessas enzimas e com isso causar distúrbio na homeostase redox, pois aumenta a formação de espécies reativas intracelular, gerando estresse oxidativo (SPILLER, 2018). Além disso, outras proteínas podem ter sua função afetada pelo Hg, como por exemplo, a enzima anidrase carbônica, cujo Hg pode se ligar a seu resíduo de cisteína (HOGEBACK *et al.*, 2016). Essa enzima é convertida dióxido de carbono e água em ácido carbônico, contribuindo assim para manutenção do pH sanguíneo.

O mercúrio pode permanecer no organismo por longos períodos, sendo distribuído e até mesmo bioacumulado nos tecidos. Mercúrio pode ser detectado por amostras de cabelo, na circulação sanguínea, sangue de cordão umbilical ou fetal e urina. Esse metal tem sido

associado a desordens no sistema nervoso como déficit de leitura, memória e cognição em crianças e em adultos depressão, dificuldade de atenção, insônia e disfunção comportamental e neurológica. No sistema renal tem causado nefropatia, disfunção glomerular, aumento no plasma de creatinina e proteinúria. Nos músculos está relacionado com perda do tônus musculares e disfunção motora. No coração parece estar associado a cardiopatias, hipertensão, doença coronariana e arritmias. Tem relação também com autoimunidade, alergias, anemia hemolítica e diminuição de células imunes. Causa disfunção endócrina e problemas em órgãos reprodutores (SYVERSEN e KAUR, 2012; FIELDS, BORAK e LOUIS, 2017).

A toxicidade do mercúrio é uma das mais preocupantes. O potencial bioacumulativo desse metal faz com que seus efeitos perdurem a longo prazo. Uma atenção redobrada deve ser tida em relação as populações que vivem entorno de corpos d'água, já que essas populações apresentam maior tendência a ter mercúrio no sangue quando este está presente no ambiente (BASU *et al.*, 2018).

2.3.2 – Chumbo, Arsênio, Cádmio e indução de toxicidade

O chumbo (Pb) é um metal tóxico normalmente encontrado na natureza na forma de sulfeto de chumbo (PbS). O chumbo é bastante utilizado na indústria, sendo encontrado na gasolina, utilizado na produção de baterias e tintas, na solda e sua presença no ambiente também pode ser decorrente de atividade vulcânica. Quando liberado no ambiente pode persistir aumentando a probabilidade de contaminação das espécies presentes e pode estar presente na água usada para consumo, bem como em alimentos que por ventura possam estar contaminados (peixes, bivalves, plantas e cereais) (FEWTRELL, 2003; WHO, 2010b).

O chumbo pode ser detectado através do sangue, urina, dentes e ossos, sendo os dentes e ossos um indicativo de exposição acumulada. Sua absorção pode ser elevada a partir do trato gastrointestinal e os efeitos da intoxicação inclui prevalência de anorexia, vômitos e náuseas, pode causar danos hepáticos e renal, hipertensão e a nível cerebral, pode gerar convulsões e até mesmo morte (IPCS, 1995; LI *et al.*, 2015). Chumbo é um metal capaz de interagir com proteínas (e.g. Na-K-ATPase ou Anidrase carbônica), também pode competir com cátions divalentes como o cálcio (Ca^{2+}) (SANDERS *et al.*, 2009). Pode entrar no organismo pelos pulmões, tendo sido detectado partículas $>1\mu m$ e $0,1\mu m$, pode ser absorvido pela pele e o que é reabsorvido após ingestão tende a entrar rapidamente na corrente

sanguínea. No sangue pode penetrar nos eritrócitos e tende a se ligar a hemoglobina, pode se ligar com lipídeos das membranas celulares e o que permanece no plasma pode estar ligado as proteínas plasmáticas (ONG e LEE, 1980; KLOTZ e GOEN, 2017).

Em média de 20-70% do chumbo ingerido pode estar presente na circulação sanguínea, sendo seu tempo de meia vida, quando ligado aos ossos, em torno de 10 a 30 anos (BARBOSA *et al.*, 2005; SACHDEVA *et al.*, 2018). Chumbo em concentrações de 10 µg/dL ou mais no sangue é considerado tóxico e pode ocasionar problemas de saúde (PATRICK, 2006). De 5-80 µg/dL de chumbo no organismo está relacionado com hipertensão, nefropatia, defeitos neurocognitivos, anemia, anormalidade em esperma e aborto espontâneo (WANI, ARA e USMANI, 2015).

Os efeitos intracelulares da toxicidade do Pb estão ligados à sua capacidade de se ligar a grupos sulfidrilas, como o GSH e os presentes nas proteínas, e parece ter forte afinidade com grupos carboxilas dos aminoácidos. Enzimas dependentes de metais, como a superóxido dismutase citosólica (SOD1), cobre/zinco-dependente, podem ser inibidas pelo chumbo porque esse metal tem a capacidade de substituir, por exemplo, o zinco presente na SOD. Isso facilita a maior produção de ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), contribuindo mais ainda para danos celulares por espécies reativas (HULTBERG, ANDERSSON e ISAKSSON, 2001; CORRADI *et al.*, 2011; SACHDEVA *et al.*, 2018).

Quanto ao As, a OMS preconiza que a concentração em água adequada para consumo esteja na faixa dos 10 µg/L, sendo que na literatura já existe registro de As em concentrações que variam de 50-100 µg/L em alguns países. Esse elemento está listado como a primeira substância na Lista de Prioridades de Substâncias da ATSDR 2017, classificadas como ameaça potencial à saúde humana, seguido de chumbo e mercúrio (WHO, 2011; ATSDR, 2017).

Em ambientes aquáticos, o arsênio é encontrado no estado de oxidação +3 e +5, sendo referido como arsenito AsO_3^{-3} (As III) e arsenato AsO_4^{-3} (As V) (IPCS, 2001), se difunde facilmente em ambientes aquáticos e pode se acumular em organismos vivos (KWONG *et al.*, 2010). Quando o As é absorvido, ele pode ser acumulado na pele, ossos, fígado e músculos, tendo seu tempo de meia vida de 2-40 dias até ser excretado na urina. A exposição ao arsênio, quando dura de 5-10 anos, pode causar uma condição patológica chamada arsenicose, caracterizada por lesões na pele, gerar dano em vasos e até ser precursor de câncer (SHANKAR, SHANKER e SHIKHA, 2014; WANG *et al.*, 2017).

O mecanismo pelo qual o As entra nas células leva em consideração seu estado de oxidação. As (III) entra na célula por um transportador denominado aquagliceroporina, um transportador proteico transmembrânico que é capaz de transportar moléculas pequenas como glicerol e ureia (LIU *et al.*, 2002). Já o As (V), este parece ser uma espécie que tem grande afinidade por grupos fosfatos e por essa razão, consegue entrar nas células através do transportador de fosfato (HUANG e LEE, 1996), podendo ser oxidado à As (III).

As (III) é uma espécie que tem sido descrita como indutor de formação de espécies reativas (O_2^- e H_2O_2) e causa danos em DNA dose dependente em queratinócitos (SHI *et al.*, 2004). Como consequente exposição ao As, a pele é um dos órgãos que primeiramente é afetada. Carcinoma hepatocelular e angiosarcoma de fígado tem sido associado a exposição crônica à As inorgânico. Prejuízos nos rins, caracterizados por necrose em glomérulos e túbulos renais (GERHARDT *et al.*, 1978). Hipertensão portal, doenças cardiovasculares e diabetes também são quadros patológicos associados a contaminação por As (CENTENO *et al.*, 2002; KUO *et al.*, 2017). Também se tem indícios de que a toxicidade das espécies inorgânicas de As está associada a doenças cardiovasculares, por causa do seu papel na indução de inflamação e aterosclerose. Devido a isso, casos de acidente vascular encefálico foram associados a pessoas expostas à As (TSINOVOI *et al.*, 2018).

O cádmio (Cd) é um metal potencialmente tóxico que ocorre naturalmente na natureza vindo de fonte vulcânica e pode ser liberado por processos erosivos e carreado através de rios. Dentre as principais atividades antropogênicas envolvidas na fonte de Cd estão mineração e processos de fundição e refino de metais não-ferrosos, queima de combustíveis fósseis e incineração de lixo, baterias, pigmentos e plástico contendo cádmio e também se acumula em solo agrícola, bem como está presente em fertilizantes (NCM, 2003; WHO, 2010a).

Uma medida provisória para tolerância do Cd estabelece que o limite mensal tolerável seja de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal e na água apropriada para consumo, é estabelecido um limite de 3 $\mu\text{g}/\text{L}$ (WHO, 2010a). Em organismos aquáticos, o Cd é absorvido na forma de íon livre (Cd II) e se acumula em moluscos e microorganismos. Sua exposição crônica afeta diretamente os rins, causando danos nesses órgãos e em pulmões tende a causar primeiramente enfisema pulmonar. Esse metal quando bioacumulado pode levar décadas até que seja eliminado dos tecidos e órgãos (NCM, 2003).

O Cd quando absorvido pelo trato gastrointestinal pode se depositar nos órgãos e nas células tende a se ligar a proteínas que contém grupos -SH, como as metalotioneínas que são

de baixo peso molecular (6-7 kDa) encontrada em fígado, rins, cérebro e intestino. (JARUP *et al.*, 1983). Existem indícios da presença de cádmio na urina e o possível desenvolvimento de doença artéria periférica causada pela exposição a tal metal (NAVAS-ACIEN *et al.*, 2005). Em linfócito e monócitos o acúmulo de Cd está envolvido em efeitos citotóxicos e danos em membrana celular (STEFFENSEN *et al.*, 1994).

Quando os casos de poluição aumentam (principalmente por agentes químicos) concomitante a isso pode haver o surgimento de doenças associadas, contaminação de ecossistemas e fauna local e manutenção contínua da exposição ambiental. Muitos efeitos causados por espécies químicas com potencial tóxico parecem apresentar mecanismos envolvem danos celulares, indução de espécies reativas e inflamação. Com isso, fica bastante evidente que grande parte da contaminação da população é proveniente principalmente da atividade antropogênica desenvolvida pelo homem.

2.4 – As Células do sangue periférico: eritrócitos e linfomononucleares

O sangue periférico possui em média de 50 a 60% de volume líquido e o restante é constituído por diferentes tipos celulares. Desse volume líquido do sangue (MAERTENS DE NOORDHOUT *et al.*), a maior parte é constituído de água e os outros componentes incluem íons, glicose, aminoácidos, metabólitos, proteínas e hormônios. Quanto aos diferentes tipos celulares presentes no sangue, estão os eritrócitos, leucócitos e as plaquetas (fragmentos de citoplasma derivados de megacariócitos da medula óssea) (KERN, 2002).

Aqui destacaremos apenas os eritrócitos e os leucócitos por serem os tipos celulares utilizados como modelo de estudo para avaliar a influência das espécies potencialmente tóxicas na produção de espécies reativas, indução de estresse oxidativo, status redox e na função eritrocitária.

2.4.1 – Eritrócitos (Células vermelhas do sangue)

As células vermelhas foram primeiramente observadas e descritas pelo biólogo e microscopista Holandês Jan Swammerdam em 1668, mas apenas em 1675 é que Antonie van Leeuwenhoek, outro microscopista Holandês, descreveu de forma única as características das

células vermelhas encontradas no sangue humano. Eritrócitos ou hemácias, são células sanguíneas que possuem um formato de disco bicôncavo e tamanho variável de 7-8 µm de diâmetro. O formato de disco bicôncavo das células vermelhas é de extrema importância porque elas circulam nos vasos sanguíneos de grande e pequeno calibre, sendo necessário uma deformação para que possam passar principalmente nos pequenos vasos (arteríolas e vênulas). A deformidade tem um papel fundamental para a função, transporte, características mecânicas, diversidade antigênica e sobrevivência das células vermelhas (KERN, 2002; SCHECHTER, 2008).

Os eritrócitos são normalmente renovados a cada 120 dias, sendo 1% das células renovadas a cada dia. O processo pelo qual se dá a produção de novas células sanguíneas é chamado de hematopoese, do Grego *haima* (sangue) e *poiein* (fazer). A hematopoese ocorre primeiramente na fase embrionária e é realizada especificamente pelo fígado e pelo baço no segundo trimestre de gestação e somente a partir do sétimo trimestre é que esse processo de produção de células sanguíneas é realizado pela medula óssea. Após o nascimento essa função é exclusiva da medula óssea dos ossos longos. Especificamente a produção de eritrócitos está incluída em um processo denominado eritropoese. Inicialmente, esse processo de produção de células vermelhas é caracterizado por uma fase com uma fina cromatina nuclear e citoplasma intensamente azul e outra fase caracterizada por citoplasma bem desmembrado e perda do núcleo. A partir dessa fase, fatores de crescimento hematopoiéticos são liberados para que as células se diferenciem e cresçam estimulando precursores hematopoiéticos (KERN, 2002; SCHECHTER, 2008).

As células sanguíneas são então produzidas na medula óssea e no adulto pode chegar a uma produção de $\sim 5 \times 10^{11}$ células por dia. No sangue, a maior parte das células são eritrócitos, 4,5 a 6 milhões por microlitro. Para mensurar os eritrócitos alguns parâmetros são descritos como a quantidade de hemoglobina (Hb) em gramas por decilitro (g/dL), hematócrito (Htc) (volume de células vermelhas como porcentagem do volume total do sangue) e conteúdo de células vermelhas do sangue (milhões de células por microlitros) (KERN, 2002).

Os eritrócitos têm como função primordial o transporte e troca de gases, através da hemoglobina, para todos os tecidos que utilizam o oxigênio no processo de geração de energia. O sangue oxigenado sai dos pulmões para os tecidos e retorna rico em gás carbônico (CO₂) para ser exalado pelos pulmões. Diferente desses tecidos, os eritrócitos possuem poucas organelas, destacando para a ausência de núcleo e mitocôndrias (KERN, 2002; MOHANDAS e GALLAGHER, 2008; SCHECHTER, 2008). No entanto, para que os eritrócitos

possam desempenhar suas funções normais, sua estrutura precisa ser preservada a fim de controlar diversos processos fisiológicos e metabólicos para manutenção de sua homeostase. Isso inclui manter sua forma, estrutura de membrana e troca de diversos metabólitos com o meio extracelular. Por exemplo, a membrana dos eritrócitos apresenta uma deformidade devido a necessidade de circular por vasos sanguíneos para distribuir oxigênio aos tecidos. Essa característica da membrana das células vermelhas é resultado de um processo evolutivo. Sendo composta de fosfolipídios e colesterol, a membrana do eritrócito também possui várias proteínas transmembranas e glicoproteínas, destacando-se a banda 3, uma proteína que é responsável pela troca de ânion nos eritrócitos, e as glicofirinas, que carregam antígenos das células vermelhas. Essas duas proteínas servem como sítios para ancoramento de proteínas do citoesqueleto (conferem a forma do eritrócito). Os eritrócitos também possuem diversos canais que auxiliam a troca de diversas substâncias entre a matriz extracelular e o citosol, que são importantes para manutenção da fisiologia celular (KERN, 2002; MOHANDAS e GALLAGHER, 2008).

A composição da membrana eritrocitária pode determinar todo o funcionamento da célula e influenciar diretamente na sobrevivência da mesma, já que qualquer alteração da deformidade pode ser decorrente de perturbações na estrutura da membrana. Para que haja um bom funcionamento da célula é necessário que os meios extra e intracelular tenham uma comunicação estreitamente regulada para manter as condições fisiológicas. O meio extracelular é composto por um líquido que contém solução de cloreto de sódio com concentrações menores de outros íons, como bicarbonato, potássio e cálcio. São as características de pressão, volume, osmolaridade, pH, concentrações iônicas e de outros componentes nesse líquido extracelular, que possibilita que a célula possa sobreviver em condições normais de funcionamento. As membranas dos eritrócitos também transportam glicose pelo GLUT1, água pelas aquaporinas, transporte de gases pela RhAG, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ transloca sódio e potássio, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ co-transporta sódio e cloro e $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ transporta cálcio. Isso é importante porque consequências como geração de estresse oxidativo, dano na membrana, hemólise, anemias, podem ser decorrentes de um mal funcionamento dos eritrócitos, que leva ao comprometimento desses processos que controlam toda a maquinaria necessária para manter essas células vermelhas viáveis.

Em seguida, serão descritas algumas peculiaridades acerca dos eritrócitos para entender como essas células funcionam e qual a sua importância para os outros tecidos. Serão descritas principalmente informações sobre a hemoglobina, que é a proteína de maior

conteúdo dentro dos eritrócitos e também serão registradas informações sobre o metabolismo energético dessas células vermelhas e sua importância na manutenção de processos oxidativos dentro da célula.

2.4.2 – A hemoglobina (Hb)

A hemoglobina humana (M_r 64.500, 5,5 nm) foi a primeira proteína oligomérica cuja estrutura tridimensional foi determinada por Max Perutz, John Kendrew e seus colegas, em 1959. Sua estrutura (**Fig. 6A**) é constituída de uma forma simples, de uma porção proteica (globina) formada por duas cadeias polipeptídicas com 141 resíduos de aminoácidos cada uma (cadeias α) e outras duas cadeias polipeptídicas formadas cada uma por 146 resíduos de aminoácidos (cadeias β). Além da porção proteica, a hemoglobina possui quatro grupos prostéticos heme, no qual está localizado em seu centro uma molécula de ferro-protoporfirina IX, estando o átomo de Fe^{2+} nesse centro. Essa molécula de ferro-protoporfirina IX está ligada por forças não covalentes e está protegido de soluções aquosas que estão em sua volta (SCHECHTER, 2008; NELSON, 2014).

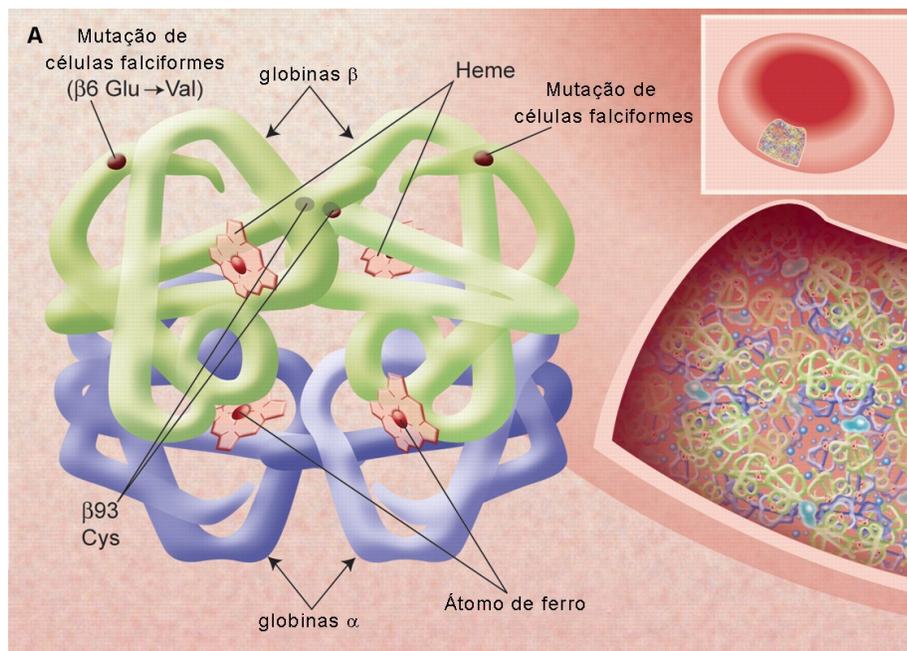


Figura 6: Estrutura da molécula de hemoglobina. (A) Estruturas das cadeias polipeptídicas α e β , grupo prostético heme com átomo de Fe^{2+} em seu centro e locais de mutação que geram a células falciformes. Fonte: Adaptado de SCHECHTER (2008).

A função primordial da hemoglobina presente nos eritrócitos de mamíferos é carrear gases na circulação. Ela transporta o oxigênio (O_2) vindo dos pulmões, passa pelo coração e é direcionado para os tecidos, mas também é capaz de interagir com gases como o dióxido de carbono (CO_2), com o monóxido de carbono (CO) e como óxido nítrico (NO). Nos eritrócitos a hemoglobina tende a estar 96% saturada com O_2 . Esse papel da Hb em carrear o O_2 no sangue foi uma adaptação evolutiva, já que esse gás é pouco solúvel em meio aquoso devido a sua característica apolar e se estivesse totalmente dissolvido no plasma dificilmente chegaria aos tecidos. Para que esse O_2 se ligue no heme, a Hb passa por duas mudanças conformacionais que tende a facilitar a ligação do oxigênio (**Fig. 7**). No primeiro estado denominado T (tenso), a porfirina faz com que o ferro se desloque para o lado da histidina proximal (His F8). O O_2 se liga levando o heme a adquirir uma posição mais planar e fazendo a His proximal se deslocar. Essa ligação do oxigênio ocorre fracamente devido ao estado tenso (de menor afinidade) da Hb. Quando a primeira molécula de O_2 se liga, gera mudanças conformacionais que facilitam a ligação da próxima molécula de O_2 , fazendo com que a hemoglobina saia do estado T para o estado R (relaxado) de maior afinidade (MOHANDAS e GALLAGHER, 2008; SCHECHTER, 2008; NELSON, 2014).

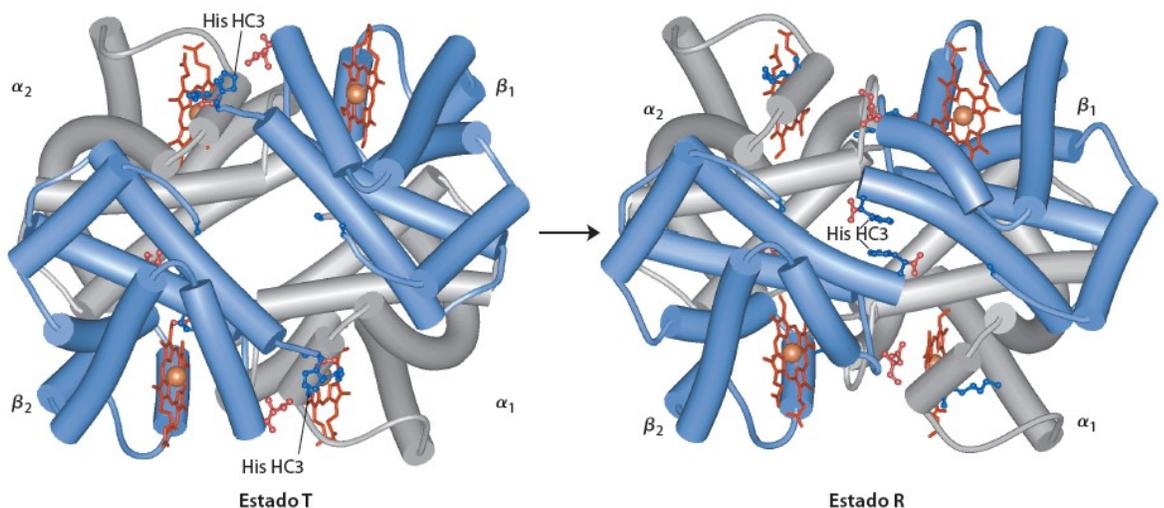


Figura 7: Transição do estado T (tenso) para o estado R (relaxado) da hemoglobina.

Quando toda a proteína sofre essa transição, a estrutura das subunidades individuais se altera pouco, mas os pares de subunidades $\alpha\beta$ deslizam um sobre o outro e sofrem rotação, estreitando o bolsão entre as subunidades β . Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2014).

2.4.3 – O metabolismo energético nos eritrócitos e sua participação em processos oxidativos

Os eritrócitos são células que durante o processo de diferenciação tendem a perder seu material genético nuclear e não possuem ribossomos, impedindo sua capacidade de renovar e sintetizar proteínas, e também não possuem mitocôndrias, o que não permite produzir energia na forma de ATP pelo do processo de fosforilação oxidativa. Principalmente por esse motivo, o metabolismo dos eritrócitos é restrito a glicose presente no plasma, cuja concentração gira em torno de 5 mM. O transporte da glicose para dentro da célula ocorre por difusão facilitada a favor de um gradiente, por um sistema uniporte realizado pelo transportador de unidade de glicose 1 (GLUT1). O GLUT1 é uma glicoproteína de aproximadamente 55 kDa e ocupa cerca de 2% do conteúdo de proteínas presentes na membrana eritrocitária (AIRES, 2008; YACHIE-KINOSHITA *et al.*, 2010; NELSON, 2014).

Uma vez que os eritrócitos captam e internalizam a glicose para o citosol, a glicose é metabolizada para que no fim da via glicolítica (10 reações) (**Fig. 8**), o piruvato que é gerado, é então convertido em lactato pela enzima lactato-desidrogenase (LDH). A redução do piruvato a lactato pela fermentação láctica é dependente de $\text{NADH} + \text{H}^+$, liberando NAD^+ e como saldo final da glicólise se tem duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato) gerados através da fosforilação ao nível do substrato (7ª e 10ª reação) (NELSON, 2014).

Na via glicolítica dos eritrócitos, é preciso levar em consideração duas etapas importantes além das que participam da síntese de ATP. Em situações que são geradas espécies reativas, principalmente o radical ânion superóxido, a Hb pode sofrer oxidação formando a metamoglobina (MetHb) (**Fig. 8**), caracterizada por ter o Fe^{2+} oxidado a Fe^{3+} . Quando isso ocorre, a afinidade do heme pelo O_2 é reduzida, o que pode contribuir para uma situação de hipóxia nos tecidos periféricos. Para contornar essa situação, os eritrócitos tomam como estratégia, utilizar o $\text{NADH} + \text{H}^+$ liberado na reação 6 da glicólise catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase. Esse NADH entra como doador de elétron na reação

realizada pela NADH citocromo b₅ metahemoglobina redutase (metahemoglobina redutase) e com isso promove a redução do Fe³⁺ para Fe²⁺ na Hb (YACHIE-KINOSHITA *et al.*, 2010; HESS, 2016). Com isso, a Hb pode novamente desempenhar a sua função de carrear oxigênio na circulação para os tecidos periféricos.

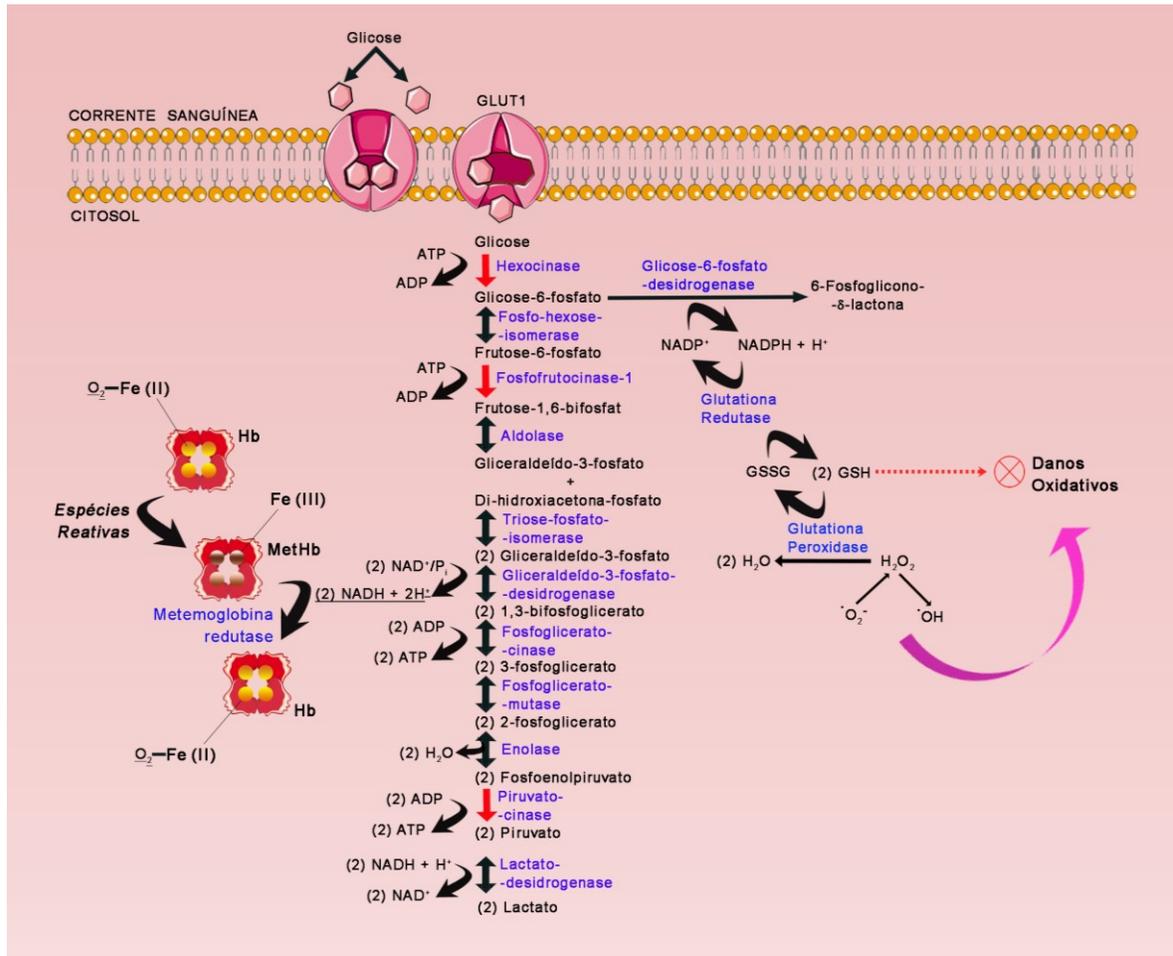


Figura 8: Metabolismo energético e oxidativo nos eritrócitos. Os eritrócitos utilizam glicose como fonte exclusiva de obter energia, oxidando a glicose até lactato. A via glicolítica nos eritrócitos tem um papel fundamental na homeostase redox dessas células, pois em reações específicas gera coenzimas reduzidas (NADH) que auxiliam na restauração da hemoglobina (Hb) que foi oxidada (metahemoglobina, MetHb) e também gera coenzimas reduzidas (NADPH) pela via das pentoses fosfato. Dessa forma é possível reduzir o GSSG a GSH que participa da proteção contra danos oxidativo a biomoléculas, gerados pelas espécies reativas. As setas

vermelhas indicam as reações irreversíveis da glicólise. Em azul estão destacadas as enzimas envolvidas no processo catalítico. Fonte: Autor.

A outra etapa importante na via glicolítica dos eritrócitos é a geração de NADPH + H⁺ pela via das pentoses fosfato. Essa via é uma rota de recuperação energética que além de gerar intermediário da glicólise, gera principalmente NADPH a partir da glicose-6-fosfato, via catálise da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase. Essa formação da coenzima reduzida participa da restauração do GSH (glutathiona reduzida), via glutathiona redutase, que é oxidado a GSSG (glutathiona oxidada) no processo de detoxificação do H₂O₂, pela enzima glutathiona peroxidase, produzido pelo metabolismo celular. Quando os estoques de GSH são restaurados a célula possui mais chances de prevenir o dano oxidativo causado em lipídeos, proteínas e DNA pelas espécies reativas. Esse é um mecanismo eficiente que envolve a participação de intermediários da glicólise, na proteção das células vermelhas e também na preservação da sua função, uma vez que a formação de MetHb é evitada na presença de NADH (NELSON, 2014; ENGELKING, 2015).

Os danos oxidativos nos eritrócitos além de gerar prejuízo na função da Hb, podem direcionar para uma disfunção total da célula. Os mecanismos giram em torno de distúrbio no metabolismo energético, mudanças na fisiologia eritrocitária, danos na membrana e perturbação da homeostase redox. Posteriormente em outro tópico, será explorado com mais detalhes como são geradas as espécies reativas na célula e sua participação no dano celular. Isso servirá de base para a compreensão do trabalho que foi desenvolvido utilizando como muitos modelos experimentais as células vermelhas do sangue, explorando o papel do estado redox na geração de estresse oxidativo.

2.5 – Células linfomononucleares (monócitos e linfócitos)

As células do sistema imune presente no sangue são denominadas de leucócitos, comumente chamadas de células brancas do sangue. As células que constituem os leucócitos são normalmente classificadas como granulares e agranulares. Os granulócitos constituem os neutrófilos, basófilos e eosinófilos, cujas células possuem grânulos utilizados para mediar a atividade imune. Os agranulócitos que não possuem grânulos são os linfócitos e monócitos,

também conhecidas como linfomononucleares, por possuírem apenas um núcleo, e estes dois tipos celulares são os estudados nesse trabalho (KERN, 2002).

Os monócitos constituem cerca de 3-8% dos leucócitos e uma característica dos monócitos, é que após 8-14h no sangue, as células migram para os tecidos e se tornam macrófagos. São duas as funções dos monócitos: fagocitar microorganismos e debris celular (restos celulares); e processar e apresentar antígenos, que se torna um papel fundamental na iniciação de reações imunes (KERN, 2002; LEY, 2008). Sob condições de infecção por patógenos ou na inflamação a resposta imune por macrófagos é acionada, fazendo com que libere citocinas com IL-10, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) para iniciar o processo inflamatório. Os monócitos tendem a migrar para os sítios de infecção por meio de receptores de quimiocinas (aparentemente o CCR2) e apesar dos neutrófilos serem os primeiros a chegar em sítios de infecção e inflamação, os monócitos são importantes nesse papel liberando durante a resposta imune citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α), controlando assim as fases da infecção (LANDSMAN *et al.*, 2009; KARLMARK, TACKE e DUNAY, 2012).

Os linfócitos compõem de 20-40% do total das células brancas presentes no sangue em um indivíduo adulto. Normalmente eles são transientes, se dirigindo da corrente sanguínea para os outros tecidos. Os linfócitos são funcionalmente divididos em linfócitos T e B. Os linfócitos B (LB) são células que participam da imunidade humoral mediada por anticorpos. Elas são maturadas na medula óssea e podem ser encontradas nos linfonodos, no baço e outros órgãos, e estão presentes também na corrente sanguínea. Os linfócitos B participam da imunidade adquirida através do reconhecimento dos antígenos, por meio de imunoglobulinas presente nas membranas (IgM e IgG). Quando os LB reconhecem o antígeno, eles produzem e liberam anticorpos que são capazes de reconhecer esse antígeno, neutralizá-lo ou até mesmo destruí-lo. Além disso os LB atuam em cooperação com os linfócitos T (LT) no combate dos patógenos. Eles participam como células apresentadoras de antígenos depois que interiorizam e processam o antígeno que foi ligado ao receptor de superfície. Quando esses antígenos são processados, na membrana dos LB são expressos peptídeos que se ligam ao complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II), para que então seja apresentado aos LTCD4⁺ (auxiliares) e assim, os LT liberam citocinas e ocorra a resposta humoral contra microorganismos e antígenos (KERN, 2002; MESQUITA JÚNIOR, 2010).

Os linfócitos T (LT) são células originadas de células precursoras da medula óssea, mas são desenvolvidas e maturadas no timo. Elas são capazes de modular a resposta de

outros tipos de células do sistema imune, como os LB, monócitos e macrófagos. Quando os LT maturam, eles expressam os receptores de células T (TCR) funcional e os co-receptores CD4 e/ou CD8. Os TCR na membrana dos LT interagem diretamente com o MHC II e ao reconhece-lo, age em conjunto com o complexo CD3, 5 proteínas da família das imunoglobulinas, que direcionam para uma resposta intracelular subsequente. Os linfócitos T podem ser subdivididos em dois subtipos: as células T helper, que expressam o CD4 que é um antígeno de superfície e são as células responsáveis pela maior regulação das respostas imunes; e as células T supressoras/citotóxicas, que expressam o antígeno de superfície CD8 e são responsáveis por destruir as células infectadas por vírus e rejeitar órgãos transplantados. As células T CD8 produzem perforinas (uma proteína formadora de poros) e granzimas capazes de induzir morte por apoptose (morte celular programada) nas células alvo ou são capazes de expressar o receptor Fas L (CD95) e interagir com as células alvo que possuem a molécula Fas e com isso induzir apoptose nessas células (KERN, 2002; MESQUITA JÚNIOR, 2010).

Os linfócitos são células que funcionalmente tem o papel de manter homeostase nos tecidos a partir de sua atividade imune contra diversos patógenos, mas além do ambiente subcelular, estas células também podem responder ao ambiente extracelular de forma a tentar reduzir possíveis consequências decorrentes de sinais de infecção, dano celular ou outro estressor. Durante a infecção, dano tecidual ou mesmo distúrbios no metabolismo, as células T recebem sinais que convergem para a formação do inflamassoma (complexo multiproteico). O inflamassoma ativa caspase 1 que proteoliticamente gera liberação de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-18. Essa ativação do inflamassoma causa nos tecidos uma situação pró-inflamatória, com recrutamento de neutrófilos, que culmina na morte celular (LATZ, XIAO e STUTZ, 2013).

No ambiente intracelular o inflamassoma pode servir como monitoramento do funcionamento de organelas importantes como as mitocôndrias. Estresse mitocondrial pode ser relacionado com formação do inflamassoma (ativa caspases 1 e 11) e apoptossoma, pois nesse último processo, a liberação de Citocromo c pela mitocôndria ativa caspase 9 sinalizando para morte celular. Esse estresse na mitocôndria leva em consideração a produção de espécies reativas (ERs). Um estado redox prejudicado em que há grande produção de ER e como resposta a essas espécies reativas, o inflamassoma é ativado, bem como os danos causados na mitocôndria sinalizam para liberação e ativação de caspases pró-apoptóticas (ZUO *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2011).

O metabolismo celular também é necessário para manter o gradiente osmótico intra e extracelular e parece existir uma relação entre a osmolaridade, em função do influxo e efluxo de íons, e a indução do inflamassoma. Isso porque o influxo de íons é importante para manter o funcionamento, por exemplo, das mitocôndrias. A relação entre inflamassoma e concentrações de íons parece estar ligada a baixa concentração de íons como o K^+ . Quando este íon está sob concentrações subcelulares e em contrapartida há também liberação de Citocromo c pelas mitocôndrias, o inflamassoma tende a se formar e com isso gerar processos inflamatórios. Outra consequência da baixa concentração de íons é a redução da pressão osmótica. Um ambiente hipotônico extracelular tende a fazer as células incharem na tentativa de manter normais, por exemplo, as concentrações de K^+ e Cl^- . Em resposta ao inchamento das células, outra sinalização pode desencadear a mobilização de cálcio via canais de cátion potenciais do receptor transiente (TRPM7 e TRPV2). Outro canal, o TRPM2, também pode ser ativado via mobilização de cálcio, como também é sensível a ERs, o que significa que um ambiente redox desfavorável pode levar a formação de inflamassoma, já que o TRPM2 está relacionado com a formação do inflamassoma (COMPAN *et al.*, 2012; LATZ, XIAO e STUTZ, 2013; ZHONG *et al.*, 2013).

Tendo em vista o grande papel do sistema imune na manutenção da homeostase celular, no combate a corpos estranhos, o estudo do comportamento das células linfomononucleares quanto a produção de espécies reativas é uma relação importante a se fazer quanto a presença de estressores, no caso desse estudo, as espécies químicas potencialmente tóxicas. Uma vez que o ambiente celular se depara com essas espécies, pode haver uma superestimulação do sistema imune que pode desencadear estresse oxidativo e com isso comprometer o funcionamento de órgãos e tecidos, já que o estresse oxidativo está relacionado com várias patologias.

2.6 – Estresse oxidativo: geração de espécies reativas e sistemas antioxidantes

“*Estresse oxidativo*” é um conceito introduzido na biologia redox e na medicina por volta de 1985, para designar um distúrbio no balanço pró-oxidantes – antioxidantes, a favor da formação dos pró-oxidantes. Ao longo das décadas muitos estudos experimentais vêm tentando demonstrar como a vida aeróbia favorece a mudança do gradiente, em relação a produção de agentes oxidantes a partir de processos oxidativo, e como isso acaba se tornando

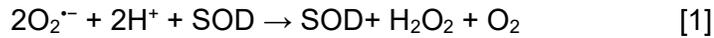
perigoso para o organismo. Esses estudos têm servido como base para o entendimento da participação desses processos em situações fisiológicas e patofisiológicas, como diferenciação celular, inflamação, envelhecimento, combate a agentes infecciosos, ação de drogas e toxicidade de drogas e químicos, desenvolvimento de câncer, dentre outros (SIES, 1985; 2015).

Esses agentes oxidantes são descritos na literatura como espécies reativas. Essas espécies reativas possuem natureza radicalar e não-radicalar. Espécies reativas é um termo utilizado para definir diversas moléculas e radicais livres (substâncias químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados) capazes de causar danos celulares quando em excesso (TURRENS, 2003). As espécies reativas podem ter origem a partir de reações com o O_2 (espécies reativas de oxigênio, EROs) ou de reações com o nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio, ERNs). Durante o metabolismo celular, quando há superprodução de espécies reativas, vários danos celulares são causados, caracterizando uma situação de estresse oxidativo. O excesso de espécies reativas pode causar danos em biomoléculas como lipídeos, proteína e DNA, prejudicando assim o funcionamento da célula. Para que a célula desempenhe suas funções normais, é necessário que estas espécies reativas sejam mantidas sob concentrações fisiológicas por intermédio dos sistemas antioxidantes, o que garante manter a homeostase redox celular (DROGE, 2002).

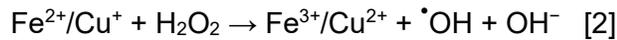
As espécies reativas derivadas do oxigênio são as mais geradas durante o metabolismo celular. Normalmente a formação de EROs se inicia quando o oxigênio sofre uma redução monovalente e fica com um elétron desemparelhado em sua camada de valência, gerando o conhecido ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A formação desse radical ocorre naturalmente em processos metabólicos celulares, podendo ser também induzido por radiação física (MILLER, BUETTNER e AUST, 1990). Mas a maior fonte de geração de ânion superóxido é durante a respiração celular nas mitocôndrias. Durante a transferência de elétrons, pelos complexos da cadeia transportadora, uma pequena porcentagem do oxigênio (2-5%) pode ser naturalmente convertida no radical ânion superóxido (BOVERIS, OSHINO e CHANCE, 1972).

A partir da produção de $O_2^{\bullet-}$, uma subsequente cascata de reações que levam a formação de outras ERs (**Fig. 9**). O ânion radical superóxido em sistemas biológicos sofre dismutação da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), cuja catálise resulta na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa não radicalar [1]. A SOD é a primeira fonte de defesa do organismo contra a formação de espécies reativas. No citosol, ela

é dependente de cobre e zinco (Cu/Zn-SOD1) e nas mitocôndrias ela é dependente de manganês (Mn-SOD2).



Uma das mais conhecidas formas de geração de ERs, a partir do ânion radical superóxido e H_2O_2 , é a reação de Fenton [2], que na presença de metais como Fe^{2+} , Cu^+ e Cu^{2+} , gera o radical hidroxil ($\cdot OH$). Esse radical é dentre as espécies reativas a mais tóxica, isso porque seu tempo de meia vida gira em torno de 10^{-9} s (PASTOR *et al.*, 2000; DESIDERI e FALCONI, 2003).



As ERs também podem ser geradas direta ou indiretamente por fatores exógenos gerando danos celulares e a indução de estresse oxidativo tem sido relacionada, por exemplo, com xenobióticos, íons metálicos e radiação.

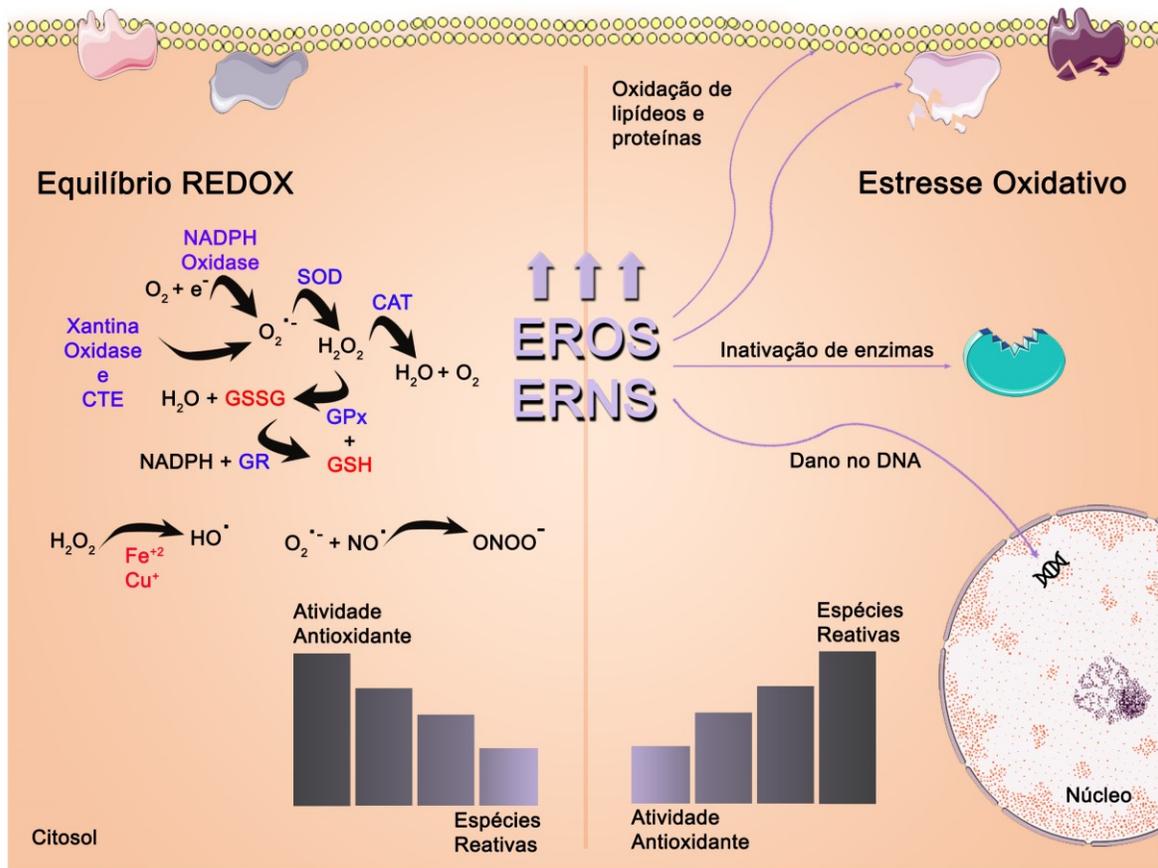
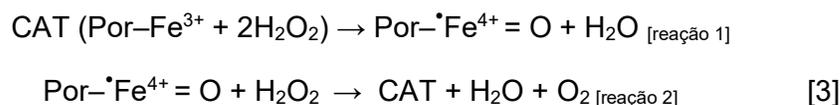


FIGURA 9: Esquema representado o sistema antioxidante e a geração de estresse oxidativo. Quando em equilíbrio redox, a célula é capaz de manter a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) sob nível fisiológico (esquerda). Quando a atividade antioxidante enzimática e não enzimática está diminuída (direita), a produção de espécies reativas aumenta e gera um desequilíbrio redox conhecido como estresse oxidativo, causando danos em biomoléculas (lipídeos, proteínas e DNA) e inativando enzimas. Fonte: Autor.

Quando o ânion radical superóxido é dismutado a H_2O_2 , duas enzimas são capazes de decompor essa espécie reativa. Uma é a catalase (CAT), uma enzima antioxidante que possui um heme (ferriprotoporfirina IX, $Por-Fe^{3+}$) no sítio ativo essencial para sua reação catalítica [3]. A CAT em sua reação catalítica é capaz de decompor moléculas de H_2O_2 à H_2O e O_2 (KIRKMAN e GAETANI, 2007). O peróxido de hidrogênio desempenha um papel fundamental em sítios patológicos, bem como em locais de injúria tecidual e atua em mecanismos de sinalização celular.



A outra enzima capaz de decompor o H_2O_2 é a glutathiona peroxidase (GPx). Essa enzima utiliza o tripeptídeo GSH (formado por glutamato, glutamina e cisteína) em sua reação, para decompor o peróxido de hidrogênio em água [4]. Essa enzima conta ainda com auxílio indireto da glutathiona redutase, que via NADPH, restaura o GSH que é oxidado à GSSG na reação catalítica da GPx. A GPx é uma selenoproteína que também tem a capacidade de decompor hidroperóxidos com auxílio do selênio (FLOHE *et al.*, 1972; CHANCE, SIES e BOVERIS, 1979).



As glutathionas (GSH) desempenham um dos papéis mais importantes do sistema redox celular, seja por estar conjugada na reação da GPx ou por atuar sem ação dessa enzima na redução das espécies reativas. As glutathionas estão presentes nas células em concentrações milimolar e constitui uma base importante da homeostase redox pelo qual tióis de proteínas podem manter seu estado redox ou tióis de proteínas oxidadas pode ser revertido ao seu estado reduzido. Além de atuar como sistema redox, as glutathionas também atuam como

doadoras de elétrons, tanto para eliminação de oxigênio reativo, gerado durante a respiração celular e as reações metabólicas, como a redução de hidroperóxidos e peróxidos lipídicos (MEYER e HELL, 2005). Outra participação do GSH na detoxificação das ERs é por intermédio da enzima glutationa S-transferase (GST). Essa enzima caracteriza-se por atuar na conjugação do grupo –SH do GSH com xenobióticos (drogas, químicos, produtos da peroxidação lipídica), formando o conjugado GSH-xenobiótico. Esse conjugado tende a ser eliminado do organismo prevenindo possíveis danos celulares (MOHANA e ACHARY, 2017).

Além das EROs, existem as ERNs como foi anteriormente mencionado. Essas espécies reativas derivam do nitrogênio e tem como a principal espécie reativa o óxido nítrico (NO^\bullet). Essa espécie radicalar é derivada de reações catalisadas por enzimas chamadas de óxido nítrico sintase, que usam como precursores do óxido nítrico a arginina liberando como produto citrulina (VALKO *et al.*, 2007). O NO^\bullet é abundantemente produzido e desempenha diferentes processos biológicos, que inclui controle da pressão arterial, relaxamento da musculatura lisa, neurotransmissão, mecanismo de defesa e regulação imune (BERGENDI *et al.*, 1999). Em ambiente aquoso, o óxido nítrico tem tempo de meia vida de poucos segundos, ele é solúvel em meio aquoso e lipídico, o que facilita sua entrada no citoplasma e passagem por membranas lipídicas (CHIUEH, 1999). Como as espécies reativas também são utilizadas na defesa do organismo, como é o caso das células imunes que produz tanto NO^\bullet quanto $\text{O}_2^{\bullet-}$, o NO^\bullet ao reagir com o ânion radical superóxido forma uma ERN ainda mais potente, o peroxinitrito (ONOO^-) [5] (KOSHLAND, 1992).



O peroxinitrito quando é formado pode ser protonado e formar o ácido peroxinitroso (ONOOH), que é instável e pode ser decomposto espontaneamente formando subprodutos como o nitrato (NO_3^-) e nitrito ($^\bullet\text{NO}_2$) (RADI *et al.*, 1991a). As ERNs possuem um potente efeito nos tecidos, e particularmente o peroxinitrito reage com tióis e causa sua oxidação. Assim como o peroxinitrito, os nitrito e nitrato que são subprodutos da oxidação do NO^\bullet , também podem reagir com GSH e outros tióis presentes nas proteínas, como as cisteínas e grupos sulfidrilas, levando a sua oxidação e conseqüentemente desregula a função das proteínas (RADI *et al.*, 1991b; WOLIN, 2000).

Peroxinitrito também participa da oxidação de lipídeos, como mostra em um estudo realizado por Rubbo e cols (1984). Os autores também sugerem que a oxidação de lipídeos como o ácido linolênico e lipossomas ocorre por um mecanismo envolvendo EROs para formar o radical hidroxil (OH^{\bullet}), alcóxil (LO^{\bullet}) e peróxil (LOO^{\bullet}) (RUBBO *et al.*, 1994). A partir disso o NO^{\bullet} reage com (LO^{\bullet}) e (LOO^{\bullet}) e forma produtos lipídicos derivados do NO^{\bullet} (PADMAJA e HUIE, 1993).

Outras fontes de espécies reativas são via xantina oxidase, NADPH oxidase. A xantina oxidase metaboliza xantina, hipoxantina e NADPH para que seja formado o radical superóxido e peróxido de hidrogênio. A NADPH oxidase presente nas membranas das células também produzem quantidades consideráveis de radical superóxido e tendem a ser estimuladas quando há sítios de inflamação (WOLIN, 2000).

Uma das principais características de estresse oxidativo na célula é a formação de proteínas carboniladas (carbonilas) e a formação de carbonilas pode estar ligada a geração de lipídeos reativos que são derivados do processo de peroxidação lipídica, também causada por estresse oxidativo. Quando os lipídeos são oxidados, geralmente por ataque do radical hidroxil, uma variedade de moléculas lipofílicas reativas são formadas, resultando na formação de um radical centrado no carbono seguido pela adição de oxigênio molecular. Dentre essas moléculas reativas formadas se destacam os aldeídos (e.g. acroleína e malondialdeído), 4-hidroxi trans-2,3-nonenal (4-HNE) e 4-oxo trans-2,3-nonenal (4-ONE). Nos aldeídos reativos o grupo carbonil resulta em torno da dupla ligação 2,3 e além disso, um grupo hidroxil ou ceto pode retirar elétrons do sistema e deixar o lipídeo ainda mais reativo. Então na reação de carbonilação de uma proteína, o C3 do aldeído reativo fica altamente susceptível a ataque nucleofílico pelas cadeias laterais dos resíduos de histidina, lisina ou cisteína presentes nas proteínas. Isto resulta em um aminoácido alquilado contendo um grupo carbonila livre. Proteínas carboniladas dependem de um ambiente oxidativo dentro da célula diretamente relacionado com produção de espécies reativas e estão envolvidas em várias condições patológicas como diabetes, doenças cardíacas e neuropatias (SCHAUR, 2003; CURTIS *et al.*, 2012).

Essas são as principais formas de produção de espécies reativas descritas, outras envolvem radicais lipídicos, proteicos e mecanismos que envolvem atividade catalítica de enzimas específicas em alguns tipos celulares e organelas. Mas ambos o metabolismo celular e o ambiente extracelular são capazes de induzir a produção de espécies reativas tanto de oxigênio quanto de nitrogênio. Ressalvamos ainda, que as ERs estão envolvidas na etiologia

de diversas doenças em que o estresse oxidativo está presente, como diabetes, hipertensão, aterosclerose, obesidade, doenças autoimunes, dentre outras.

2.6.1 Relação entre eritrócitos, células linfomononucleares e estresse oxidativo

Os eritrócitos têm sido utilizados como um bom modelo de estudos devido a sua abundância, simples estrutura e facilidade de manuseio. As células vermelhas, bem como as linfomononucleares são bons parâmetros para se avaliar diversos insultos e estímulos em seres humanos, já que o método para obtenção dessas células é menos invasivo que os normalmente utilizados (biópsia). Essas células percorrem todo o organismo e estão em contato direto com tecidos e órgãos e como a corrente sanguínea é uma das primeiras rotas de contato com o meio externo, uma vez que agentes externos quando absorvidos entram na corrente sanguínea, as células do sangue tendem a responder bem a fatores externos.

Através desses dois tipos celulares do sangue é possível se obter informações do status redox em humanos. As células tendem a se comunicar por diversos mecanismos e esses dois tipos celulares em particular parecem manter uma relação que pode influenciar na sobrevivência de ambas. Em um estudo *in vitro* Fonseca e cols mostraram a relação entre eritrócitos e taxa de proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC, linfócitos e monócitos). Quando essas PBMCs foram incubadas com eritrócitos, tiveram maior taxa de proliferação, redução de apoptose e menor produção de ERs (FONSECA *et al.*, 2001).

Alguns mecanismos de indução de estresse oxidativo nesses dois tipos celulares podem ser descritos. Em eritrócitos, quando a pressão de oxigênio diminui, aumenta a tendência de ligação da Hb na membrana dos eritrócitos já que esta não está ligada ao oxigênio, facilitando a produção de espécies reativas e consequente oxidação da Hb. Essa situação acaba por gerar estresse oxidativo e leva a danos na membrana dos eritrócitos e consequentemente gera hipóxia tecidual, que é mais um agravante para geração de estresse oxidativo em órgãos e tecidos (RIFKIND *et al.*, 2003). Além disso, os eritrócitos são susceptíveis a ação de H_2O_2 e NO^{\bullet} formados no plasma, bem como eles funcionam como um dissipador de H_2O_2 já que essa ER atravessa a membrana (NIKOLIĆ-KOKIĆ, BLAGOJEVIĆ e SPASIĆ, 2010). Uma outra via de formação de espécies reativas é por atividade da enzima NAD(P)H oxidase e xantina oxidase que utilizam O_2 para formar $O_2^{\bullet -}$ (VALKO *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos têm se dedicado a entender como condições ambientais influenciam no funcionamento redox de eritrócitos. Os eritrócitos são altamente expostos as condições ambientais, uma vez que tudo o que o organismo absorve é direcionado para a corrente sanguínea. A exemplo disso, tem se estudado como espécies potencialmente tóxicas prejudicam os eritrócitos, tanto por estudos *in vivo*, como por estudos *in vitro*. Em resposta a exposição *in vitro* por meta-arsenito de sódio, eritrócitos tendem a produzir mais espécies reativa, reduzir atividade antioxidante e metabólica, desregulação da Na⁺-K⁺-ATPase e sofre danos na membrana celular (MAHESHWARI, KHAN e MAHMOOD, 2017). A crônica exposição ao As também se mostrou capaz de gerar estresse oxidativo em eritrócitos, gerando peroxidação lipídica e oxidação de proteínas e DNA, acompanhado de redução na atividade antioxidante das enzimas SOD, CAT, GPx, GR e redução de GSH (BISWAS *et al.*, 2010). Em exposição ao chumbo, o sistema redox de trabalhadores expostos se mostrou menos efetivo, pois em seus eritrócitos foi detectado peroxidação lipídica, redução de GSH e redução de atividade da SOD e CAT (SUGAWARA *et al.*, 1991).

Outros estudos apontam que a toxicidade de espécies químicas (Pb, Hb, As, Cd) está diretamente ligada a redução de tióis proteicos e não proteicos (GSH), inibição de atividade de enzimas antioxidantes, inibição da enzima δ -aminolevulínico-desidratase que participa da síntese do heme e sua inibição acumula ácido δ -aminolevulínico que rapidamente é oxidado gerando radical superóxido (AHAMED e SIDDIQUI, 2007; LEHMANN, SACK e LEHMANN, 2011). Além disso, chumbo tem sido apontado como causador de hemólise, provavelmente pela capacidade desse metal se ligar na membrana celular eritrocitária causando mudanças osmóticas (LEGGETT, 1993; SUWALSKY *et al.*, 2003; MRUGESH, DIPA e MANISHIKA, 2011). Em uma revisão sistemática, Lopes e colaboradores relatam por meio de diversas referências, a participação do chumbo na geração de estresse oxidativo. Os efeitos estão relacionados com a redução da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) e a produção de espécies reativas. Biomarcadores como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e DNA são citados como reflexo de dano celular. Danos no sistema hematológico também são mencionados pelo fato da exposição ao chumbo causar lesão em células vermelhas do sangue (LOPES *et al.*, 2016).

Já exposição ao Cd pode levar a alterações no ambiente intracelular, particularmente sabendo que o Cd tende a induzir a produção de espécies reativas, porque também é capaz de causar disfunção no sistema antioxidante. Esse metal tóxico tem a capacidade de se ligar a sítios catalíticos onde há zinco e cobre, como os presentes na SOD1. Esse tipo de

competição reduz a atividade dessa enzima antioxidante, como também o Cd parece participar da oxidação dessa enzima causando o mesmo efeito inibitório (POLYKRETIS *et al.*, 2019). Ensaios *in vitro* mostram que Cd está relacionado com a redução de GSH e produção de citocinas pró-inflamatórias em modelo de tecido de vias aéreas humana (XIONG, R. *et al.*, 2019).

Quanto às células linfomononucleares, estas podem gerar espécies reativas via metabolismo mitocondrial através da cadeia respiratória ou por cascata derivada do radical superóxido que é formado tanto pela mitocôndria quanto pela enzima NADPH oxidase presente na membrana celular (SIES, BERNDT e JONES, 2017). Estas células também sofrem efeitos da toxicidade por xenobióticos. Baixas concentrações de mercúrio induz a morte dessas células. Além do que, monócitos parecem ser fortemente mais afetados do que linfócitos na presença de metil mercúrio (SHENKER, ROONEY, *et al.*, 1992; SHENKER, GUO e SHAPIRO, 1998). Células imunes também tem sido citada como vulneráveis a exposição ao arsênio. O mecanismo envolve perturbação no potencial de membrana mitocondrial e liberação de caspases (CAI *et al.*, 2000).

Em relação a processos que induzem autoimunidade, os estudos sugerem que espécies tóxicas como o mercúrio promovem necrose em células ativando o proteassoma. Isso libera peptídeos imunogênicos que gera uma comunicação com linfócitos T. Esses quando possuem Hg ligado a GSH no citosol, libera interleucina-4 que é um mecanismo de sinalização para linfócitos B elevarem no plasma imunoglobulinas (IgG e IgE), caracterizando a autoimunidade (SCHIRALDI e MONESTIER, 2009).

Hg no sangue tem sido associado com mudanças no estado redox. Concentrações maiores que $5,8 \mu\text{g/L}^{-1}$ tendeu a reduzir a razão GSH/GSSG em consumidores de alimentos marinhos (KARIMI, VACCHI-SUZZI e MELIKER, 2016). No entanto, outro estudo mostrou que mulheres que possuíam amalgama dentária (que pode conter Hg) correlacionou a presença de Hg em cabelo com sistema antioxidante no plasma. Os autores mostraram que os níveis de GSH e atividade da SOD estavam aumentados e esse efeito pode ocorrer devido a tentativa do organismo em prevenir a toxicidade causada pelo Hg (CABANA-MUNOZ *et al.*, 2015). Já em crianças que possuem amalgama dentária, tem sido investigado que o Hg presente pode estar ligado a peroxidação lipídica e danos oxidativos gerados pelo estresse oxidativo (AL-SALEH, AL-SEDAIRI e ELKHATIB, 2012; YILDIZ *et al.*, 2017). Além do Hg, outros metais podem causar prejuízo no sistema antioxidante, associado a redução de GSH e razão GSH/GSSG (VACCHI-SUZZI *et al.*, 2018).

Assim, é perceptível a importância do estudo desses tipos celulares no entendimento de como são afetadas pelo estresse oxidativo e as principais consequências geradas no organismo, uma vez que tanto eritrócitos e as células mononucleares estão presentes no sangue circulante e em outros tecidos. As espécies químicas com potencial tóxico estão diretamente associadas ao estresse oxidativo e nosso trabalho é de extrema relevância para contribuição com dados na literatura, para informações a respeito da população local e entender se essas espécies estão atreladas ao estresse oxidativo encontrado na população vulnerável.

3 HIPÓTESE

A exposição ambiental de pescadores à espécies químicas potencialmente tóxicas presentes na laguna Mundaú (Maceió-AL) leva a um prejuízo no status redox celular das células sanguíneas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Avaliar a produção de espécies reativas em células linfomononucleares e o status redox celular em eritrócitos da população circunvizinha a laguna Mundaú (Maceió-AL) exposta a espécies químicas potencialmente tóxicas.

4.2 Objetivos Específicos:

Avaliar em pescadores que vivem entorno da laguna Mundaú em Maceió-AL:

- O tipo de exposição ambiental por meio de questionário epidemiológico;
- Se há alteração em taxas bioquímicas no sangue (hemograma, níveis de glicose, triglicérido e colesterol total, HDL e LDL, marcadores de lesão hepática (ALT e AST));
- Como a exposição ambiental contribui para a geração de espécies reativas de oxigênio em células linfomononucleares do sangue;
- Se existe alteração de biomarcadores de estresse oxidativo em eritrócitos (TBARS, sulfidril, carbonila, GSH e GSSG);
- Como a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutaciona peroxidase e glutaciona S-transferase) é modulada em eritrócitos;
- A capacidade de captação de oxigênio pela hemoglobina dos eritrócitos;
- Se a integridade de membrana dos eritrócitos (fragilidade osmótica) é afetada pela exposição ambiental.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostra populacional:

Esse estudo foi realizado entre Outubro de 2017 e Março de 2019. Para selecionar os voluntários, foi feita uma panfletagem e visitas locais, com aplicação de um questionário socioeconômico (**ANEXO 1**), para obter informações acerca das características epidemiológicas e exposição ambiental. A amostra populacional (homens e mulheres) do grupo controle (média da idade = 39,4 anos) foi composta por voluntários que não vivem próximo da laguna Mundaú e não teve contato com a água da laguna. O grupo exposto (média da idade 49,2 anos) foi composto por pescadores que vivem no entorno da laguna Mundaú e que frequentemente tem contato com a água e alimentos da laguna. A amostra populacional de pescadores faz parte de duas colônias de Maceió: a colônia Vieira Lima – Z 02, localizada na Praça Caio Porto, Pontal da Barra (latitude-S: 09° 66' 35, 10" e longitude-W: 35° 76' 58, 76"), e a colônia Mesquita Braga – Z 16, localizada na rua José Marques Ribeiro, Trapiche da Barra (latitude-S: 09° 67' 28, 67" e longitude-W: 35° 76' 77, 49"). Os voluntários, assinaram previamente um termo de consentimento e livre esclarecimento (TCLE) (**ANEXO 2**). Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética (CAAE número 57998116.8.0000.501).^[1]

5.2 Coleta do sangue para utilização nas técnicas bioquímicas:

As amostras de sangue venoso de voluntários em jejum (10 h) foram obtidas através de punção venosa em tubos com vácuo (SOLENKOVA *et al.*, 2014) contendo anticoagulante EDTA-K3 da marca Olen. Para separar os eritrócitos do plasma, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga 80-2B CENTRIBIO) a 174xg por 10 min. Após centrifugação e separação, parte dos eritrócitos foram congeladas a -20°C até realização dos ensaios e as células linfomonucleares presentes no plasma foram imediatamente isoladas.

5.3 Isolamento das células linfomonucleares:

As células linfomonucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas partir do sangue coletado em tubos com EDTA (adaptado de MALAGUTI *et al.*, 2014). O sangue (12 mL) foi centrifugado a 174xg durante 10 minutos/temperatura ambiente, para obtenção do plasma. O plasma foi transferido para um tubo falcon contendo 2 mL de solução de Histopaque 1077 (HERBST *et al.*, 2015) e centrifugado a 174xg por 30 minutos. As PBMC, identificadas entre

a fase do plasma e Histopaque 1077 foram suspensas em 3 ml de PBS (pH = 7,4, contendo 138,8 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 0,9 mM de KH_2PO_4 anidro e 6,4 mM de Na_2HPO_4) e centrifugadas a 174xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a fração celular foi ressuspensa e centrifugada como na condição anterior. Após lavagem, as PBMC foram ressuspensas em 200 μL de PBS. A viabilidade celular foi testada usando o método de exclusão do trypan blue (PBS 0,1% m/v) usando uma câmara de Neubauer, considerando a viabilidade satisfatória quando maior que 95%.

5.4 Produção de espécies reativas (ERs) em células mononucleares:

Em células isoladas (1×10^5 PBMC mL^{-1}), a produção de ERs foi determinada pela incubação por 10 min no escuro em PBS a temperatura ambiente. A produção de ERs foi monitorada espectrofluorimetricamente (Shimadzu RF5301) utilizando-se dois probes: o diacetato de diclorodihidrofluoresceína ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, que é inespecífico e pode reagir principalmente com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), ânion peroxinitrito (ONOO^-) e radical peroxil ($\text{ROO}\cdot$)) e o MitoSOX Red (específico para ânion radical superóxido). O $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (5 μM), teve sua fluorescência monitorada num comprimento de onda de 488 nm para excitação e 525 nm para emissão, com largura da fenda de 5 nm (LEBEL, ISCHIROPOULOS e BONDY, 1992; GARCIA-RUIZ *et al.*, 1997). Uma curva de calibração de DCF oxidado foi utilizada para determinação da quantidade em nM de DCF produzido. Para avaliar a produção mitocondrial de ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) foi utilizado o MitoSOX Red (5 μM) (MITCHELL *et al.*, 2011). Sua fluorescência foi monitorada num comprimento de onda de excitação de 510 nm com emissão a 580 nm, com largura da fenda de 10 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata.

5.5 Extração de proteínas dos eritrócitos:

Após centrifugação do sangue coletado para separação do plasma, 250 μL de eritrócitos foi homogeneizado, no gelo, em tampão de extração contendo Tris-HCl (50mM, pH 7,4) e EDTA (1mM), utilizando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. As amostras foram então centrifugadas (HEAL FORCE Neofuge 15R) a 1180xg rpm por 10 min / 4° C e o sobrenadante coletado para quantificação de proteínas totais.

5.6 Dosagem de proteínas totais:

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) em espectrofotômetro (AJX-6100PC). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA (2mg ml^{-1}) foi utilizada como padrão para gerar uma curva (5 μg , 10 μg , 15 μg , 20 μg e 40 μg).

5.7 Peroxidação lipídica (conteúdo TBARS):

Para a dosagem de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi utilizada a técnica colorimétrica (BUEGE e AUST, 1978), sendo essa uma técnica muito utilizada para avaliar a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. Foram adicionados 450 μg de proteína do homogenato de eritrócitos à 200 μl de ácido tricloroacético (TCA) a 30% e agitado por 1 min. 200 μl de TRIS-HCl 10 mM, pH 7,4, foi adicionado ao material, agitado por 1 min e então centrifugado a 1180 g durante 10 minutos, 4 °C. O sobrenadante coletado (450 μl) foi misturado ao ácido tiobarbitúrico a 0,73% (450 μl) que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada. A medida da absorbância foi feita em espectrofotômetro (LIBRA S12 UV/VISIBLE) a 535 nm. Os resultados foram expressos em mmol mg^{-1} de proteína.

5.8 Conteúdo de proteínas oxidadas (Carbonilas):

A avaliação da oxidação de proteínas se dá através da reação com o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (ZANATTA *et al.*, 2013). As proteínas (450 μg) foram precipitadas em TCA 30% e o pellet, após centrifugação (1180xg por 15 min), ressuspenso em DNPH 10 mM dissolvido em HCl 2,5 M e incubados no escuro a temperatura ambiente durante uma hora. Posteriormente, as proteínas precipitadas em adição ao TCA foram centrifugadas três vezes a 1180xg por 5 min a temperatura ambiente, usando etanol e acetato de etila (1:1 v/v) para lavagem e o precipitado ressuspenso em guanidina 6 M, incubado à 37°C em banho maria por 5 minutos e levado ao espectrofotômetro (LIBRA S12 UV/VISIBLE) para medida a 370 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína.

5.9 Conteúdo de tiol total (grupos Sulfidrilas):

O conteúdo de sulfidrilas foi determinado a partir da reação com o composto DTNB (5,5'-ditiobis (2 ácido nitrobenzóico). Alíquota do homogenato (50 µg de proteína) foi incubada no escuro com 25 µL de DTNB 20 mM e completado o volume final de 1 mL com tampão de extração. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (AJX-6100PC) a 412 nm (ELLMAN, 1959). Os resultados foram expressos em mmol mg⁻¹ de proteína.

5.10 Quantificação do balanço redox (razão GSH/GSSG): A razão GSH/GSSG foi avaliada através da quantificação do conteúdo de GSH e GSSG (HISSIN e HILF, 1976). Foi adicionado 50 µg do homogenato dos eritrócitos e 10 µL do fluorescente ortoftaldeído (1 mg⁻¹ mL) e lido em espectrofluorímetro Flex Station 3, Molecular Devices, utilizando os comprimentos de onda de 350 nm de excitação e 420 nm de emissão. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de GSH e GSSG foi utilizada para determinar as concentrações dos determinados grupos nas amostras.

5.11 Avaliação da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD):

A determinação da atividade de SOD foi realizada de acordo com MISRA e FRIDOVICH (MISRA e FRIDOVICH, 1972). Homogenato dos eritrócitos (50 µg de proteína) foi incubado no tampão carbonato de sódio (50 mM, pH 10,2 + 0,1 mM de EDTA) em banho-maria a 30 °C. A reação teve início pela adição de epinefrina (3 mM), em ácido acético (0,05% v/v), num volume final de 1 mL. A absorbância foi medida a 480nm em espectrofotômetro (AJX-6100PC) e a atividade determinada durante 1,5 min. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de proteína requerida para inibir a autooxidação de 1 µmol de epinefrina por minuto. Os resultados foram expressos em U mg⁻¹ protein.

5.12 Avaliação da atividade enzimática da Catalase:

A atividade da catalase foi monitorada de acordo com Aebi (AEBI, 1984). O princípio do ensaio é baseado na determinação da constante k de decomposição de H₂O₂. Foi adicionado 25 µg de proteína em tampão fosfato 50 mM (KH₂PO₄ + Na₂HPO₄, pH = 7.0) a 35° C. Em seguida, a reação foi iniciada com adição de 0,3 mM de H₂O₂, num volume final de 1 mL. O decaimento da absorbância foi monitorizado a 240 nm em espectrofotômetro (AJX-6100PC) durante 1 min para determinar a atividade enzimática. Uma unidade da CAT foi definida como a quantidade

de proteína requerida para converter 1 μmol de H_2O_2 por minuto para H_2O . A atividade da catalase foi expressa em U mg^{-1} de proteína.

5.13 Avaliação da atividade enzimática da Glutaciona Peroxidase (GPx):

A atividade da enzima glutaciona peroxidase foi monitorada pela diminuição de absorvância do NADPH a 340 nm em espectrofotômetro (AJX-6100PC) e determinada durante 1,5 min, a 25 °C, em um meio contendo: 40 μg de proteínas, tampão fosfato 0,05M (pH 7,0) e EDTA 0,005 M, NADPH 84 μM , Azida sódica 1,1 mM, GSH 1,5 mM, Glutaciona redutase (GR) 0,1 U e peróxido de hidrogênio 90 μM , num volume final de 1 mL (PAGLIA e VALENTINE, 1967). Uma unidade da GPx foi definida como a quantidade de proteína requerida para converter 1 μmol de NADPH por minuto. Os resultados foram expressos em U mg^{-1} de proteína

5.14 Avaliação da atividade enzimática da Glutaciona S-Transferase (GST):

A atividade da glutaciona S-transferase é diretamente proporcional a taxa de formação do composto DNP-SG (dinitro fenil-S glutaciona), podendo desta forma ser medida através do monitoramento da taxa de formação do composto. Em uma cubeta de quartzo de 1 mL, adicionou-se a amostra (40 μg de proteína) ao tampão fosfato (0,1 M) e EDTA (1 mM), GSH (1 mM) e CDNB (1 mM). A absorvância (340nm) foi monitorada durante 1 min à 28°C, em espectrofotômetro (AJX-6100PC) para determinar a atividade enzimática. Os resultados foram expressos em U mg^{-1} proteína. Uma unidade de atividade enzimática da GST foi definida como a quantidade necessária para catalisar a formação de quanto 1 μmol do composto DNP-GS por minuto (HABIG, 1974).

5.15 Captação de oxigênio por eritrócitos:

A captação de oxigênio por eritrócitos (1mg^{-1} de proteína mL^{-1}) foi medida polarograficamente utilizando-se um eletrodo do tipo OXIGY conectado a um oxígrafo (Hansatech Instrument), em uma câmara de vidro fechada e termostaticada (28 °C) contendo PBS (pH = 7,4) equipada com agitador magnético, num volume final de 1 mL. Esse tipo de eletrodo compreende um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos numa solução eletrolítica (geralmente KCl). A superfície do cátodo é revestida por uma fina membrana de teflon ou polietileno, que são permeáveis ao oxigênio. Quando uma pequena voltagem é aplicada entre os eletrodos, a platina torna-se negativa em relação à prata, tornando-se polarizada. O oxigênio é então reduzido a peróxido de hidrogênio na superfície da platina, funcionando como acceptor de

elétrons, segundo as reações:



Na superfície do ânodo a prata é oxidada, gerando cloreto de prata, segundo as reações:



A corrente gerada pela diferença dos eletrodos é relacionada estequiometricamente à concentração de O_2 na superfície do cátodo. Os impulsos elétricos são transmitidos ao oxígrafo, onde é feita a leitura (ROBINSON e COOPER, 1970). Os experimentos foram realizados em duplicatas

5.16 Fragilidade osmótica dos eritrócitos:

Para avaliar a integridade de membrana dos eritrócitos, foi realizado a técnica do inchamento. Após separação do plasma, os eritrócitos (1mg^{-1} de proteína mL^{-1}) foram incubados em duas diferentes concentrações de NaCl (0,9% m/v - meio isotônico e 0,2% m/v - meio hipotônico), gentilmente misturados e a densidade óptica (DO) monitorada durante 5 minutos em espectrofotômetro (AJX-6100PC) a 540 nm (DACIE, 1984; BEUTLER, 1990). A variação na porcentagem da densidade óptica foi utilizada para visualizar o inchamento dos eritrócitos (SIMÕES-ALVES *et al.*, 2018). Os experimentos foram realizados em duplicata.

5.17 Análise estatística:

Os resultados foram expressos como média \pm D.P.M. (desvio padrão da média), e a análise estatística foi realizada através do teste "t" de Student não pareado para acessar as diferenças entre os grupos. O teste de normalidade D'Agostino foi aplicado para verificar a distribuição antes do estudo de correlação. Uma vez observada uma distribuição não normal dos dados, a correlação entre o nível de mercúrio no sangue, estresse oxidativo e parâmetros bioquímicos foi determinada pelo teste de Spearman. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o

software GraphPad Prism 6.01. O nível de significância considerado foi de $p \leq 0,05$ para todas as análises.

5.8 Suporte financeiro:

PPSUS, CNPq e FAPEAL (Processo 60030 000863/2016).

6 RESULTADOS

6.1 Exposição ambiental a espécies potencialmente tóxicas

6.1.1 Quantificação das concentrações de Hg em amostras de sangue e urina

Em 2019, Santos e colaboradores investigaram a exposição dos pescadores a espécies potencialmente tóxicas (dados não publicados), quantificando Hg em amostras de sangue e urina (**Fig. 1**) dos mesmos voluntários pescadores e controles que participaram desse presente estudo, o qual foi investigado o estresse oxidativo em células sanguíneas. Os valores de concentração de mercúrio no sangue dos pescadores correspondem a 2,14 x maior que o grupo controle (Controle: $4,489 \pm 4,239$ vs. Exposto: $9,587 \pm 9,779 \mu\text{g L}^{-1}$). Os valores mínimo e máximo encontrados para o grupo Controle foram $0,290$ e $17,30 \mu\text{g L}^{-1}$ e para o grupo Exposto foram $0,730$ e $48,38 \mu\text{g L}^{-1}$.

Quanto a urina, também foi encontrada diferença significativa na concentração de Hg entre os grupos (Controle: $0,806 \pm 0,732$ vs. Exposto: $2,15 \pm 1,99 \mu\text{g L}^{-1}$). Os valores mínimo e máximo encontrados para o grupo Controle foram $0,210$ e $2,65 \mu\text{g L}^{-1}$ e para o grupo exposto entre $0,430 - 10,2 \mu\text{g L}^{-1}$.

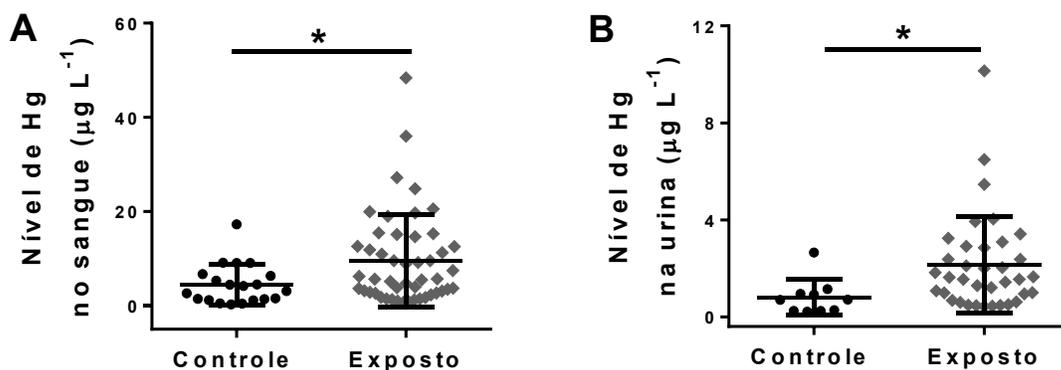


Figura 1. Concentração de mercúrio total no sangue e urina- Os gráficos scatter plot com barras mostram a distribuição do nível de mercúrio no sangue (A) e urina (B). Controle sangue/urina ($n = 20 / 10$) e Exposto sangue/urina ($n = 48/36$); a variação no número total de amostras ocorreu devido à alguns valores estarem abaixo do limite de detecção ($0,007 \mu\text{g L}^{-1}$), ou não foi possível obter todas as amostras (i.e., urina) dos voluntários. Os dados mostram

média \pm D.P.M de ambos os grupos. Os experimentos foram feitos em triplicata. Análise estatística: Teste t de student foi aplicado. (A) *p = 0,0286 e (B) *p = 0,0433.

6.2 Características demográficas, exposição ambiental e bioquímica clínica dos grupos de estudo.

Primeiramente realizamos a aplicação de um questionário sócio-econômico (ANEXO 2) com os pescadores e controles para entender como se dava suas características demográficas e o tipo de exposição ambiental. Na **Tabela 3** está descrito as principais características demográficas dos voluntários desse estudo. De acordo com o número de voluntários que afirmaram positivamente algum critério, o grupo controle declarou não haver fumantes, enquanto que 21,2% dos voluntários do grupo exposto declararam fumar. Dos voluntários que afirmaram consumir álcool, 53,8% e 40,4% corresponde ao grupo controle e exposto, respectivamente. A respeito da presença de patologias, 23,1% do grupo controle e 36,5% do grupo exposto apresentam hipertensão. A incidência de diabetes tipo 2 foi ausente no grupo controle e de 11,5% no grupo exposto. Esses dados são importantes já que tentamos entender se existe patologias associadas ao estresse oxidativo nessa população de pescadores exposta a contaminantes inorgânicos.

A **Tabela 3** também detalha a exposição ambiental de tais grupos. Dos voluntários que declararam ter contato com a água da laguna Mundaú, apenas o grupo exposto (96,2%), reportaram haver contato através de banho ou pesca. Sobre o consumo de peixes da laguna Mundaú, 7,7% do grupo controle declarou consumir, comparado com 84,6% no grupo exposto, enquanto que ao consumo de sururu reportado, foram 50% e 84,6% pelo grupo controle e exposto, respectivamente.

Fica claro com esses dados que a população que vive em torno do CELMM está constantemente exposta a esse ambiente contaminado, seja por banho, pela pesca ou pelo consumo desses alimentos pescados. Essa exposição certamente se torna um fator agravante para esses pescadores que não dispõem de medidas de precaução contra a poluição. Esses dados demográficos e de exposição ao ambiente servem como base para entender se algumas das patologias relatadas podem ser desencadeadas pelo fator poluição ou decorre apenas de hábitos não saudáveis como alimentação não adequada, já que posteriormente serão apresentados dados quanto ao perfil bioquímico desses voluntários.

Tabela 3 – Características demográficas- A tabela descreve as características dos voluntários e tipo de exposição ambiental. Os dados são mostrados como média \pm D.P. ou o número de voluntários que declararam cada tipo de exposição. Total de voluntários $n = 80$.

Parâmetros	(N ou média \pm D.P.)	
	Controle ($n = 25$)	Exposto ($n = 55$)
Idade	39,4 \pm 11,8	49,2 \pm 12,9
Gênero		
Masculino	9	25
Feminino	16	30
Antropometria		
Estatura (m)	1,65 \pm 0,09	1,65 \pm 0,08
Massa (kg)	73,3 \pm 15,0	78,3 \pm 18,0
Índice de massa corporal (IMC)	26,9 \pm 4,7	28,5 \pm 5,9
Hábitos e histórico de doenças		
Fumo	0	11
Consumo de álcool	14	21
Hipertensão	6	19
Diabetes Tipo 2	0	6
Câncer ^a	0	1
Exposição ambiental		
Contato com a água da laguna Mundaú ^b	0	50
Consumo de alimentos		
Peixe	2	44
Sururu	13	44

^a Atualmente curado // ^b Banho e/ou pesca

6.3 Perfil Bioquímico de pescadores da laguna Mundaú

Devido a possibilidade de alterações no metabolismo interferir na resposta ao estresse oxidativo dos indivíduos, foram realizadas algumas análises de Bioquímica clínica do sangue e plasma para verificar se as taxas de glicose, triglicerídeo, colesterol total, LDL, HDL, ALT e AST se encontram normais, bem como o hemograma e leucócitos (monócitos e linfócitos). Os dados da **Tabela 4**, mostram que quanto ao hemograma, a quantidade de eritrócitos, a quantidade de hemoglobina e o hematócrito não diferiram significativamente entre os grupos.

O número total de leucócitos também não teve diferença entre os grupos, bem como monócitos e linfócitos.

Em relação a bioquímica clínica, o nível de glicose está dentro da normalidade em ambos os grupos. O triglicérideo sérico, LDL e HDL não apresentaram diferença estatística entre os grupos, bem como o colesterol total não mostrou uma tendência a estar mais alto no grupo dos pescadores, quando comparado com o grupo controle.

Como o estresse oxidativo pode ser responsável por danos celulares e o fígado tem uma grande participação na detoxificação de xenobióticos, foram quantificados dois marcadores de lesão hepática. A concentração de alanina aminotransferase mostrou significativamente menor no grupo exposto, mas a concentração de aspartato aminotransferase não teve alteração significativa entre os grupos.

Tabela 4 – Parâmetros de Bioquímica clínica- Os dados mostram valores referentes ao conteúdo sanguíneo, metabólitos e aminotransferases dos grupos controle e exposto. Análise estatística: Teste t de Student foi aplicado. Total de voluntários $n = 84$.

Parâmetros	Média \pm D.P.		Valores de referência (>16 anos)	Valor de p
	Controle ($n = 24$)	Exposto ($n = 60$)		
Conteúdo do sangue				
Eritrócitos	4,69 \pm 0,35	4,82 \pm 0,63	4,30 – 5,70 milhões de cél mm^{-3}	0,4262
Hemoglobina	13,9 \pm 1,05	13,7 \pm 1,57	13,5 – 17,5 g dL^{-1}	0,6657
Hematócrito	40,08 \pm 2,49	41,2 \pm 4,22	39,0 – 50,0 mL Erit dL^{-1}	0,7106
Leucócitos totais	6749 \pm 1794	7006 \pm 1932	5000 - 10000 mm^{-3}	0,6195
Monócitos	398 \pm 125	442 \pm 184	300 - 900 mm^{-3}	0,3421
Linfócitos	2066 \pm 466	2412 \pm 758	900 – 2,900 mm^{-3}	0,803
Metabólitos				
Glicose	82,6 \pm 10,5	83,3 \pm 15,6	60 - 99 mg dL^{-1}	0,8359
Triglicérideos totais	150 \pm 44,6	135 \pm 55,9	< 150 mg dL^{-1}	0,2816
Colesterol total	185 \pm 33,0	185 \pm 33,5	< 200 mg dL^{-1}	0,9629
LDL	108 \pm 29,2	106 \pm 31,9	< 100 mg dL^{-1}	0,7535
HDL	46,4 \pm 12,9	45,7 \pm 11,4	40 - 60 mg dL^{-1}	0,7957
Aminotransferases				
ALT	24,2 \pm 6,37	17,9 \pm 9,37 ^a	10,0 – 41,0 U L^{-1}	0,0077
AST	26,5 \pm 9,03	24,0 \pm 7,73	10,0 – 40,0 U L^{-1}	0,2355

^aEstatisticamente significativa comparado com o grupo controle.

6.4 Produção geral de ERs e ânion superóxido mitocondrial por PBMC de pescadores da laguna Mundaú

Para entender como se comportava a produção de espécies reativas nos voluntários dos grupos controle e exposto (pescadores da laguna Mundaú), incubamos as células linfomononucleares isoladas do sangue com dois compostos fluorescentes. Primeiro investigamos a produção de espécies reativas em geral com o marcador fluorescente H₂DCF-DA (**Fig. 2A**) que é capaz de se ligar à algumas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e notou-se que as células dos pescadores expostos ao ambiente com contaminantes inorgânicos produziram 70,5% mais espécies reativas quando comparado com o grupo controle (**Fig. 2B**) (Controle: $0,733 \pm 0,34$ vs Exposto: $1,25 \pm 1,13$ nM DCF oxi). Sabendo-se que a maior fonte de espécies reativas dentro da célula são oriundas do metabolismo oxidativo mitocondrial, as células linfomononucleares foram incubadas com o marcador fluorescente MitoSOX que é específico para ânion radical superóxido mitocondrial. No entanto, os resultados (**Fig. 2C**) mostraram que aparentemente a via mitocondrial de espécies reativas não está predominando nestas células uma vez que produção de ânion radical superóxido não diferiu significativamente entre os grupos (Controle: $3,44 \pm 1,120$ vs Exposto: $3,45 \pm 1,33$ Δ fluorescência; $p=0,9835$).

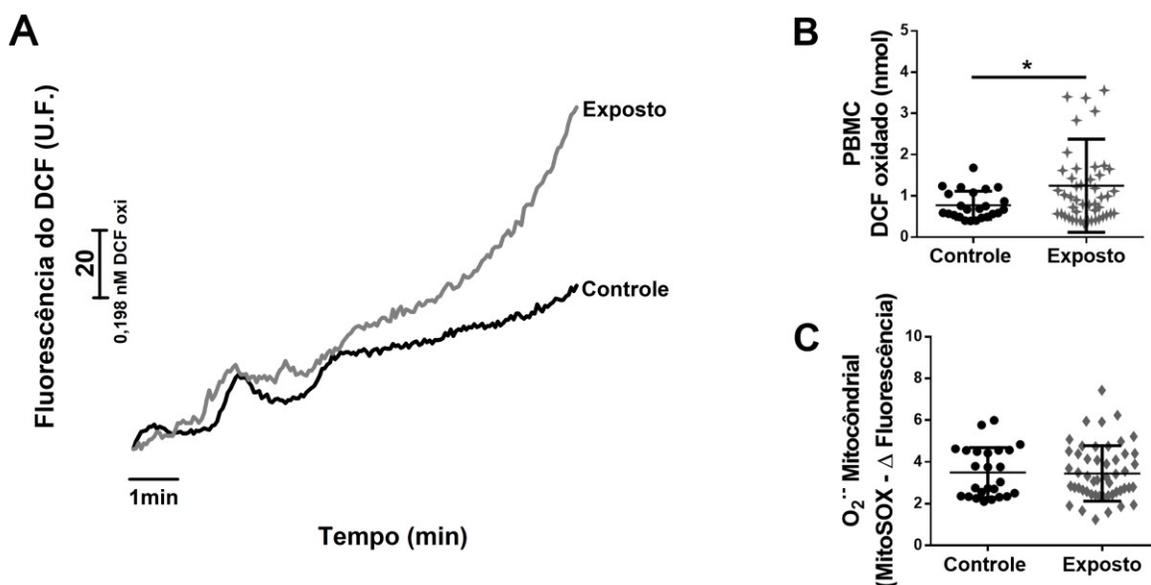


Figura 2: Produção geral de ERs de ânion radical superóxido mitocondrial- (A) Linhas representativas da produção de DCF em PBMC de voluntários controles e expostos. (B) O gráfico scatter plot representa o conteúdo de DCF (nM) de ambos os grupos Controle, n=24 e

Exposto, n=48. (C) Δ de fluorescência da produção de ânion radical superóxido mitocondrial dos grupos Controle, n=26 vs Exposto, n=50. Os experimentos realizados em duplicata, mostram média \pm D.P.M. de ambos os grupos. Análise estatística: Teste t de student foi aplicado. (B)*p=0,0476. U.F. (Unidade de Fluorescência); nM (nanomol); oxi (oxidado).

6.5 Biomarcadores de estresse oxidativo em eritrócitos de pescadores da laguna Mundáu

Para monitorar os danos celulares decorrentes de uma possível situação de estresse oxidativo, avaliamos em eritrócitos o conteúdo de biomarcadores relacionados com oxidação de lipídeos e proteínas. Inicialmente foi quantificado o conteúdo de TBARS, um biomarcador de peroxidação lipídica (**Fig. 3A**). A **Fig. 3B**, mostra o conteúdo de carbonilas, sendo esse biomarcador uma indicação de proteínas que são carboniladas, uma característica de situação de estresse oxidativo. Os resultados obtidos mostram que no grupo dos pescadores há um indicativo de peroxidação lipídica, uma vez que o conteúdo de TBARS aumentou 150,7% comparado com o grupo controle (Controle: $6,70 \pm 2,52$ vs Exposto: $16,8 \pm 4,11$ mmol/mg⁻¹ de proteína). Quanto a oxidação de proteínas, o grupo dos pescadores mostraram um aumento de 40,7% no conteúdo de carbonilas, comparado com o grupo controle (Controle: $14,4 \pm 2,3$ vs Exposto: $20,2 \pm 10,6$ mmol/mg⁻¹ de proteína).

Posteriormente avaliamos o conteúdo de grupos tióis importantes para manutenção do estado redox celular (sulfidrilas e GHS). Quando a célula se encontra em estresse oxidativo, um dos indicativos de que a capacidade antioxidante está prejudicada é a diminuição das sulfidrilas e GSH (glutathiona reduzida). Esses tióis estão presentes nas células, seja fazendo parte da estrutura de macromoléculas, como as sulfidrilas das proteínas ou auxiliando na atividade antioxidante, como no caso do GSH, mantendo a produção de espécies reativas a níveis fisiológicos. Como mostra a **Fig. 3C**, o conteúdo de sulfidrilas nos eritrócitos do grupo dos pescadores expostos ao ambiente contaminado está significativamente diminuído cerca de 36,47%, comparado com o grupo controle (Controle: $1,59 \pm 0,85$ vs Exposto: $1,01 \pm 0,63$ mmol/mg⁻¹ de proteína). Concomitantemente com esses resultados, vimos que o conteúdo de GSH (glutathiona reduzida) nesses pescadores (**Fig. 3D**) se encontra diminuído 16,52% (Controle: $12,1 \pm 2,91$ vs Exposto: $10,1 \pm 4,14$ μ mol/mg⁻¹ de proteína), no entanto, o conteúdo de GSSG (glutathiona oxidada) (**Fig. 3E**) não apresenta diferença estatística entre os grupos

(Controle: $101 \pm 22,9$ vs Exposto: $102 \pm 39,4$ $\mu\text{mol}/\text{mg}^{-1}$ de proteína). Como o conteúdo de glutathiona reduzida está menor nos eritrócitos dos pescadores, isso resultou num estado redox (razão GSH/GSSG) regulado negativamente (**Fig. 3F**) (Controle: $0,121 \pm 0,029$ vs Exposto: $0,101 \pm 0,033$), diminuindo cerca de 16,52%.

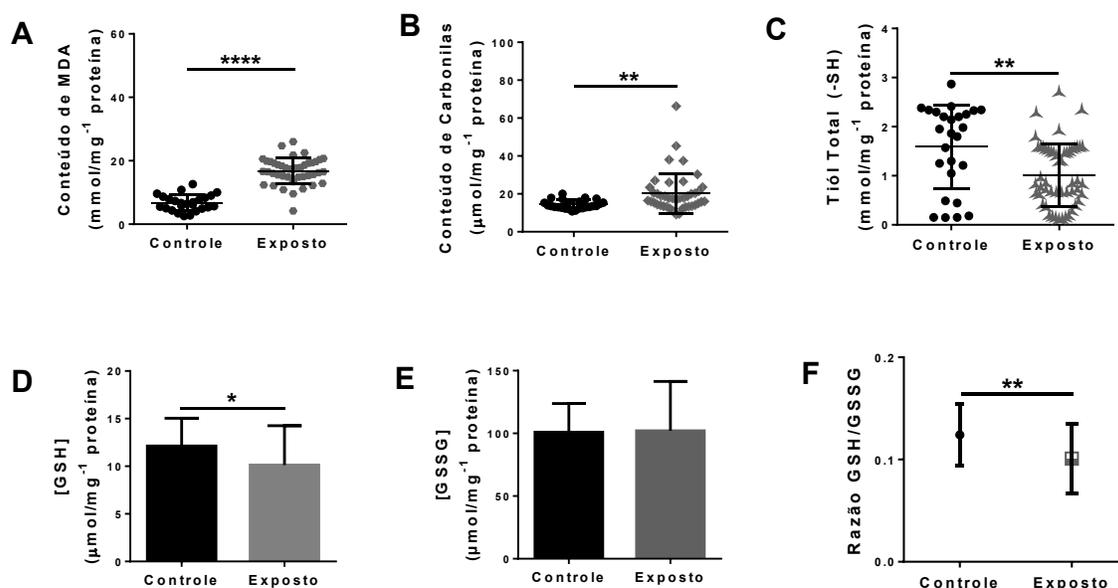


Figura 3: Exposição ao mercúrio ambiental aumentou dano em biomoléculas e diminuiu estado redox nos eritrócitos de pescadores- (A) Conteúdo de TBARS; (B) Conteúdo de proteínas carboniladas; (C) Conteúdo de tiól total (grupos sulfidrilas); (D) Conteúdo de glutathiona reduzida (E) Conteúdo de glutathiona oxidada (GSSG) e (F) Razão GSH/GSSG (estado redox). Os dados mostram média \pm D.P.M. (A-C) Controle, n = 25-26 vs Exposto, n = 42-55; (D-F) Controle, n = 22 vs Exposto, n = 47 Análise estatística: Teste t de student foi aplicado. (A) ****p < 0,0001; (B) **p = 0,0079; (C) **p = 0,0012; (D) *p = 0,0451; **p=0,0075.

6.6 Atividade do sistema antioxidante enzimático em eritrócitos de pescadores da laguna Mundaú

Visto que os eritrócitos do grupo de pescadores expostos apresentaram resultados que sugerem danos de macromoléculas e desbalanço do estado redox, procuramos investigar como se comportava o sistema antioxidante enzimático, que assim como o não-enzimático, promove a manutenção da homeostase redox celular. A **Fig. 4A** mostra a atividade da enzima superóxido dismutase. Esta enzima teve uma diminuição em sua atividade de aproximadamente 23,6% no grupo exposto quando comparado com o grupo controle (Controle: $0,474 \pm 0,095$ vs Exposto: $0,351 \pm 0,161$ U/mg⁻¹ de proteína). Em relação as enzimas catalase e glutaciona peroxidase (**Fig. 4B e C**) que são capazes de detoxificar o H₂O₂ intracelular, não houve alteração significativa entre os grupos na atividade da catalase (CAT – Controle: $0,679 \pm 0,290$ vs Exposto: $0,625 \pm 0,426$ U/mg⁻¹ de proteína) porém, houve diminuição de 28,37% na atividade da glutaciona peroxidase (GPx – Controle: $0,074 \pm 0,024$ vs Exposto: $0,053 \pm 0,035$ U/mg⁻¹ de proteína).

Parte da função do sistema antioxidante consiste em eliminar xenobióticos, afim de se evitar toxicidade para a célula. Em função disso, quantificamos a atividade da enzima glutaciona S-transferase, cujo principal papel é conjugar xenobióticos com o GSH, formando o complexo GSH-xenobiótico que tende a ser excretado pelas células. Sendo assim, os dados mostram uma sutil, mas significativa, diminuição de 19,04% na atividade da GST (**Fig. 4D**) nos eritrócitos do grupo exposto em relação ao grupo controle (GST – Controle: $0,042 \pm 0,011$ vs Exposto: $0,034 \pm 0,012$ U/mg⁻¹ de proteína).

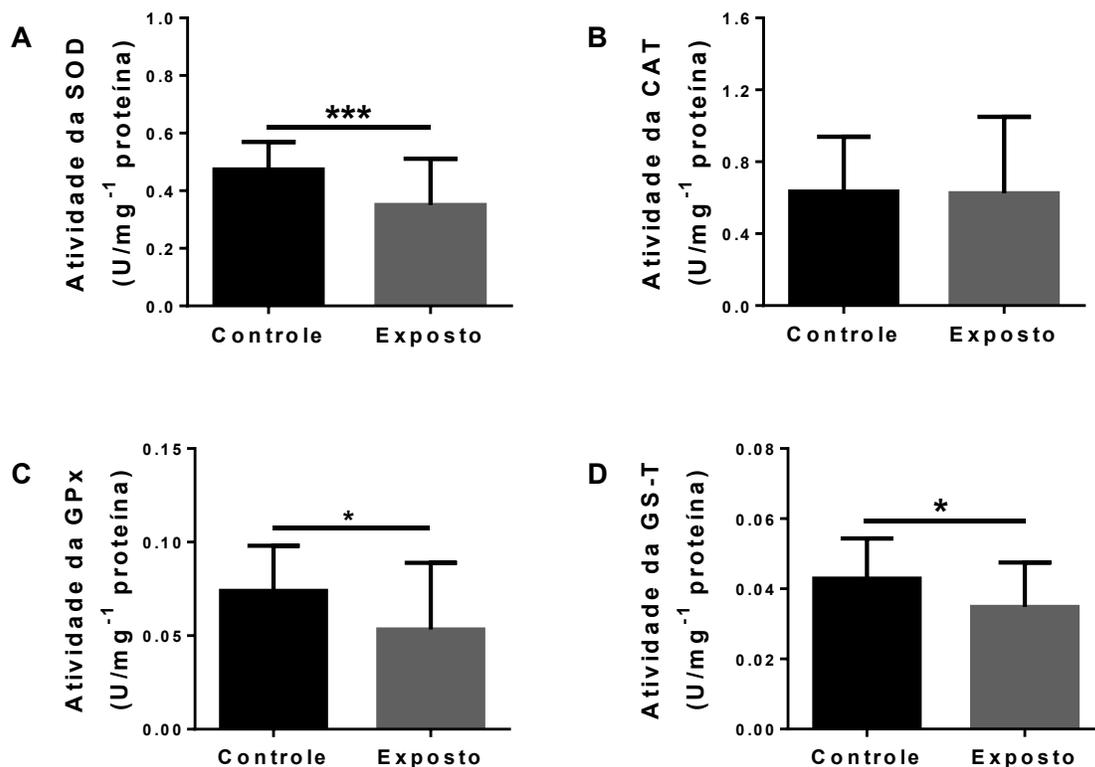


Figura 4: Atividade do sistema antioxidante enzimático em eritrócitos- (A) Atividade da superóxido dismutase; (B) Atividade da catalase; (C) Atividade da glutatona peroxidase; (D) Atividade da glutatona S-transferase. A atividade de cada enzima foi iniciada com adição de seus respectivos substratos. Os dados mostram média \pm D.P.M. de ambos os grupos (Controle, n = 24-26 vs Exposto, n = 47-50). Análise estatística: Teste t de student foi aplicado. (A) ***p = 0.0006; (C) *p = 0.0109 e (D) *p = 0.0106.

6.7 Exposição a contaminantes inorgânicos reduz capacidade de captação de oxigênio dos eritrócitos de pescadores da laguna Mundaú

Sabendo-se que em situações de estresse oxidativo o Fe^{2+} presente na hemoglobina pode ser oxidado a Fe^{3+} e esse efeito pode reduzir a afinidade do grupo heme com o oxigênio, bem como Hg pode se ligar a cisteínas da hemoglobina, investigamos como se comporta a capacidade de captar o oxigênio dos eritrócitos do grupo controle e do grupo exposto. Ao incubar os eritrócitos em PBS (pH 7,4), verificou-se que a captação de oxigênio (**Fig. 5**) se

encontra diminuída 40% no grupo exposto quando comparado com o grupo controle (Controle: $338 \pm 75,8$ vs Exposto: $202 \pm 87,1$ nmol O_2 /min/mg⁻¹ de proteína).

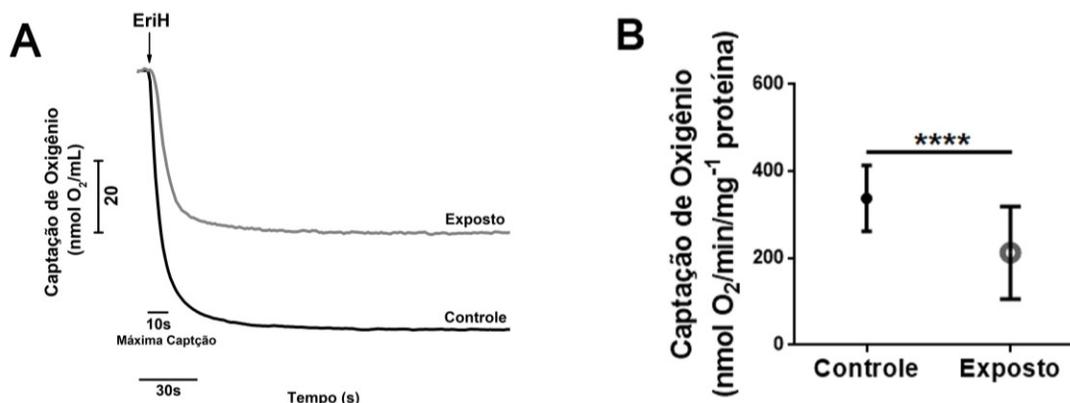


Figura 5: Eritrócitos de pescadores expostos ao ambiente aquático com mercúrio possuem menor capacidade de captar oxigênio- (A) Linhas representam a captação do oxigênio do grupo Controle e Exposto. A seta indica a adição dos eritrócitos (1 mg^{-1} de proteína). PBS (pH 7,4) foi usado como meio de reação num volume final de 1mL. (B) Quantificação da captação máxima de oxigênio durante 10s. Os experimentos realizados em duplicata, mostram média \pm D.P.M. do grupo Controle, $n=19$ vs Exposto, $n=31$. Análise estatística: Teste t de student foi aplicado. **** $p < 0,0001$. EriH (Eritrócitos de Humano).

6.8 Exposição a contaminantes inorgânicos causam mudanças na fragilidade osmótica dos eritrócitos de pescadores da laguna Mundaú

Mudanças na integridade da membrana dos eritrócitos podem ser testada usando meios com diferentes concentrações de NaCl. Em meio isotônico (NaCl 0,9%) os eritrócitos são capazes de manter o processo fisiológico de osmose, não causando alterações capazes de ser detectadas por espectroscopia. Em meio hipotônico, os eritrócitos tendem a alterar a osmolaridade e isso pode levar ao rompimento da membrana eritrocitária. Para investigar essas mudanças na osmolaridade, os eritrócitos de ambos os grupos foram incubados em duas concentrações diferentes de tampão salina para determinar qual concentração causaria mudanças significativas no espectro: NaCl 0,9% (isotônico) e NaCl 0,2% (hipotônico). Após medida durante 5 min, foi determinada a área sob a curva dos traçados. Na **Fig. 6**, percebeu-

se que ao incubar os eritrócitos em meio isotônico (NaCl 0,9% m/v), não foi observado alterações significativas na porcentagem da densidade óptica entre os grupos (Controle: $0,117 \pm 0,094$ vs Exposto: $0,142 \pm 0,142$ Slope, $p=0,658$). Quando os eritrócitos foram incubados no meio hipotônico (NaCl 0,2% m/v), o grupo exposto mostrou uma maior alteração na porcentagem da densidade óptica quando comparado com o grupo controle, caracterizando uma maior fragilidade osmótica nos eritrócitos deste grupo (Controle: $0,354 \pm 0,180$ vs Exposto: $0,899 \pm 0,252$ Slope).

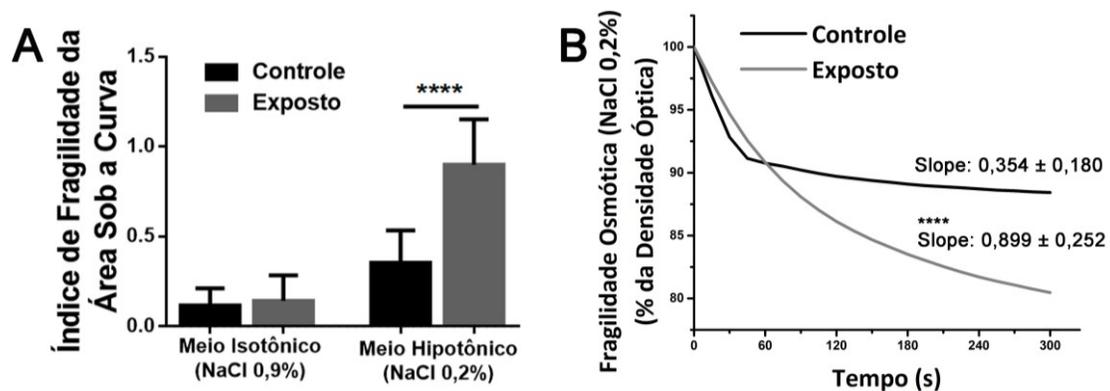


Figura 6: Integridade de membrana de eritrócitos de pescadores apresentam maior fragilidade osmótica em meio hipotônico- (A) As barras representam a quantificação da área sob a curva dos traçados dos eritrócitos incubados em meio isotônico (NaCl a 0,9% m/v) e meio hipotônico (NaCl 0,2% m/v). (B) Linhas representam as mudanças na porcentagem da DO dos eritrócitos do grupo Controle e Exposto durante 5 minutos usando o meio hipotônico. Os experimentos realizados em duplicata, mostram média \pm D.P.M. do grupo Controle, $n=9$ vs Exposto, $n=12$. Análise estatística: Test t de student foi aplicada. **** $p<0,0001$.

6.9 Estudo de correlação entre Hg no sangue e parâmetros de estresse oxidativo no grupo exposto

Após o cálculo dos coeficientes de correlação, a força das correlações (positiva e negativa) foi classificada de acordo com a faixa de valores de r : uma correlação fraca ($r = 0,10 - 0,39$), uma correlação moderada ($r = 0,40 - 0,69$), uma correlação forte ($r = 0,70 - 0,89$) e uma correlação muito forte ($r = 0,90 - 1,00$) (SCHOBER, BOER e SCHWARTE, 2018). A **Tabela 5** descreve a correlação entre o Hg no sangue e os parâmetros de estresse oxidativo avaliados. Nessa avaliação, a relação GSH / GSSG apresentou correlação negativa moderada e significativa com o Hg sanguíneo ($r = -0,62873$), enquanto GST apresentou correlação forte ($r = -0,7364$). Ao avaliar as associações entre os outros parâmetros de estresse oxidativo, encontramos correlações significativas fortes e positivas. O tiol total apresentou correlação com EROs ($r = 0,7909$), GSH foi correlacionado com tiol total ($r = 0,7273$) e GSSG mostrou correlação com EROs ($r = 0,8364$). O sistema antioxidante enzimático apresentou correlação entre GPx e ROS ($r = 0,8182$) e tiol total ($r = 0,7000$). Além disso, GPx apresentou correlação muito forte com GSSG ($r = 0,9545$). Por último, GST foi correlacionado com EROs ($r = 0,7555$) e GSSG ($r = 0,7909$).

Tabela 5 – Correlações de Spearman entre o nível de Hg e os biomarcadores de estresse oxidativo avaliados e atividade de enzimas antioxidantes do grupo exposto. (n = 33-44).

	Hg Sangue	EROs	O ₂ ⁻	Tiol Total	GSH	GSSG	GSH/GSSG	TBARS	Carbonilas	SOD	CAT	GPx	GST
Hg Sangue	1												
EROs	-0,4636	1											
O ₂ ⁻	-0,2091	-0,3727	1										
Tiol Total	-0,5000	0,7909**	-0,2727	1									
GSH	-0,4909	0,6545*	-0,3182	0,7273*	1								
GSSG	-0,4636	0,8364**	-0,2545	0,6818*	0,5273	1							
GSH/GSSG	-0,6273*	0,3455	0,5364	0,3636	0,1818	0,4182	1						
TBARS	0,1091	-0,3364	0,0818	-0,1364	0,0909	0,1455	-0,0091	1					
Carbonilas	-0,2364	0,4364	-0,0818	0,2818	0,5273	0,0909	0,1182	-0,2636	1				
SOD	0,4273	-0,1091	-0,1182	-0,1455	0,0818	-0,1273	-0,3091	-0,1091	-0,5636	1			
CAT	0,1727	-0,2636	0,0818	-0,5364	0,3636	-0,5364	-0,3455	-0,4455	-0,1545	0,6000	1		
GPx	-0,5091	0,8182**	-0,2273	0,7000*	0,4909	0,9545****	0,4636	-0,0182	-0,0182	-0,0182	-0,5455	1	
GST	-0,7364*	0,7455*	-0,1909	0,5273	0,5273	0,7909**	0,5545*	-0,0455	0,3455	-0,4909	-0,2182	0,6818*	1

*Correlação significante quando nível de p < 0,05 (2-tailed), ** Correlação significante quando nível de p <0,005 (2-tailed), **** Correlação significante quando nível de p <0,0001 (2-tailed)

7 DISCUSSÃO

7.1 A presença de espécies químicas com potencial tóxico na laguna Mundaú, distúrbios metabólicos e patologias associadas em pescadores expostos

A toxicidade por contaminantes inorgânicos tem sido amplamente estudada para entender como esses contaminantes, em especial as espécies químicas potencialmente tóxicas, estão envolvidas no desenvolvimento de patologias. Dos mecanismos mais estudados quanto a sua toxicidade, destacamos o estresse oxidativo, que tem sido associado ao acometimento de doenças como hipertensão, diabetes, obesidade, aterosclerose, doenças autoimunes, doenças neurológicas e alguns tipos de câncer (CHEN *et al.*, 2019; MOSCHONAS e TSELEPIS, 2019; NAVANEETHAKRISHNAN, ROSALES e LEE, 2019; VONA *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019). Doenças como hipertensão e diabetes tipo 2 estão presentes em alguns dos pescadores da laguna Mundaú (**Tabela 3**), apesar que nesse estudo, a exposição ambiental da laguna Mundaú não ter afetado os parâmetros hematológicos ou bioquímicos (**Tabela 4**). Tanto no grupo controle como no exposto, esses parâmetros mostraram estar dentro dos limites aceitáveis. Porém, são dados importantes já que distúrbios no metabolismo estão relacionados com estresse oxidativo e patologias associadas. Estresse oxidativo está presente na síndrome metabólica, desordens metabólicas e processos inflamatórios (RANI *et al.*, 2016; CARRIER, 2017; GRANDL e WOLFRUM, 2018). Acreditamos que o estresse oxidativo no grupo exposto possa ser consequência, principalmente da exposição as espécies tóxicas e não de possíveis desordens metabólicas. Ainda assim, a literatura descreve a ligação entre esse tipo de exposição ambiental e distúrbios no metabolismo. Rotter e cols observaram correlação entre metais (que incluem: Pb, Hg e Cd) e a presença de síndrome metabólica em homens (ROTTER *et al.*, 2015). Kasperczyk e cols mostraram a presença de hipertrofia ventricular e redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo em indivíduos expostos cronicamente a Pb. Os autores destacam a possibilidade do Pb em competir com cálcio, prejudicando a síntese de ATP nos cardiomiócitos e perturbando o sistema renina-angiotensina, modificando a homeostase dos eletrólitos e induzindo o estresse oxidativo que pode levar a hipertensão (KASPERCZYK *et al.*, 2005). No Paquistão a presença de As na água consumida pela população tem sido atribuída a casos de Diabetes Mellitus tipo 2 (BAHADAR, MOSTAFALOU e ABDOLLAHI, 2014; IDREES e BATOOL, 2018). Outros estudos apontam a participação do arsênio como indutor de diabetes e hipertensão

(MAHRAM *et al.*, 2013) e o mecanismo por trás do desenvolvimento de diabetes em casos de contaminação por espécies químicas como arsênio e mercúrio parece envolver produção de espécies reativas, alterações na função das células- β pancreáticas, interferência na expressão de genes relacionados com o diabetes, desregulação da gliconeogênese hepática, indução de citocinas inflamatórias como TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α) e IL-6 (Interleucina-6) no tecido adiposo e/ou linfócitos (DIAZ-VILLASENOR *et al.*, 2007; PAL *et al.*, 2013). Outro metal tóxico, o cádmio, foi associado ao crescimento de placa de aterosclerose e acidente vascular encefálico (FAGERBERG *et al.*, 2012; BORNE *et al.*, 2017).

Grande parte da contaminação humana por espécies inorgânicas potencialmente tóxicas ocorre por ingestão de água e alimentos, principalmente peixes e mariscos, provindos desse ambiente contaminado. Dos voluntários participantes do projeto, apenas o grupo exposto relatou ter contato direto com a água da laguna Mundaú por meio do banho e da pesca. Além disso, peixe e sururu são fontes de comida para essa população (**Tabela 3**). Espécies químicas com potencial tóxico podem permanecer em órgãos por longos períodos. Essas espécies inorgânicas podem ser acumuladas nos tecidos de diversos organismos (plantas, peixes, crustáceos) e a depender do nível da cadeia trófica, o potencial tóxico do que é retido no organismo pode ser crescente, trazendo riscos à saúde humana (PASTORELLI *et al.*, 2012; STORELLI e BARONE, 2013; SAULICK *et al.*, 2017; VU *et al.*, 2017), até mesmo em fases pré-natais (DROUILLET-PINARD *et al.*, 2010). A exposição ambiental dos pescadores foi confirmada pela análise de mercúrio total no sangue e urina (**Fig. 1A-B**) mercúrio (SANTOS, 2019). Nesses pescadores, o valor máximo de mercúrio encontrado no sangue foi $48,38 \mu\text{g L}^{-1}$, e de acordo com a OMS, a concentração de mercúrio no sangue pode variar de $5-10 \mu\text{g L}^{-1}$, em indivíduos que não consomem peixes com altos níveis de metil mercúrio. Em populações não expostas, a média da concentração de mercúrio total na urina é $4 \mu\text{g L}^{-1}$ (WHO e IPCS, 1991). Os dados coletados por Santos (2019), mostram que o valor máximo de mercúrio total encontrado na urina dos pescadores foi $10,2 \mu\text{g L}^{-1}$.

Dessa forma, fica claro a relevância de ter investigado as condições ambientais da laguna Mundaú e formas de exposição dos pescadores e moradores que vivem em torno da laguna, para estabelecer um direcionamento acerca da principal fonte de contaminação dessa população e biodiversidade desse ambiente. Não apenas a população das colônias de pescadores pode estar sendo afetada pela contaminação ambiental, mas também a população cuja fonte de alimento (peixes e sururu) também provém da pesca desse complexo estuarino.

Assim, os dados registrados também servem para futuramente estabelecer o link espécies químicas com potencial tóxico – patologias presentes nessa população específica.

7.2 Contaminantes inorgânicos e produção de espécies reativas em células mononucleares do sangue periférico

As espécies reativas são produzidas naturalmente por diversos processos fisiológicos e bioquímicos, participando de diversas sinalizações celulares, bem como detoxificação e respostas imunes. Elas também possuem a capacidade de causar danos celulares e estão envolvidas no desenvolvimento de diversas patologias, como diabetes, doenças cardiovasculares, câncer, doenças degenerativas e também atuam mediando sinalização de vias inflamatórias (HALLIWELL, 2006; SIES, BERNDT e JONES, 2017). Os sistemas biológicos estão continuamente expostos a espécies reativas, seja por produção endógena ou induzidas por fatores externos como radiação UV, poluição e metabolização de xenobióticos (WINTERBOURN, 2008).

Neste trabalho, quantificamos a produção de espécies reativas por células linfomononucleares isoladas do sangue periférico (PBMC) (**Fig.2**) de pescadores que vivem no entorno da laguna Mundaú, que faz parte do CELMM, localizada no município de Maceió-AL. Esses pescadores estão continuamente expostos a espécies tóxicas que foram identificadas na água desta laguna e no sangue (**Tabela 2 e Fig. 1A**) (Santos, 2019). Dessas espécies, tem-se uma atenção especial para Hg, que apresenta alta concentração na água em relação ao que é permitido pelo CONAMA e a OMS, é bioacumulável e pode passar um longo tempo no organismo, causando consequências deletérias e com isso prejudicar a fisiologia celular. A exemplo, o Hg pode atravessar a célula por difusão ou até mesmo via canais proteicos e se ligar principalmente a tióis de resíduos de cisteínas e GSH, bem como tem sido reportado sua bioacumulação em órgãos como cérebro, rins, fígado e em células vermelhas (CLARKSON, VYAS e BALLATORI, 2007). Recentemente, um estudo de interação mostrou que compostos contendo mercúrio em sua estrutura (etil-mercúrio e timerosal) são capazes de se ligar à cisteína presente na albumina. Os autores sugerem que essa interação causa mudanças conformacionais na proteína e isso pode haver um efeito tóxico em sistemas biológicos causado pelo mercúrio (SANTOS *et al.*, 2018).

A evidência do nível de mercúrio total no sangue dos pescadores (**Fig. 1A**) sugere que essa toxicidade pode contribuir para a indução da produção de espécies reativas. Aqui, foi

observado que as PBMCs do grupo exposto produziram quase duas vezes mais espécies reativas do que o grupo controle (**Fig. 2A-B**), que pode afetar a função e causar danos a células imunes. Shenker e colaboradores (1992), mostraram que *in vitro*, a incubação por 24h de baixas concentrações de compostos com mercúrio (0-100 ng e 0-1000 ng), causaram morte de linfócitos e monócitos humanos (SHENKER, BERTHOLD, *et al.*, 1992). Um dos mecanismos mais conhecidos de indução de morte celular é a grande produção de espécies reativas. Células T estão sempre em contato com células fagocíticas, conhecidas por produzirem quantidades grandes de espécies reativas durante o chamado “burst respiratório” (BELIKOV, SCHRAVEN e SIMEONI, 2015) e esse contato pode ser responsável pela ativação das PBMC, levando a um possível estresse oxidativo (ZHANG *et al.*, 1992). Em células imunes, ER, como o H_2O_2 , pode ser gerado via *NADPH oxidase 2* (NOX-2), uma enzima presente na membrana de fagócitos e linfócitos. Essa produção de H_2O_2 pode tanto oxidar o GSH presente nos linfócitos quanto sinalizar para a produção de ânion radical superóxido mitocondrial e expressão de proteínas pró-apoptóticas que sinalizam para morte celular (JACKSON *et al.*, 2004; BELIKOV, SCHRAVEN e SIMEONI, 2015).

Espécies químicas com potencial tóxico podem causar diversos efeitos celulares. Em monócitos, já foi registrado injúrias que afetam sua função através de um mecanismo que parece ser dependente de danos em membrana mitocondrial, causados por estresse oxidativo, levando a morte celular por apoptose (INSUG *et al.*, 1997). Produção de espécies reativas e alterações no potencial elétrico de membrana mitocondrial foram encontrados em linfócitos e monócitos expostos a concentrações diferentes de cádmio (ALKHARASHI *et al.*, 2017). Nesse estudo, ao testar a participação mitocondrial de espécie reativa de oxigênio (ânion radical superóxido), percebemos que essa via parece não contribuir significativamente para o aumento da produção de espécies reativas nas PBMCs. Por outro lado, estas células do sistema imune, quando superestimuladas, podem resultar na liberação de citocinas pró-inflamatórias, capazes de gerar um quadro de inflamação crônica, desenvolvimento de câncer, hipersensibilidade, doenças alérgicas e autoimunes dentre outros (SILVA *et al.*, 2004; LEHMANN, SACK e LEHMANN, 2011; GAWDA *et al.*, 2017). Em um estudo com linhagem celular de linfócitos humanos Jurkat, descreve a relação da geração de espécies reativas na presença de Hg, com interferência em sinalização de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases – Proteínas quinases ativadas por mitógenos), uma via importante para sinalização, diferenciação e proliferação celular (HAASE *et al.*, 2011). Outros estudos já reportaram efeitos genotóxicos de espécies tóxicas em linfócitos de humanos (BETTI, DAVINI e BARALE, 1992; OGURA,

TAKEUCHI e MORIMOTO, 1996), em animais (GROVER *et al.*, 2001) e cultura de células linfoblastóides (LIU *et al.*, 2018). Em estudo com exposição de cultura de células humana de PBMC à cádmio, mostrou-se a importância do composto antioxidante limoneno na citoproteção contra genotoxicidade, por diminuição de danos oxidativo como peroxidação lipídica e oxidação de DNA, melhorando ainda a atividade da SOD e CAT (VERMA *et al.*, 2019).

Alguns estudos associam o envolvimento de fagócitos mononucleares (FM), na citoproteção, por meio de um mecanismo via heme oxigenase-1 (HO-1), uma enzima induzível que em associação com nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) citocromo P450 redutase, catalisa a clivagem oxidativa do heme (pró-oxidante) à biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro ferroso livre (SCHIPPER *et al.*, 2009; HULL, AGARWAL e GEORGE, 2014). Isso é interessante porque em situações em que há dano celular, como em casos de estresse oxidativo, pode ocorrer hemólise dos eritrócitos e com isso a liberação de hemoglobina (Hb). A remoção eficiente da Hb livre é fundamental para a manutenção da saúde celular, já que o ferro presente no heme da Hb possui propriedades oxidativa e tóxicas (KRISTIANSEN *et al.*, 2001; GREER, 2014). Nesses pescadores expostos encontramos uma situação característica de estresse oxidativo nos eritrócitos e possivelmente a ocorrência de dano celular pode sinalizar para uma maior ativação das células mononucleares. Como resposta ao dano celular, mediadores químicos são liberados, como as citocinas e quimiocinas, gerando ativação de células inflamatórias residentes para o sítio de inflamação e atraindo com isso os FM (HULL, AGARWAL e GEORGE, 2014).

Células imunes estão presentes na circulação, como também em órgãos, que inclui cérebro, rim, fígado, pulmões, pele e coração e juntamente a isso, pode ocorrer migração dos FM em sítios de inflamação nesses órgãos, existindo assim uma possibilidade da maior incidência de estresse oxidativo nessas células, bem como uma sinalização induzida por liberação do conteúdo eritrocitário causando mais resposta inflamatória. Esses achados em relação a maior produção de ERs em PBMC de pescadores sugere uma forte correlação entre a presença de Cl, dano celular e uma possível sinalização de resposta inflamatória gerada por ERs.

7.3 Modulação do status redox em eritrócitos

Continuando a investigar os indícios de estresse oxidativo nos pescadores expostos a espécies químicas com potencial tóxico, procuramos entender como essa exposição afetava

o status redox dos eritrócitos. O funcionamento dos eritrócitos tem sido amplamente estudado para tentar explicar diversos processos fisiopatológicos relacionados principalmente com a função que a hemoglobina (Hb) desempenha no organismo. A hemácia, tem grande importância pelo fato de que, nos mamíferos, a hemoglobina presente em tal célula participa do transporte de oxigênio (O₂) dos pulmões para todos os tecidos, agindo também em interação com gás carbônico (CO₂), monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO) que desempenham papéis biológicos fundamentais (SCHECHTER, 2008). Uma diversidade de processos oxidativos podem ocorrer *in vivo* no qual as espécies reativas podem ser geradas e como consequência podem reagir com a Hb por meio desses processos, direcionar para o recrutamento de células inflamatórias no local de injúria e levando a um potencial dano e até mesmo hemólise celular, no caso dos eritrócitos (MONCADA, 1997; ALAYASH, PATEL e CASHON, 2001).

Parte da manutenção do status redox de uma célula provém da capacidade de detoxificar as espécies reativas por meio de agentes antioxidantes. Um dos principais antioxidantes não-enzimáticos são os grupos tióis presentes nas células, que possuem grande potencial redox e com isso são eficientes quanto a prevenção de danos oxidativos causados por espécies reativas de natureza radicalar ou não (MURPHY, 2012). Já está bem estabelecido na literatura a participação das espécies químicas na indução de lesão celular e redução das defesas antioxidantes e essas espécies químicas com potencial tóxico, estão continuamente presentes no ambiente, provindos de fontes naturais ou antropogênicas (WU *et al.*, 2016; LEUNG *et al.*, 2019).

Nesse estudo, vimos que o grupo exposto apresenta uma alta peroxidação lipídica (**Fig. 3A**). Kasperczyk e colaboradores ao investigar a presença de chumbo em trabalhadores, perceberam que diferentes níveis de exposição estavam relacionados com danos oxidativo. Os autores mostraram peroxidação lipídica elevada, proteínas carboniladas e também diminuição da viscosidade plasmática associada a oxidação de proteínas pelo Pb presente (KASPERCZYK *et al.*, 2015). Ainda investigado a influência do Pb na indução de estresse oxidativo, foi demonstrado a importância do β-caroteno em trabalhadores, como antioxidante, reduzindo os efeitos deletérios do estresse oxidativo, como o conteúdo de TBARS e homocisteína (Hcys) (KASPERCZYK *et al.*, 2014).

Sob condições de estresse oxidativo, as proteínas também são oxidadas, podem ser gerados peróxidos proteicos ou ainda resultar na oxidação de seus grupos sulfidrila. Também é conhecido que processos de hidroxilação e nitratação podem resultar em proteínas

carboniladas, indicando dano proteico nas células (PONCZEK e WACHOWICZ, 2005). Um dos metais tóxicos mais relacionados com danos celulares por estresse oxidativo é o chumbo. Chumbo, além do mercúrio, tem a capacidade de oxidar –SH, principalmente do GSH, inativar enzimas que possuem tióis como grupo funcional, bem como pode promover a formação de Hcys e ácido aminolevulínico (ALA) que atuam como agentes potencialmente tóxicos (FLORA, GUPTA e TIWARI, 2012; KASPERCZYK, PROKOPOWICZ, *et al.*, 2012). Kasperczyk e colaboradores demonstraram que a presença de Pb em trabalhadores está relacionado com geração de proteínas carboniladas e Hcy e que o tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína parece atenuar os efeitos causados pela contaminação por chumbo, num efeito dose-dependente. Os autores ainda discutem que a geração de Hcy em quantidades excessivas está relacionada com aterosclerose e aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, bem como doença vascular periférica (KASPERCZYK *et al.*, 2016). Os nossos dados mostraram que os eritrócitos dos pescadores expostos, cujo Hg foi detectado em maior concentração do que no grupo controle, apresentam elevada oxidação de proteínas (conteúdo de carbonilas, **Fig. 3B**), sugerindo mais um indício de estresse oxidativo nessa população. Esse dado se torna também importante nesse estudo com a população de pescadores de Maceió, porque as proteínas desempenham diversas funções celulares e uma das consequências do estresse oxidativo é justamente a diminuição da atividade e/ou função de proteínas, pela sua oxidação. Uma das consequências da diminuição de proteínas, é a alteração da viscosidade no plasma, que pode ser medida pelo teor de proteínas plasmáticas. A viscosidade do plasma é dependente da concentração de macromoléculas, principalmente de proteínas. Essa alteração na viscosidade parece ser um efeito do estresse oxidativo, que pode ser induzido por produtos da peroxidação lipídica, causando um dano oxidativo em proteínas plasmáticas (DIKMENOGU *et al.*, 2006).

Como foi mostrado na **Fig. 3C**, o grupo exposto apresentou uma redução significativa do conteúdo de tiol total de eritrócitos, indicando que a participação desses grupos –SH na defesa antioxidante provavelmente sofre influência da presença de metais nessas células sanguíneas, provocando sua oxidação. Das espécies químicas tóxicas que podem fortemente estar envolvido na redução de tiol total nos pescadores, destaca-se o Hg pela sua alta afinidade por grupos –SH. O mercúrio pode existir em suas formas orgânicas (metil, etil e fenil), cujos derivados podem ser gerados por biometilação em sedimentos de ambientes aquáticos ou solos, ou na forma inorgânicas (H^+ e H^{2+}) que são gerados a partir da oxidação do mercúrio elemental (H^0) (RISHER *et al.*, 1999; VAS e MONESTIER, 2008). Existem poucos dados na

literatura que reportam danos celulares relacionados com contaminantes inorgânicos no Brasil. Grotto e colaboradores (GROTTO *et al.*, 2010), num estudo realizado na Amazônia, relataram uma correlação negativa entre concentrações de Hg e redução de tióis, sugerindo que a diminuição desses tióis se deve a uma possível oxidação dos grupos sulfidril induzida por Hg. Mercúrio tem sido reportado como agente causador de danos oxidativos (CLARKSON e MAGOS, 2006), e em populações ribeirinhas que vivem da agricultura e por ventura consomem quantidades significativas de peixes, esse elemento também tem sido apontado como causador da redução de tiol em eritrócitos (PINHEIRO *et al.*, 2008).

Dos tióis não-proteicos, merece destaque o GSH que participa de formas diferentes no mecanismo antioxidante nas células. Esse tripeptídeo sozinho, sem estar associado a uma enzima, é capaz de se ligar a espécies reativas e neutralizar seus efeitos danosos ou estabilizar radicais livres impedindo que estes oxidem biomoléculas (FORMAN, ZHANG e RINNA, 2009). O conteúdo de tiol total reduzido no grupo exposto corrobora com o resultado encontrado do conteúdo de GSH (**Fig. 3D**). Nesses pescadores a redução do conteúdo de GSH refletiu negativamente no estado redox (razão GSH/GSSG) celular dos eritrócitos (**Fig. 3F**). Não vimos alterações significativas no conteúdo de GSSG (**Fig. 3E**). É interessante para a célula, que esse estado redox seja a favor das concentrações de GSH, para que a defesa antioxidante seja eficiente e evite possíveis danos celulares. Esses achados parecem serem comuns em situações que envolvem ambiente contaminado por CI e estudos tem mostrado que a presença de contaminantes inorgânicos é refletida em danos oxidativos. Por exemplo, um estudo com crianças da região central no Rio Grande do Sul, Brasil, mostrou a associação da presença de metais tóxicos como chumbo, níquel e alumínio e peroxidação lipídica (DO NASCIMENTO *et al.*, 2014). Um estudo *in vitro* verificou que a incubação de eritrócitos humanos com mercúrio foi capaz de causar peroxidação lipídica e oxidação de proteína e também redução do conteúdo de GSH (HARISA *et al.*, 2012). Em Taiwan, a redução da capacidade antioxidante foi associada com a presença de arsênio no sangue (WU *et al.*, 2001).

Rabenstein e colaboradores (RABENSTEIN, ISAB e REID, 1982) descreveram que MeHg tem sua porção complexada com GSH e outra com a hemoglobina de eritrócitos intactos. Quando avaliada essa interação em eritrócitos hemolizados, verificou-se que a ligação é mais forte entre o MeHg com o GSH do que com os grupos sulfidrilas presentes na hemoglobina. Vale salientar, que em casos de hemólise, o conteúdo eritrocitário é liberado e conseqüentemente grandes quantidades de ferro ficam livres. Uma das reações mais comuns que induzem a formação de espécies reativas é a de Fenton, catalisada na presença de ferro

(HAREL e KANNER, 1988). Usando um quelante de Fe^{3+} (deferroxamina), LeBel e colaboradores mostraram que a formação de ERs induzida por MeHg, em cérebro de ratos, é atenuada (LEBEL, ALI e BONDY, 1992), fortalecendo o papel do ferro na geração de estresse oxidativo. Em associação a isso está a geração de peroxidação lipídica, oxidação de DNA e de proteínas (HOGG *et al.*, 1994; JOMOVA e VALKO, 2011), fatores induzidos também por ERs via presença de espécies químicas tóxicas (ERCAL, GURER-ORHAN e AYKIN-BURNS, 2001).

Uma das formas de se detectar marcadores de danos oxidativo é através da análise de metabólitos na urina. A urina pode ser considerada um dos melhores meios de se detectar a presença de metais por ser sua maior via de excreção e as concentrações de metais tóxicos e metaloides na urina podem ser uma forma de detectar a exposição a curto e longo prazo (CRINNION, 2010; SMOLDERS *et al.*, 2014). Um estudo em uma população residente de Kumasi, Gana, mostrou a presença de biomarcadores de estresse oxidativo como peroxidação lipídica (conteúdo de TBARS) e oxidação de DNA (8-hidroxi-2-desoxiguanosina, 8-OHdG) na urina. Esse estudo correlacionou esses efeitos com a presença de vários metais, dentre eles, Cd, As, Pb, Cr, que a depender da localização da população, se encontraram em níveis elevados. Esse estudo encontrou também uma correlação entre os As e patologias respiratórias como asma e taquicardia (BORTEY-SAM *et al.*, 2018). Huang e colaboradores também associaram a presença de metais na urina com casos de asma (HUANG *et al.*, 2016). Asma é uma patologia característica de inflamação crônica nos pulmões e sua incidência tem sido associada principalmente a exposição aos agentes ambiental e industrial. Como a humanidade vem se expondo ao processo de urbanização e industrialização, a exposição à espécies químicas com potencial tóxico pode ocorrer pela presença de metais no ar, na água, comida e descartes domésticos e alguns metais ao se alojar em órgãos, podem provocar inflamação crônica e estresse oxidativo, que são possíveis percussores da patogênese da asma (SEATON, GODDEN e BROWN, 1994; HUANG *et al.*, 2015; WHO, 2017).

Chen e colaboradores também encontraram uma correlação entre a concentração de Hg no soro e urina de trabalhadores de Wanshan com danos oxidativo em DNA (conteúdo de 8-OHdG), relatando ainda que esses trabalhadores descreveram sintomas de intoxicação por mercúrio, como disfunção digestiva, dificuldades de dormir e tremores (CHEN *et al.*, 2005). É importante enfatizar que em situações patológicas em que indivíduos apresentam hipertensão, aterosclerose, obesidade e diabetes, geralmente está associado ao estresse oxidativo (CARRIER, 2017; SPAHIS, BORYS e LEVY, 2017; BATTELLI *et al.*, 2019). Em pacientes

diabéticos, a liberação de ferro e formação de metahemoglobina (MetHb) parece estar relacionada com a presença de F2-isoprostano no plasma, um marcador de peroxidação lipídica causada por estresse oxidativo (LEONCINI *et al.*, 2008). Espinosa e colaboradores investigaram por cromatografia, a presença de 8-OHdG na urina de pessoas hipertensas, mostrando assim que este marcador de estresse oxidativo generalizado se encontra elevado. Além disso, mostrou aumento deste marcador em DNA nuclear e mitocondrial PBMC, bem como reduzido estado redox (ESPINOSA *et al.*, 2007). Outros metais como bário (Ba), cádmium (ABUGO *et al.*), cromium (Cr), molibdênio (Mo), vanádio (V) e zinco (Zn), presentes na urina e que estão em níveis elevados também parece participar da indução de estresse oxidativo (DOMINGO-RELLOSO *et al.*, 2019).

Esses achados corroboram com os dados desse trabalho em relação a indicadores de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas nos pescadores da laguna Mundaú. Um elevado conteúdo de TBARS e carbonilas foram registrados nesses eritrócitos, em relação ao grupo controle. Em conjunto, os dados obtidos mostram uma associação entre a redução de tiól total e da capacidade redox desses eritrócitos com danos celulares associados ao estresse oxidativo.

7.4 Exposição ambiental, sistema antioxidante enzimático e detoxificação de xenobióticos

Para melhor compreensão de como se desenvolve uma situação de estresse oxidativo em uma determinada circunstância, é preciso avaliar além dos biomarcadores de estresse oxidativo, como se comporta o sistema antioxidante enzimático, que inclui principalmente as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Avaliando a atividade da SOD (**Fig. 4A**), que especificamente dismuta o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), nota-se que os pescadores expostos possuem uma deficiência na atividade catalítica dessa enzima. Em eritrócitos, a geração do $O_2^{\bullet-}$ pode ser gerada a partir da auto-oxidação da hemoglobina oxigenada (HbO_2), cujo grupamento heme possui Fe^{2+} que faz ligação com o oxigênio. Nesse processo, o Fe^{2+} da Hb é oxidado a $Fe^{3+} + O_2^{\bullet-}$. A partir da geração do $O_2^{\bullet-}$ uma subsequente cascata de reações é gerada para detoxificar as espécies reativas que são formadas (RIFKIND *et al.*, 2003). Um estudo com trabalhadores de uma fábrica de baterias em Maharashtra, na Índia, cuja elevada concentração de Pb foi detectada,

mostrou que em eritrócitos, a atividade da SOD estava diminuída, assim como também estava diminuída a atividade da enzima CAT, com aumento de peroxidação lipídica (PATIL *et al.*, 2006). Efeitos semelhantes foram encontrados em trabalhadores expostos a Hg, onde a atividade da SOD e da GPx estavam reduzidas no grupo exposto ao Hg em comparação com o grupo controle (BULAT *et al.*, 1998). A produção de ERs como $O_2^{\bullet-}$ nos eritrócitos também parece ser induzida pela presença de pequenas concentrações de cloreto de mercúrio, gerando oxidação da Hb (AHMAD e MAHMOOD, 2019). Já na incubação com diferentes concentrações de meta-arseniato de sódio, os eritrócitos mostraram redução da atividade da SOD e CAT (MAHESHWARI, KHAN e MAHMOOD, 2017). Em relação aos experimentos realizados nesse presente trabalho com os pescadores da laguna Mundaú, não encontramos diferença significativa na atividade da CAT (**Fig. 4B**). Assim como outras enzimas, a catalase é considerada uma metaloenzima, dependente de um cofator metálico para realizar com eficiência sua atividade antioxidante. O estresse oxidativo também é dependente de uma menor atividade do sistema antioxidante enzimático, que provavelmente ocorre porque as espécies químicas tóxicas também possuem afinidade pelos metais presentes nas metaloenzimas. Em eritrócitos, a literatura tem descrito que o estresse oxidativo pode ser direcionado quando há oxidação da hemoglobina, ou do ferro livre presente no citosol (DOBRAKOWSKI *et al.*, 2016; MAHESHWARI, KHAN e MAHMOOD, 2017; AHMAD e MAHMOOD, 2019). Os eritrócitos possuem grande capacidade antioxidante, porém também são susceptíveis a danos oxidativo por estarem expostos a geração endógena de ERs, via auto-oxidação da Hb, e exógena, por geração de H_2O_2 e óxido nítrico (NO^{\bullet}) do plasma (NIKOLIĆ-KOKIĆ, BLAGOJEVIĆ e SPASIĆ, 2010). Se tratando de capacidade antioxidante dependente de metais, SOD1 é uma enzima dependente de Cu/Zn, dessa forma metais, como Pb e Cd, podem competir pelos sítios de ligação na enzima, ou ainda formar complexos, inibindo assim a atividade da SOD (FLORA *et al.*, 1982; MARTELLI *et al.*, 2006). A ligação do zinco na SOD1 e 3, presentes no citosol, não é essencial para dismutação do $O_2^{\bullet-}$, no entanto, confere grande estabilidade termal para as proteínas (GARZA-LOMBO *et al.*, 2018). Em contrapartida alguns estudos perceberam que em resposta a exposição ao chumbo, a SOD pode ter sua atividade aumentada (KASPERCZYK, MACHNIK, *et al.*, 2012; DOBRAKOWSKI *et al.*, 2017). Corroborando com nossos resultados quanto a exposição dos pescadores à espécies tóxicas, Dobrakowski e colaboradores não encontraram diferença da atividade da CAT em trabalhadores expostos a Pb (DOBRAKOWSKI *et al.*, 2017).

Quando o $O_2^{\bullet-}$ é gerado nas células e o H_2O_2 é formado via atividade da SOD, as enzimas CAT e GPx entram em ação para detoxificar essa espécie reativa e transformar em $H_2O + O_2$ (SALVI *et al.*, 2007; VERCESI *et al.*, 2018). A CAT no grupo exposto não se mostrou com atividade alterada em relação ao grupo controle e provavelmente isso influencia na geração de dano celular nesses eritrócitos, já que o H_2O_2 pode estar sendo formado e não sendo decomposto adequadamente. Cohen e Hochstein descreveram que em eritrócitos, GPx tende a desempenhar um papel mais importante do que a CAT quando se trata de decompor o peróxido de hidrogênio formado nessas células (COHEN e HOCHSTEIN, 1963). A GPx tem uma função importante na proteção dos eritrócitos quanto a prevenção da oxidação da hemoglobina pelo H_2O_2 (MILLS, 1957) e uma atividade elevada dessa enzima antioxidante pode preservar a função dessa proteína. Assim como a atividade da SOD está diminuída nos eritrócitos do grupo exposto, a GPx (**Fig. 4C**) apresentou o mesmo efeito. Isso nos dá suporte para acreditar que uma possível diminuição da atividade desse sistema antioxidante enzimático pode ser devido a presença de espécies tóxicas, como o Hg no sangue desses pescadores, já que espécies químicas com potencial tóxico tem a capacidade de competir e até mesmo complexar com metais importantes em metaloenzimas.

Se tratando de exposição a contaminantes inorgânicos e suas interações em sistemas biológicos, a literatura tem reportado uma grande afinidade pelo GSH, como na interação de espécies inorgânicas como o As(III) (LESLIE, HAIMEUR e WAALKES, 2004), Hg (FARINA *et al.*, 2013) e Cd (WANG e DU, 2013). O GSH está presente em reações catalisadas pela glutathione peroxidase e glutathione S-transferase, decompondo peróxido de hidrogênio e conjugando xenobióticos, respectivamente (PABST, HABIG e JAKOBY, 1974; BRIGELIUS-FLOHE e MAIORINO, 2013). O potencial redox do GSH (-240 mV) pode explicar sua grande capacidade antioxidante dentro da célula e possivelmente isso torna a ação das enzimas GSH-dependentes mais eficiente (SCHAFER e BUETTNER, 2001; FLOHE, 2013). Em concordância com os resultados obtidos em nosso estudo (**Fig. 4D**), Dobrakowski e colaboradores registraram menor atividade da GST em eritrócitos de trabalhadores com exposição subaguda ao Pb acompanhada de redução do conteúdo de GSH (DOBRAKOWSKI *et al.*, 2016). Essa redução da atividade da GST nos pescadores, pode ser reflexo da redução do conteúdo de GSH livre, uma vez que esse tiol não proteico participa da formação do complexo GSH-xenobiótico na reação catalisada pela GST, bem como o GSH necessário para reação catalítica da GST esteja reagindo com as espécies reativas que podem estar sendo produzidas pelos eritrócitos. Outra possibilidade, seria que neste grupo exposto a expressão da GST

possa estar diminuída. Nesse ponto de vista, se torna interessante que o sistema antioxidante seja favorável para tentar atenuar os possíveis efeitos negativos causados pela presença de espécies químicas potencialmente tóxicas.

Alguns estudos *in vitro* mostram, por exemplo, como compostos fenólicos cuja estrutura apresenta grupos –SH, são importantes na redução da produção de ERs e na conservação do GSH celular na presença de Hg (OFFICIOSO *et al.*, 2018). Não apenas a atividade da GST pode estar prejudicada quando o conteúdo intracelular de GSH está depletado, mas como citado anteriormente, a GPx que depende desse tiol para sua reação, pode ter sua atividade modulada negativamente. É o que mostra a **Fig. 4** em relação ao sistema antioxidante enzimático GSH-dependente. Porém, um dos mecanismos mais conhecidos de possível inibição ou redução de atividade enzimática da GPx em função da exposição a espécies químicas com potencial tóxico, é a interação do Hg com esta selenoproteína. Selênio é um micronutriente que nessas selenoenzimas existe a forma de selenol, cuja afinidade é semelhante à dos –SH na complexação com metais (CUVIN-ARALAR e FURNESS, 1991; HOLBEN e SMITH, 1999; LU e HOLMGREN, 2009; ANTUNES DOS SANTOS *et al.*, 2018) e o Hg pode competir pelo selênio e causar disfunção nessa enzima.

Os efeitos da contaminação por espécies químicas com potencial tóxico são diversos. Em revisão, Branco e colaboradores descrevem uma gama de efeitos da toxicidade por mercúrio. Os autores destacam desde a contaminação por ingestão de alimentos contaminados como peixes e contaminação via o binômio mãe-feto, bioacumulação em órgãos, prejuízo em sistema antioxidante enzimático e não enzimático, indução da produção de espécies reativas e também patologias associadas a intoxicação (BRANCO *et al.*, 2017). Na Amazônia, Brasil, uma correlação negativa da concentração de MeHg no plasma com atividade da GPx foi relatada na população que consome peixe provenientes da região (CARNEIRO, GROTO e BARBOSA, 2014).

Os estudos com animais e *in vitro* também são amplamente explorados para tentar entender os possíveis efeitos que os metais tóxicos podem causar o organismo, buscando entender como isso pode afetar a saúde. Em ratos, a administração de cloreto de metil mercúrio afeta o relaxamento da aorta por gerar óxido nítrico e conseqüentemente espécies reativas de nitrogênio (OMANWAR *et al.*, 2013). Danos em estruturas renais também foram reportados, a partir de biópsia, em casos de contaminação por Hg (MILLER *et al.*, 2013). Um modelo de intoxicação por acetato de chumbo (30, 60 e 90 dias de administração) com frangos

mostrou danos cardíacos, produção de NO^{*} e expressão elevada da enzima óxido nítrico sintase induzível (HUANG *et al.*, 2019).

Dos modelos animais mais utilizados como indicadores de toxicidade por metais, destaca-se os peixes. Esses animais estão constantemente expostos ao ambiente aquático, bem como ao sedimento desse ambiente e a presença de metais tóxicos na água pode refletir na bioacumulação nesses animais, que por ventura são consumidos pela população humana e dessa forma os peixes funcionam como um veículo para contaminação humana por metais potencialmente tóxicos (BOSCH *et al.*, 2016; KVESTAD *et al.*, 2018). Na Amazônia, Hg está presente no Rio Negro e conseqüentemente nos organismos aquáticos presentes (MARSHALL *et al.*, 2016). Em amostras de sardinha e corvina, adquiridas no comércio atacadista da Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo, As e Cr estão em níveis acima dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira e outros metais como Hg, Pb e Cd também foram detectados (MORGANO, 2011). Na Índia, peixes do rio Kali expostos a Ni, Cr, Pb e Cd, apresentaram sinais de danos causados por estresse oxidativo e desregulação da atividade de enzimas antioxidantes em diferentes órgãos, além de estruturas anatômicas danificadas que foram analisadas por histologia. Esses peixes do rio Kali são comercializados e consumidos pela população Indiana e os autores sugerem que esta população se encontra em situação de vulnerabilidade devido a probabilidade de bioacumulação desses metais no organismo (FATIMA *et al.*, 2015). Outros estudos também associam danos oxidativo em peixes causados por metais tóxicos, dano em DNA e alterações histopatológicas (JAVED *et al.*, 2016) e estresse oxidativo associado a alterações em parâmetros bioquímicos, principalmente do perfil lipídico (JAVED *et al.*, 2017).

As espécies químicas com potencial tóxico, a depender de sua concentração no organismo e da capacidade que o organismo tem de excretá-los, podem apresentar riscos à saúde. Os efeitos descritos na literatura ocasionados pela intoxicação por esses contaminantes vão desde problemas cardiovasculares, casos de asma, bronquite, dermatite (JOMOVA e VALKO, 2011; SOLENKOVA *et al.*, 2014) e podendo até mesmo apresentar potencial mutagênico (BEYERSMANN e HARTWIG, 2008). Para que seja possível identificar os problemas causados por espécies químicas tóxicas é preciso acessar amostras biológicas para sua detecção, podendo os metais serem detectados a partir de diferentes matrizes biológicas. Em Sialkot, uma cidade do Paquistão, foi detectado em trabalhadores de fábricas de couro, níveis elevados de Cr no sangue e urina, bem como Pb também foi quantificado no sangue; Cr, Cd, Pb, Fe, foram encontrados em maiores concentrações na saliva desses

trabalhadores. Esse estudo também correlacionou riscos de saúde com a exposição desses metais nesses trabalhadores e também correlacionou com a concentração de SOD no sangue (JUNAID *et al.*, 2017). Um estudo de coorte sugere a participação do Pb no aumento de pressão arterial e risco de hipertensão. Os autores sugerem que concentrações pequenas de Pb (20-30 µg/L) no sangue podem ser responsáveis por esse efeito (GAMBELUNGHE *et al.*, 2016). Também foi relacionado em um estudo transversal (cross-sectional) a presença de Pb, Cd e Hg com doença arterial coronariana e uma exposição a longo tempo de traços desses metais parece estar atrelado a alterações no perfil lipídico associado a formação de placas de aterosclerose (ASGARY *et al.*, 2017). Um estudo importante sobre contaminação por Cd sugere a ligação entre esse metal e o desenvolvimento de obesidade na juventude. Os autores reportaram a presença de Cd em mães na fase pré-natal e monitoraram seus filhos durante 5 anos, sugerindo uma correlação entre Cd e aumento de peso nas crianças. Esse mesmo estudo também mostrou aumento de adiposidade em peixe-zebra (*Danio rerio*) expostos a Cd (GREEN *et al.*, 2018).

Em nosso grupo experimental (exposto), identificamos no sangue e urina altas concentrações de Hg em relação ao grupo controle (**Fig. 1**) (Santos, M.C., 2019; dados não publicados). Acreditamos que essa exposição crônica a um ambiente contaminado por essas espécies químicas tóxicas, esteja contribuindo fortemente para levar a um quadro de estresse oxidativo nesses pescadores da laguna Mundaú. Vale salientar o grande comércio de sururu que o CELMM proporciona. Esse bivalve também serve como alimento para a população e serve como um meio de biomonitoramento do que ocorre no ambiente. O sururu é um molusco que se alimenta do que está em suspensão no meio aquático e isso faz dele um potencial acumulador de poluentes, o que o torna uma fonte de contaminação humana (MAIOLI *et al.*, 2010). Em 2012, um estudo fez um levantamento das concentrações de Hg no sururu, que é proveniente da laguna Mundaú, em diferentes épocas do ano de 2006 a 2018 e verificou que essa concentração de Hg chegava a mais de 300 µg/kg⁻¹ dependendo do tamanho e da época em que foi coletado o bivalve (HIGINO *et al.*, 2012).

E preciso investigar se a presença de espécies químicas com potencial tóxico nessa laguna provém apenas da falta de saneamento e cuidados com os resíduos domésticos e/ou industriais que possam estar sendo descartados em torno da laguna, do consumo de alimentos provindo do CELMM ou se essa exposição é uma condição natural desse ambiente aquático. Ainda assim, é preciso ficar atento para a exposição dessa população de pescadores a partir da ingestão desses alimentos (peixe e sururu) que podem estar contaminados com Hg. Essas

investigações permitirão saber qual a fonte direta de contaminação desses pescadores, além do contato com a água contaminada.

7.5 Prejuízo na captação de oxigênio por eritrócitos de pescadores expostos ao ambiente contaminado

Das possíveis consequências do estresse oxidativo em eritrócitos, chama-se a atenção para a perda da capacidade da Hb em carrear o oxigênio que será distribuído nos tecidos oxidativos. Tentando entender qual a ligação entre estresse oxidativo e capacidade funcional dos eritrócitos, incubamos os eritrócitos com PBS (temperatura ambiente, pH 7,4) no oxígrafo, um aparelho sensível as variações de oxigênio do meio. A saturação (fase em que o sinal das variações da $[O_2]$ entra em platô) da Hb presente nos eritrócitos ocorre de forma rápida e isso é possível perceber por uma curva gerada pelo sinal transmitido pelo oxígrafo, na qual uma maior inclinação caracteriza uma maior capacidade de captação do oxigênio pela Hb. No grupo de pescadores expostos a Hg, a redução da captação de O_2 foi notavelmente menor em relação ao grupo controle (**Fig. 5**). Isso levanta hipóteses acerca dos possíveis mecanismos que podem estar por trás desse fenômeno: metais como Hg tem alta afinidade por grupos –SH e por isso podem se ligar à tais grupos presentes nas cisteínas da Hb e com isso alterar a afinidade do heme como o O_2 ; (2) o Fe^{2+} presente no heme da Hb pode estar sendo oxidado a Fe^{3+} pelas espécies reativas geradas e isso reflete numa menor capacidade do O_2 se ligar a Hb.

Baseado nos indícios encontrados pelo presente estudo, é sugerido que o mecanismo da perda da capacidade funcional da Hb em captar o O_2 pode ser devido a oxidação do heme pela ERs. A diminuição de tióis proteicos e não-proteicos (AITS *et al.*) contribui fortemente para a geração do estresse oxidativo, além do que a ligação do Hg com os grupos –SH pode afetar a função de diversas proteínas estruturais e intracelulares (RABENSTEIN e FAIRHURST, 1975; FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2011; FARINA, ROCHA e ASCHNER, 2011). A ligação do oxigênio pela Hb é dependente do estado ferroso do ferro (Fe^{2+}), que em um ambiente oxidante não é muito estável e com isso se oxida a ferro férrico (Fe^{3+}) (SHIKAMA, 1998). Uma vez que o sistema de redução celular se torna ineficiente e espécies reativas são formadas, como o H_2O_2 , essa reação de oxidação do Fe^{2+} é favorecida (ALAYASH, PATEL e CASHON, 2001). Nos pescadores aqui estudados, a não alteração da atividade da CAT juntamente com a baixa atividade da GPx (**Fig. 4**) provavelmente aumenta a tendência da geração de H_2O_2 e

oxidação do heme da Hb, o que faz com que essa proteína tenha sua função de ligar-se ao O₂ comprometida.

Endogenamente, as espécies reativas que são geradas são detoxificadas pelos sistemas antioxidantes, no entanto, espécies reativas, como ânion radical superóxido que rapidamente é dismutado a H₂O₂, são continuamente formadas nos eritrócitos, podendo levar a um processo de auto-oxidação da Hb e a formação de MeHb. Essa MeHb não é capaz de carrear por longo tempo o oxigênio disponível (MOHANTY, NAGABABU e RIFKIND, 2014). Condições de hipóxia pode causar formação de superóxido (RIFKIND, SALGADO e CAO, 2012; RIFKIND e NAGABABU, 2013) e um ambiente com privação celular de oxigênio acaba se tornando um problema de saúde, com geração de estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). *In vitro*, Balagopalakrishna e colaboradores mostraram que a produção de superóxido é dependente da oxihemoglobina, indicando que a formação do superóxido não está associada a hemoglobina oxidada e um ambiente oxigenado é necessário para a produção do radical (BALAGOPALAKRISHNA *et al.*, 1996). Tal quadro é confirmado quando há formação de MeHb, um sinal de que a Hb sofreu oxidação e provavelmente tal modificação é decorrente das espécies reativas.

Recentemente o nosso grupo demonstrou que o timerosal (etil mercúrio) se liga a dois resíduos de cisteínas (Cys93) na hemoglobina (proteína comercial e eritrócitos humanos), levando a uma diminuição na capacidade de captação do oxigênio (DE MAGALHAES SILVA *et al.*, 2020). Com isso também podemos sugerir o papel do mercúrio como uma espécie química capaz de ter afinidade por esses resíduos de cisteínas presentes nas subunidades da hemoglobina, mudando a conformação estrutural dessa proteína e dificultando a ligação do íon Fe(II), presente no anel porfirina da hemoglobina, ao oxigênio nesse grupo exposto.

Uma das consequências da menor capacidade da Hb de carrear oxigênio é a situação de hipóxia gerada nos tecidos periféricos e órgãos internos que realizam reações oxidativas para síntese de ATP e tecidos que dispõem da via glicolítica para obter energia (SUN *et al.*, 2016). Consequentemente, a hipóxia é um dos fatores responsáveis por danos celulares e pela geração de espécies reativas dentro da célula, principalmente via mitocôndrias, já que esta organela depende do oxigênio para manutenção do fluxo de elétrons pela cadeia respiratória e com isso evita formação de EROs, bem como necessita desse fluxo para geração de energia na forma de ATP (FUHRMANN e BRUNE, 2017). Eritrócitos dependem exclusivamente da via glicolítica para obtenção de energia e como não possuem mitocôndrias para produção de ATP através da fosforilação oxidativa, a síntese de energia consiste em

metabolizar o piruvato pela enzima lactato desidrogenase e formar lactato (BREWER, 1974; REISZ *et al.*, 2016).

Além do metabolismo glicolítico dos eritrócitos, o metabolismo oxidativo da via das pentoses fosfatos é de extrema importância para manutenção do estado redox NAD(P)H/NAD(P) dessas células. As concentrações de NAD(P)H/NAD(P) são importantes para prevenir danos oxidativos nos eritrócitos, seja participando como coenzima na reação catalisada pela NAD(P)H methemoglobina redutase, que reduz a MetHb formada em situações de estresse oxidativo ou auxiliando a GR na redução do GSSG para GSH (BREWER, 1974; KUHN *et al.*, 2017), favorecendo assim a capacidade antioxidante celular. Experimentos com incubação de peroxinitrito em eritrócitos revelaram a importância das espécies reativas na oxidação da Hb, direcionamento de vias energéticas e uma sinalização que parece envolver fosforilação de proteínas de membrana (banda 3, um canal iônico que transporta bicarbonato e cloro) e como ela se relaciona com metabolismo glicolítico e oxidativo. Os autores destacam que quando os eritrócitos estão na presença de peroxinitrito, há maior formação de MetHb e conseqüentemente maior expressão da banda 3 fosforilada, promovendo com isso uma sinalização que também reduz a expressão da enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), que promove a síntese de NADPH (METERE *et al.*, 2009).

Nesse contexto, é nítida a relevância da preservação das características da hemoglobina, como uma proteína fundamental, não só por sua função primordial em transportar oxigênio, via ligação desse com o heme presente nesta proteína, bem como sua conservação é importante, já que uma vez oxidada, pode desencadear uma sinalização intracelular que dirige para um possível distúrbio no metabolismo dos carboidratos, na via das pentoses e prejuízo no estado redox NAD(P)H/NAD(P) celular.

7.6 Efeito da exposição de pescadores ao ambiente contaminado na integridade da membrana dos eritrócitos

Tendo em vista todos os efeitos encontrados nas células sanguíneas dos pescadores quanto ao estresse oxidativo, realizamos como parte do nosso estudo um ensaio característico de inchamento dos eritrócitos. A intenção deste ensaio foi testar a integridade de membrana dessas células, caracterizado pela capacidade dos eritrócitos em responder as diferenças osmóticas do meio contendo NaCl. Isso é importante porque uma fragilidade osmótica pode ser resultado de mudanças estruturais e geométricas das hemácias que pode gerar hemólise

(MAIWORM, 2008). Aqui, foi identificado que os eritrócitos incubados em meio contendo NaCl 0,2% apresentou maior fragilidade osmótica comparado como grupo controle (**Fig. 6**). Mudanças na densidade óptica ocorrem quando os eritrócitos são incubados em meio hipotônico, cujas concentrações de NaCl são menores que 0,9%. Hemólise dos eritrócitos pode ocorrer porque perturbações no citoesqueleto e na estrutura das células vermelhas podem ser resultantes de danos na membrana celular (CRUZ SILVA, 2000). De acordo com nossos dados relacionados aos biomarcadores de estresse oxidativo, o inchamento identificado nos eritrócitos dos pescadores pode ter natureza decorrente da peroxidação lipídica e oxidação das proteínas já relatadas no presente estudo. Em ratos, Cheng e cols. mostraram a influência do alumínio(III) na indução de deformidade a fragilidade osmótica dos eritrócitos (CHENG *et al.*, 2018). Em exposição ao Cd, experimentos com ratos demonstraram aumento em biomarcadores de estresse oxidativo (peroxidação lipídica e NO^{\cdot}), redução de GSH e atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GR, GST) e G-6-PDH, maior fragilidade osmótica e deformidade dos eritrócitos e parece ter efeitos na diminuição dos níveis da bomba de Na^+/K^+ -ATPase e aumento de ferro, cálcio e peróxido de hidrogênio (NAZIMA, MANOHARAN e MILTONPRABU, 2016). Efeitos semelhantes foram encontrados em incubação de eritrócitos humanos com chumbo. Os autores mostraram peroxidação lipídica, hemólise, redução de estado redox (GSH/GSSG) e redução da atividade da Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase, aumento do influxo de cálcio e alteração na morfologia dos eritrócitos (QUINTANAR-ESCORZA *et al.*, 2010).

Fragilidade osmótica eritrocitária tem sido descrito em casos de patologias. Esse quadro tem sido visto em pacientes em diferentes estágios de doença renal crônica (PANDA *et al.*, 2017), em indivíduos com esferocitose hereditária (uma patologia caracterizada por alterações estruturais das proteínas de membrana do eritrócito, que causa hemólise e anemia hemolítica) (HUISJES *et al.*, 2019), em hipertensos (GAIKWAD e AVARI, 2017) e em mulheres com pré-eclâmpsia (SUHAIL, 2008).

A fragilidade osmótica pode ser tida como uma medida indireta de acessar o estresse oxidativo (CHIHUAILAF, 2002). Esses estudos citados se tornam interessantes devido a presença do estresse oxidativo nessas patologias, já que, uma vez que o dano celular é causado pelas espécies reativas, a frequência de hemólise eritrocitária é mais prevalente, a deformidade dos eritrócitos tende a diminuir e a fragilidade osmótica a aumentar, direcionando para mudanças na fisiologia e bioquímica da célula que pode culminar para morte celular.

7.7 Estudo de correlação entre mercúrio no sangue e parâmetros de estresse oxidativo e Bioquímica clínica

Nas análises de correlação, foi observado algumas correlações entre o Hg no sangue e estresse oxidativo (**Tabela 5**) e parâmetros de Bioquímica clínica (**Tabela S1**) no grupo exposto. Primeiro, o conteúdo de tiol total e GSSG foram correlacionados com a produção de espécies reativas produzidas pelas PBMCs, que pode indicar uma sinalização entre eritrócitos e PBMCs em resposta ao mercúrio no sangue. Correlações significativas entre GSH e tiol total suportam a hipótese de que é necessária a proteção celular contra o estresse oxidativo. Isso pode ter um impacto direto no estado redox. No grupo exposto, a razão GSH/GSSG foi negativamente correlacionada com Hg no sangue, o que pode ser explicado pela redução no conteúdo de GSH nesse estudo.

Os grupos tíois, como o conteúdo de GSH, parecem responsivos a fatores ambientais que inclui a presença de metais, como o mercúrio, e as espécies reativas. Na célula, a depleção de GSH também pode ocorrer por sua conjugação catalisada pela GST, que remove produtos da peroxidação lipídica ou xenobióticos associados com esse processo (DICKINSON e FORMAN, 2002). GST também foi negativamente correlacionada com Hg no sangue, e isso possivelmente pode levar a inibição da atividade dessa enzima. Correlações moderadas e fortes foram encontradas entre a atividade da GPX e GST e tiol total, conteúdo de GSH e GSSG. As atividades dessas enzimas são influenciadas por esses parâmetros, sugerindo que o dano oxidativo ocorrido no grupo exposto, pode ser consequência de um sistema antioxidante ineficiente. Alguns efeitos associados com dano oxidativo e atividade antioxidante parece estar ligado ao mercúrio no sangue, numa população ribeirinha (CARVALHO *et al.*, 2019). Em relação com os parâmetros de Bioquímica clínica (**Tabela S1**), correlações positivas foram observadas entre linfócitos e monócitos com o Hg no sangue. Embora seja uma correlação fraca, o aumento da produção de ROS por PBMCs do grupo exposto em comparação com as do grupo controle, pode ser uma resposta à presença de Hg no sangue.

Analisando as correlações da bioquímica clínica, apenas o HDL foi correlacionado com o Hg no sangue. No entanto, LDL, triglicerídeos e ALT foram correlacionados com colesterol total. Por outro lado, Almeida Lopes e colaboradores (2017) observaram uma correlação negativa entre mercúrio e triglicerídeos e entre HDL e triglicerídeos (ALMEIDA LOPES *et al.*, 2017).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso estudo, observamos disfunção do sistema redox em pescadores que vivem no entorno da Lagoa Mundaú (Alagoas, Brasil). Nesses pescadores, que estão em contato constante com esse ambiente aquático, concentrações elevadas de mercúrio foram quantificadas no sangue e na urina e comparadas com as do grupo controle. Esses resultados nos levam a acreditar que existe uma possível influência do mercúrio na indução do estresse oxidativo, uma vez que os PBMCs dos pescadores produziram uma alta concentração de ROS.

Além disso, a capacidade do mercúrio de se ligar a grupos tiol e enzimas pode ser a causa da diminuição da atividade do sistema antioxidante, levando ao dano oxidativo das biomoléculas e à diminuição da capacidade de captação de oxigênio nos eritrócitos dos pescadores. Como consequência do estresse oxidativo gerado, os eritrócitos de pescadores apresentaram aumento da fragilidade da membrana, provavelmente decorrente do dano oxidativo.

Ao correlacionar os dados, foi possível observar que o mercúrio está associado a alguns parâmetros de estresse oxidativo, o que reforça nossa hipótese de que esse metal influencia o estado redox das células sanguíneas. Por fim, este estudo pode contribuir para a compreensão dos efeitos tóxicos do mercúrio em pessoas expostas a um ambiente contaminado e estresse oxidativo, visto que, no Brasil, existem poucos estudos sobre o tema, e em nossa região (Maceió-AL), não houve revisões sistemáticas que correlacionam contaminação ambiental e estresse oxidativo na população. Além disso, este trabalho servirá como base para outros estudos no CELMM, na perspectiva de se estudar a presença de outras espécies com potencial tóxico, que por ventura possam causar efeitos semelhantes aos que foram vistos aqui.

LIMITAÇÕES DO PROJETO: Tendo em vista que esse projeto possui dados pioneiros acerca da exposição ambiental e o estresse oxidativo em pescadores na região do CELMM, algumas limitações podem ser destacadas: existe a necessidade de ampliar o n amostral, bem como selecionar os voluntários a partir de alguns critérios de exclusão, como não ser fumante, não consumir álcool ou possuir alguma patologia, pois esses fatores podem influenciar na resposta ao estresse oxidativo. Também é viável avaliar a resposta ao estresse oxidativo frente a outras espécies tóxicas (como o chumbo) e suas especiações. A toxicidade por essas espécies

químicas e o estresse oxidativo também podem ser avaliados nos peixes presentes na laguna Mundaú, uma vez que esses servem de fonte de alimento para a população circunvizinha e também é comercializado.

REFERÊNCIAS

- ABR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2019**. São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura: 148 p. 2019.
- ABUGO, O. O. et al. Direct measurements of hemoglobin interactions with liposomes using EPR spectroscopy. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**, v. 29, n. 1, p. 5-18, Jan 2001.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984.
- AHAMED, M.; SIDDIQUI, M. K. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. **Clin Chim Acta**, v. 383, n. 1-2, p. 57-64, Aug 2007.
- AHMAD, S.; MAHMOOD, R. Mercury chloride toxicity in human erythrocytes: enhanced generation of ROS and RNS, hemoglobin oxidation, impaired antioxidant power, and inhibition of plasma membrane redox system. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 26, n. 6, p. 5645-5657, Feb 2019.
- AIRES, M. D. M. **Fisiologia / Margarida de Mello Aires 3ª ed.** Rio de Janeiro: 2008. ISBN 978-85-277-1 368-9.
- AITTS, S. et al. Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. **Autophagy**, v. 11, n. 8, p. 1408-24, 2015.
- AL-SALEH, I.; AL-SEDAIRI, A.; ELKHATIB, R. Effect of mercury (Hg) dental amalgam fillings on renal and oxidative stress biomarkers in children. **Sci Total Environ**, v. 431, p. 188-96, Aug 1 2012.
- ALAGOAS, G. IMA investiga morte de peixes na Lagoa Manguaba, em Marechal Deodoro. 2019. Disponível em: < <https://g1.globo.com/al/alagoas/noticia/2019/06/17/ima-investiga-morte-de-peixes-na-lagoa-manguaba-em-marechal-deodoro.ghtml> >. Acesso em: 16/07/2019.
- ALAYASH, A. I.; PATEL, R. P.; CASHON, R. E. Redox reactions of hemoglobin and myoglobin: biological and toxicological implications. **Antioxid Redox Signal**, v. 3, n. 2, p. 313-27, Apr 2001.
- ALI, H.; KHAN, E. Environmental chemistry in the twenty-first century. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 2, p. 329-346, 2016.
- ALKHARASHI, N. A. O. et al. Cadmium triggers mitochondrial oxidative stress in human peripheral blood lymphocytes and monocytes: Analysis using in vitro and system toxicology approaches. **J Trace Elem Med Biol**, v. 42, p. 117-128, Jul 2017.
- ALMEIDA LOPES, A. C. B. et al. Association of lead, cadmium and mercury with paraoxonase 1 activity and malondialdehyde in a general population in Southern Brazil. **Environ Res**, v. 156, p. 674-682, Jul 2017.
- ANA. **ELABORAÇÃO DO PLANO DE AÇÕES E GESTÃO INTEGRADA DO COMPLEXO ESTUARINO - LAGUNAR MUNDAÚ / MANGUABA - CELMM**: Agencia Nacional de Águas: 327 p. 2004.
- ANDREOLI, V.; SPROVIERI, F. Genetic Aspects of Susceptibility to Mercury Toxicity: An Overview. **Int J Environ Res Public Health**, v. 14, n. 1, Jan 18 2017.
- ANTUNES DOS SANTOS, A. et al. Oxidative Stress in Methylmercury-Induced Cell Toxicity. **Toxics**, v. 6, n. 3, Aug 9 2018.

ARRIFANO, G. P. F. et al. Large-scale projects in the amazon and human exposure to mercury: The case-study of the Tucuruí Dam. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 147, p. 299-305, Jan 2018.

ASGARY, S. et al. Serum levels of lead, mercury and cadmium in relation to coronary artery disease in the elderly: A cross-sectional study. **Chemosphere**, v. 180, p. 540-544, Aug 2017.

ATSDR. ATSDR's Substance Priority List. 2017. Disponível em: < <https://www.atsdr.cdc.gov/SPL/#2017spl> >. Acesso em: 17/07/2019.

BAHADAR, H.; MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Growing burden of diabetes in Pakistan and the possible role of arsenic and pesticides. **J Diabetes Metab Disord**, v. 13, n. 1, p. 117, 2014.

BALAGOPALAKRISHNA, C. et al. Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions. **Biochemistry**, v. 35, n. 20, p. 6393-8, May 21 1996.

BARBOSA, F., JR. et al. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 12, p. 1669-74, Dec 2005.

BASU, N. et al. A State-of-the-Science Review of Mercury Biomarkers in Human Populations Worldwide between 2000 and 2018. **Environ Health Perspect**, v. 126, n. 10, p. 106001, Oct 2018.

BATTELLI, M. G. et al. Metabolic syndrome and cancer risk: The role of xanthine oxidoreductase. **Redox Biol**, v. 21, p. 101070, Feb 2019.

BELIKOV, A. V.; SCHRAVEN, B.; SIMEONI, L. T cells and reactive oxygen species. **J Biomed Sci**, v. 22, p. 85, Oct 15 2015.

BERGENDI, L. et al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci**, v. 65, n. 18-19, p. 1865-74, 1999.

BETTI, C.; DAVINI, T.; BARALE, R. Genotoxic activity of methyl mercury chloride and dimethyl mercury in human lymphocytes. **Mutat Res**, v. 281, n. 4, p. 255-60, Apr 1992.

BEUTLER, E. **Osmotic Fragility**. 4th. New York: McGraw Hill Publishing Co, 1990.

BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Arch Toxicol**, v. 82, n. 8, p. 493-512, Aug 2008.

BISWAS, J. et al. Curcumin protects DNA damage in a chronically arsenic-exposed population of West Bengal. **Hum Exp Toxicol**, v. 29, n. 6, p. 513-24, Jun 2010.

BORNE, Y. et al. Cadmium, Carotid Atherosclerosis, and Incidence of Ischemic Stroke. **J Am Heart Assoc**, v. 6, n. 12, Dec 2 2017.

BORTEY-SAM, N. et al. Association between human exposure to heavy metals/metalloid and occurrences of respiratory diseases, lipid peroxidation and DNA damage in Kumasi, Ghana. **Environ Pollut**, v. 235, p. 163-170, Apr 2018.

BOSCH, A. C. et al. Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review. **J Sci Food Agric**, v. 96, n. 1, p. 32-48, Jan 15 2016.

BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochem J**, v. 128, n. 3, p. 617-30, Jul 1972.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRANCO, V. et al. Biomarkers of mercury toxicity: Past, present, and future trends. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 20, n. 3, p. 119-154, 2017.

BRASIL. **Plano de Ações e Gestão Integrada do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú/Manguaba-CELMM**. : Brasília: Agência Nacional de Águas 2006.

BREWER, G. J. Red Cell Metabolism and Function. In: BREWER, G. (Ed.). **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.6, 1974. cap. 11, p.390 ISBN 1468431978.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3289-303, May 2013.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978.

BULAT, P. et al. Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in workers occupationally exposed to mercury. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 71 Suppl, p. S37-9, Sep 1998.

CABANA-MUNOZ, M. E. et al. Increased Zn/Glutathione Levels and Higher Superoxide Dismutase-1 Activity as Biomarkers of Oxidative Stress in Women with Long-Term Dental Amalgam Fillings: Correlation between Mercury/Aluminium Levels (in Hair) and Antioxidant Systems in Plasma. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0126339, 2015.

CAI, X. et al. Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. **Leukemia**, v. 14, n. 2, p. 262-70, Feb 2000.

CARNEIRO, M. F.; GROTTTO, D.; BARBOSA, F., JR. Inorganic and methylmercury levels in plasma are differentially associated with age, gender, and oxidative stress markers in a population exposed to mercury through fish consumption. **J Toxicol Environ Health A**, v. 77, n. 1-3, p. 69-79, 2014.

CARRIER, A. Metabolic Syndrome and Oxidative Stress: A Complex Relationship. **Antioxid Redox Signal**, v. 26, n. 9, p. 429-431, Mar 20 2017.

CARVALHO, L. V. B. et al. Oxidative Stress Levels Induced by Mercury Exposure in Amazon Juvenile Populations in Brazil. **Int J Environ Res Public Health**, v. 16, n. 15, Jul 27 2019.

CENTENO, J. A. et al. Pathology related to chronic arsenic exposure. **Environ Health Perspect**, v. 110 Suppl 5, p. 883-6, Oct 2002.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev**, v. 59, n. 3, p. 527-605, Jul 1979.

CHEN, C. et al. Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. **Clin Chem**, v. 51, n. 4, p. 759-67, Apr 2005.

CHEN, Y. Y. et al. Redox signaling in aging kidney and opportunity for therapeutic intervention through natural products. **Free Radic Biol Med**, v. 141, p. 141-149, Jun 11 2019.

CHENG, D. et al. Effect of aluminum (Al) speciation on erythrocytic antioxidant defense process: Correlations between lipid membrane peroxidation and morphological characteristics. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 157, p. 201-206, Aug 15 2018.

CHIHUAILAF, R. H., CONTRERAS, P.A., WITTEWER, F.G. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. **Veterinaria México**, v. 33, n. 3, p. 265–283, 2002.

CHIUEH, C. C. Neuroprotective properties of nitric oxide. **Ann N Y Acad Sci**, v. 890, p. 301-11, 1999.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Crit Rev Toxicol**, v. 36, n. 8, p. 609-62, Sep 2006.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L.; MYERS, G. J. The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. **N Engl J Med**, v. 349, n. 18, p. 1731-7, Oct 30 2003.

CLARKSON, T. W.; VYAS, J. B.; BALLATORI, N. Mechanisms of mercury disposition in the body. **Am J Ind Med**, v. 50, n. 10, p. 757-64, Oct 2007.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes. **Biochemistry**, v. 2, p. 1420-8, Nov-Dec 1963.

COMPAN, V. et al. Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. **Immunity**, v. 37, n. 3, p. 487-500, Sep 21 2012.

COMPEAU, G. C.; BARTHA, R. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. **Appl Environ Microbiol**, v. 50, n. 2, p. 498-502, Aug 1985.

CONAMA. **Resolução, Nº 357**

AMBIENTE, C. N. D. M. Resolução, Nº 357 2005.

CORRADI, M. et al. [Acute lead poisoning: a singular case of hemolytic anemia and lead colic]. **Med Lav**, v. 102, n. 3, p. 243-9, May-Jun 2011.

CORREIA, M. D. S., H.H. Management and Sustainable Development in Alagoas State's Coastal Zone, Brazil. **Revista da Gestão Costeira Integrada**, v. 8, n. 2, p. 25-45, Dez 2008 2008.

CRINNION, W. J. The CDC fourth national report on human exposure to environmental chemicals: what it tells us about our toxic burden and how it assist environmental medicine physicians. **Altern Med Rev**, v. 15, n. 2, p. 101-9, Jul 2010.

CRUZ SILVA, M. M., MADEIRA, V. M. C., ALMEIDA, L. M., & CUSTÓDIO, J. B. A. . Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1464, n. (1), p. 49–61, 2000.

CURTIS, J. M. et al. Protein carbonylation and metabolic control systems. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, n. 8, p. 399-406, Aug 2012.

CUVIN-ARALAR, M. L.; FURNESS, R. W. Mercury and selenium interaction: a review. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 21, n. 3, p. 348-64, Jun 1991.

DACIE, J. V., LEWIS, S.M. & GORDON, S.E.C. . **Practical Hematology**.
. 6th. Churchill Livingstone, New York.: 1984.

DAY, J. W., YÁÑEZ-ARANCIBIA, A., KEMP, W. M., & CRUMP, B. C. . **INTRODUCTION TO ESTUARINE ECOLOGY**. Estuarine Ecology: John Wiley & Sons, Inc 2012.

DE MAGALHAES SILVA, M. et al. 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**, v. 154, p. 661-671, Mar 19 2020.

DE SOUZA MACHADO, A. A. et al. Metal fate and effects in estuaries: A review and conceptual model for better understanding of toxicity. **Science of The Total Environment**, v. 541, p. 268-281, 2016.

DESIDERI, A.; FALCONI, M. Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. **Biochem Soc Trans**, v. 31, n. Pt 6, p. 1322-5, Dec 2003.

DIAZ-VILLASENOR, A. et al. Arsenic-induced alteration in the expression of genes related to type 2 diabetes mellitus. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 225, n. 2, p. 123-33, Dec 1 2007.

DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochem Pharmacol**, v. 64, n. 5-6, p. 1019-26, Sep 2002.

DIKMENOGLU, N. et al. Erythrocyte deformability, plasma viscosity and oxidative status in patients with severe obstructive sleep apnea syndrome. **Sleep Med**, v. 7, n. 3, p. 255-61, Apr 2006.

DO NASCIMENTO, S. N. et al. Evaluation of toxic metals and essential elements in children with learning disabilities from a rural area of southern Brazil. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10806-23, Oct 17 2014.

DOBRAKOWSKI, M. et al. Glutathione, glutathione-related enzymes, and oxidative stress in individuals with subacute occupational exposure to lead. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 45, p. 235-40, Jul 2016.

DOBRAKOWSKI, M. et al. Oxidative DNA damage and oxidative stress in lead-exposed workers. **Hum Exp Toxicol**, v. 36, n. 7, p. 744-754, Jul 2017.

DOMINGO-RELLOSO, A. et al. Urinary metals and metal mixtures and oxidative stress biomarkers in an adult population from Spain: The Hortega Study. **Environ Int**, v. 123, p. 171-180, Feb 2019.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

DROUILLET-PINARD, P. et al. Prenatal mercury contamination: relationship with maternal seafood consumption during pregnancy and fetal growth in the 'EDEN mother-child' cohort. **Br J Nutr**, v. 104, n. 8, p. 1096-100, Oct 2010.

EGGERS, M. J. et al. Community Engaged Cumulative Risk Assessment of Exposure to Inorganic Well Water Contaminants, Crow Reservation, Montana. **Int J Environ Res Public Health**, v. 15, n. 1, Jan 5 2018.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-7, May 1959.

ENGELKING, L. R. Carbohydrate Metabolism in Erythrocytes. In: (Ed.). **Textbook of Veterinary Physiological Chemistry** 3^a ed., 2015. p.190-194.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. **Curr Top Med Chem**, v. 1, n. 6, p. 529-39, Dec 2001.

ESPINOSA, O. et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), a reliable oxidative stress marker in hypertension. **Free Radic Res**, v. 41, n. 5, p. 546-54, May 2007.

FAGERBERG, B. et al. Cadmium exposure is accompanied by increased prevalence and future growth of atherosclerotic plaques in 64-year-old women. **J Intern Med**, v. 272, n. 6, p. 601-10, Dec 2012.

FAJERSZTAJN, L. et al. Air pollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 9, p. 674-8, Sep 2013.

FARDIN, P. B. A. et al. Chronic Mercury Exposure in Prehypertensive SHR Accelerates Hypertension Development and Activates Vasoprotective Mechanisms by Increasing NO and H₂O₂ Production. **Cardiovasc Toxicol**, Jul 23 2019.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 256, n. 3, p. 405-17, Nov 1 2011.

FARINA, M. et al. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. **Neurochem Int**, v. 62, n. 5, p. 575-94, Apr 2013.

FARINA, M.; ROCHA, J. B.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. **Life Sci**, v. 89, n. 15-16, p. 555-63, Oct 10 2011.

FATIMA, M. et al. In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 176-177, p. 17-30, Oct-Nov 2015.

FERREIRA, C. P. et al. Metal bioaccumulation, oxidative stress and antioxidant responses in oysters *Crassostrea gasar* transplanted to an estuary in southern Brazil. **Sci Total Environ**, v. 685, p. 332-344, May 28 2019.

FEWTRELL, L., KAUFMANN, R., PRÜSS-ÜSTÜN, A. **Lead: Assessing the environmental burden of disease at national and local levels**. ORGANIZATION, W. H. Geneva: World Health Organization (Environmental Burden of Disease Series. 2 2003.

FIELDS, C. A.; BORAK, J.; LOUIS, E. D. Mercury-induced motor and sensory neurotoxicity: systematic review of workers currently exposed to mercury vapor. **Crit Rev Toxicol**, v. 47, n. 10, p. 811-844, Nov 2017.

FLOHE, L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3139-42, May 2013.

FLOHE, L. et al. Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, v. 353, n. 6, p. 987-99, Jun 1972.

FLORA, G.; GUPTA, D.; TIWARI, A. Toxicity of lead: A review with recent updates. **Interdiscip Toxicol**, v. 5, n. 2, p. 47-58, Jun 2012.

FLORA, S. J. et al. Protective role of trace metals in lead intoxication. **Toxicol Lett**, v. 13, n. 1-2, p. 51-6, Sep 1982.

FONSECA, A. M. et al. Red blood cells inhibit activation-induced cell death and oxidative stress in human peripheral blood T lymphocytes. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 3152-60, May 15 2001.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Mol Aspects Med**, v. 30, n. 1-2, p. 1-12, Feb-Apr 2009.

FORSBERG, B. R. et al. The potential impact of new Andean dams on Amazon fluvial ecosystems. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0182254, 2017.

FUHRMANN, D. C.; BRUNE, B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. **Redox Biol**, v. 12, p. 208-215, Aug 2017.

GAIKWAD, S. S.; AVARI, J. G. Effect on Morphology, Osmotic Fragility and Electro Kinetic Potential of Erythrocytes in Hypertension. **Curr Hypertens Rev**, v. 13, n. 2, p. 132-137, 2017.

GAMBELUNGHE, A. et al. Low-level exposure to lead, blood pressure, and hypertension in a population-based cohort. **Environ Res**, v. 149, p. 157-163, Aug 2016.

GARCIA-RUIZ, C. et al. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. **J Biol Chem**, v. 272, n. 17, p. 11369-77, Apr 25 1997.

GARZA-LOMBO, C. et al. Neurotoxicity Linked to Dysfunctional Metal Ion Homeostasis and Xenobiotic Metal Exposure: Redox Signaling and Oxidative Stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 28, n. 18, p. 1669-1703, Jun 20 2018.

GAWDA, A. et al. Air pollution, oxidative stress, and exacerbation of autoimmune diseases. **Cent Eur J Immunol**, v. 42, n. 3, p. 305-312, 2017.

GBD. Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1459-1544, October 08, 2016 2015.

GERHARDT, R. E. et al. Chronic renal insufficiency from cortical necrosis induced by arsenic poisoning. **Arch Intern Med**, v. 138, n. 8, p. 1267-9, Aug 1978.

GEYER, W. R.; MACCREADY, P. The Estuarine Circulation. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 46, n. 1, p. 175-197, 2014.

GONÇALVES, D. P. Principais desastres ambientais no Brasil e no mundo. 2017. Disponível em: < <https://www.unicamp.br/unicamp/ju/noticias/2017/12/01/principais-desastres-ambientais-no-brasil-e-no-mundo> >. Acesso em: July 16.

GONG, Q. et al. Health Assessment of Trace Metal Concentrations in Organic Fertilizer in Northern China. **Int J Environ Res Public Health**, v. 16, n. 6, Mar 21 2019.

GRANDL, G.; WOLFRUM, C. Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome. **Semin Immunopathol**, v. 40, n. 2, p. 215-224, Feb 2018.

GREEN, A. J. et al. Cadmium exposure increases the risk of juvenile obesity: a human and zebrafish comparative study. **Int J Obes (Lond)**, v. 42, n. 7, p. 1285-1295, Jul 2018.

GREENPEACE. O crime da Vale em Brumadinho. 2019. Disponível em: < O crime da Vale em Brumadinho >. Acesso em: 16 de Dezembro.

GREER, J. P. **Wintrobe's clinical hematology** 13th. Philadelphia: 2014. 2278 ISBN 9781451172683.

GROTTO, D. et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **Sci Total Environ**, v. 408, n. 4, p. 806-11, Jan 15 2010.

- GROVER, P. et al. In vivo genotoxic effects of mercuric chloride in rat peripheral blood leucocytes using comet assay. **Toxicology**, v. 167, n. 3, p. 191-7, Oct 30 2001.
- HAASE, H. et al. Mercuric ions inhibit mitogen-activated protein kinase dephosphorylation by inducing reactive oxygen species. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 250, n. 1, p. 78-86, Jan 1 2011.
- HABIG, W. H., PABST, M. J., JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, n. 22, p. 7130-9, Nov 25 1974.
- HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? **Trends Biochem Sci**, v. 31, n. 9, p. 509-15, Sep 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990.
- HAREL, S.; KANNER, J. The generation of ferryl or hydroxyl radicals during interaction of haemproteins with hydrogen peroxide. **Free Radic Res Commun**, v. 5, n. 1, p. 21-33, 1988.
- HARISA, G. I. et al. Protective effect of pravastatin against mercury induced vascular cells damage: erythrocytes as surrogate markers. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 34, n. 2, p. 428-435, Sep 2012.
- HERBST, R. S. et al. Lung Master Protocol (Lung-MAP)-A Biomarker-Driven Protocol for Accelerating Development of Therapies for Squamous Cell Lung Cancer: SWOG S1400. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 7, p. 1514-24, Apr 1 2015.
- HESS, J. R., & SOLHEIM, B. G. . Red blood cell metabolism, preservation, and oxygen delivery. In: (Ed.). **Rossi's Principles of Transfusion Medicine**, 2016. cap. 9, p.97-109.
- HIGINO, P. A. S. et al. Seasonal Variation of Total Mercury in Mussels (*Mytella charruana*, Orbigny, 1842) from a Tropical Lagoon, NE, Brazil. **Rev. Virtual Quim.**, v. 4, n. 4, p. 393-404, 2012.
- HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, v. 74, n. 1, p. 214-26, Jul 1976.
- HOGEBACK, J. et al. Investigating the adduct formation of organic mercury species with carbonic anhydrase and hemoglobin from human red blood cell hemolysate by means of LC/ESI-TOF-MS and LC/ICP-MS. **Metallomics**, v. 8, n. 1, p. 101-7, Jan 2016.
- HOGG, N. et al. The role of lipid hydroperoxides in the myoglobin-dependent oxidation of LDL. **Arch Biochem Biophys**, v. 314, n. 1, p. 39-44, Oct 1994.
- HOLBEN, D. H.; SMITH, A. M. The Diverse Role of Selenium within Selenoproteins. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 7, p. 836-843, 1999.
- HUANG, H. et al. Dietary selenium supplementation alleviates immune toxicity in the hearts of chickens with lead-added drinking water. **Avian Pathol**, v. 48, n. 3, p. 230-237, Jun 2019.
- HUANG, R. N.; LEE, T. C. Cellular uptake of trivalent arsenite and pentavalent arsenate in KB cells cultured in phosphate-free medium. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 136, n. 2, p. 243-9, Feb 1996.
- HUANG, S. K. et al. Mechanistic impact of outdoor air pollution on asthma and allergic diseases. **J Thorac Dis**, v. 7, n. 1, p. 23-33, Jan 2015.
- HUANG, X. et al. Association between Concentrations of Metals in Urine and Adult Asthma: A Case-Control Study in Wuhan, China. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155818, 2016.

HUGHES, M. F. et al. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. **Toxicol Sci**, v. 123, n. 2, p. 305-32, Oct 2011.

HUISJES, R. et al. Density, heterogeneity and deformability of red cells as markers of clinical severity in hereditary spherocytosis. **Haematologica**, May 30 2019.

HULL, T. D.; AGARWAL, A.; GEORGE, J. F. The mononuclear phagocyte system in homeostasis and disease: a role for heme oxygenase-1. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 11, p. 1770-88, Apr 10 2014.

HULTBERG, B.; ANDERSSON, A.; ISAKSSON, A. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. **Toxicology**, v. 156, n. 2-3, p. 93-100, Jan 2 2001.

IDREES, M.; BATOOL, S. Environmental risk assessment of chronic arsenic in drinking water and prevalence of type-2 diabetes mellitus in Pakistan. **Environ Technol**, p. 1-6, Jul 13 2018.

IHEDIOHA, J. N.; UKOHA, P. O.; EKERE, N. R. Ecological and human health risk assessment of heavy metal contamination in soil of a municipal solid waste dump in Uyo, Nigeria. **Environ Geochem Health**, v. 39, n. 3, p. 497-515, Jun 2017.

INSUG, O. et al. Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. **Toxicology**, v. 124, n. 3, p. 211-24, Dec 31 1997.

IPCS. **Inorganic lead. CRITERIA**, I. P. O. C. S. E. H. Geneva: World Health Organization, 1995.

_____. **Arsenic and arsenic compounds**. 224), I. P. O. C. S. E. H. C. Geneva: World Health Organization 2001.

JACKSON, S. H. et al. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. **Nat Immunol**, v. 5, n. 8, p. 818-27, Aug 2004.

JARUP, L. et al. Biological half-time of cadmium in the blood of workers after cessation of exposure. **Scand J Work Environ Health**, v. 9, n. 4, p. 327-31, Aug 1983.

JAVED, M. et al. Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal. **Chemosphere**, v. 151, p. 210-9, May 2016.

JAVED, M. et al. Multiple biomarker responses (serum biochemistry, oxidative stress, genotoxicity and histopathology) in *Channa punctatus* exposed to heavy metal loaded waste water. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 1675, May 10 2017.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2-3, p. 65-87, May 10 2011.

JUNAID, M. et al. Potential health risk of heavy metals in the leather manufacturing industries in Sialkot, Pakistan. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 8848, Aug 18 2017.

KARIMI, R.; VACCHI-SUZZI, C.; MELIKER, J. R. Mercury exposure and a shift toward oxidative stress in avid seafood consumers. **Environ Res**, v. 146, p. 100-7, Apr 2016.

KARLMARK, K. R.; TACKE, F.; DUNAY, I. R. Monocytes in health and disease - Minireview. **Eur J Microbiol Immunol (Bp)**, v. 2, n. 2, p. 97-102, Jun 2012.

KASPERCZYK, A. et al. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in the blood cells of workers who were occupationally exposed to lead. **Toxicology**, v. 301, n. 1-3, p. 79-84, Nov 15 2012.

KASPERCZYK, A. et al. The effect of occupational lead exposure on blood levels of zinc, iron, copper, selenium and related proteins. **Biol Trace Elem Res**, v. 150, n. 1-3, p. 49-55, Dec 2012.

KASPERCZYK, S. et al. Effect of N-acetylcysteine administration on homocysteine level, oxidative damage to proteins, and levels of iron (Fe) and Fe-related proteins in lead-exposed workers. **Toxicol Ind Health**, v. 32, n. 9, p. 1607-18, Sep 2016.

KASPERCZYK, S. et al. The influence of beta-carotene on homocysteine level and oxidative stress in lead-exposed workers. **Med Pr**, v. 65, n. 3, p. 309-16, 2014.

KASPERCZYK, S. et al. Function of heart muscle in people chronically exposed to lead. **Ann Agric Environ Med**, v. 12, n. 2, p. 207-10, 2005.

KASPERCZYK, S. et al. The effect of occupational lead exposure on lipid peroxidation, protein carbonylation, and plasma viscosity. **Toxicol Ind Health**, v. 31, n. 12, p. 1165-71, Dec 2015.

KERN, W. **PDQ Hematology**. 2002. ISBN 1-55009-176-x.

KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends Biochem Sci**, v. 32, n. 1, p. 44-50, Jan 2007.

KLOTZ, K.; GOEN, T. Human Biomonitoring of Lead Exposure. **Met Ions Life Sci**, v. 17, Apr 10 2017.

KOSHLAND, D. E., JR. The molecule of the year. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1861, Dec 18 1992.

KRISTIANSEN, M. et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 198-201, Jan 11 2001.

KUHN, V. et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. **Antioxid Redox Signal**, v. 26, n. 13, p. 718-742, May 1 2017.

KUNO, R. **Valores de referência para chumbo, cádmio e mercúrio em população adulta da Região Metropolitana de São Paulo**. 2009. 166 Tese (Doutorado). Departamento de Medicina Preventiva, Universidade de São Paulo, São Paulo.

KUO, C. C. et al. The Association of Arsenic Metabolism with Cancer, Cardiovascular Disease, and Diabetes: A Systematic Review of the Epidemiological Evidence. **Environ Health Perspect**, v. 125, n. 8, p. 087001, Aug 1 2017.

KVESTAD, I. et al. Fatty fish, hair mercury and cognitive function in Norwegian preschool children: Results from the randomized controlled trial FINS-KIDS. **Environ Int**, v. 121, n. Pt 2, p. 1098-1105, Dec 2018.

KWONG, R. C. et al. Arsenic exposure predicts bladder cancer survival in a US population. **World J Urol**, v. 28, n. 4, p. 487-92, Aug 2010.

LANDRIGAN, P. J. et al. The Lancet Commission on pollution and health. **The Lancet**, v. 391, n. 10119, p. 462-512, 2018.

LANDRIGAN, P. J. et al. The Lancet Commission on pollution and health. **Lancet**, v. 391, n. 10119, p. 462-512, Feb 3 2018.

- LANDSMAN, L. et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. **Blood**, v. 113, n. 4, p. 963-72, Jan 22 2009.
- LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013.
- LEBEL, C. P.; ALI, S. F.; BONDY, S. C. Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 112, n. 1, p. 161-5, Jan 1992.
- LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol**, v. 5, n. 2, p. 227-31, Mar-Apr 1992.
- LEGGETT, R. W. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. **Environ Health Perspect**, v. 101, n. 7, p. 598-616, Dec 1993.
- LEHMANN, I.; SACK, U.; LEHMANN, J. Metal ions affecting the immune system. **Met Ions Life Sci**, v. 8, p. 157-85, 2011.
- LEONCINI, S. et al. Oxidative stress, erythrocyte ageing and plasma non-protein-bound iron in diabetic patients. **Free Radic Res**, v. 42, n. 8, p. 716-24, Aug 2008.
- LESLIE, E. M.; HAIMEUR, A.; WAALKES, M. P. Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. **J Biol Chem**, v. 279, n. 31, p. 32700-8, Jul 30 2004.
- LEUNG, W. H. et al. Sensitive and adaptable pharmacological control of CAR T cells through extracellular receptor dimerization. **JCI Insight**, v. 5, Apr 30 2019.
- LEY, K. The Microcirculation in Inflammation In: (Ed.). **Microcirculation**, 2008. cap. 9, p.387-474.
- LI, M. M. et al. The trend of lead poisoning rate in Chinese population aged 0-18 years old: a meta-analysis. **BMC Public Health**, v. 15, p. 756, Aug 6 2015.
- LIMA, I. F. **Maceió, a cidade restinga: Uma contribuição ao estudo geomorfológico do litoral alagoano**. 2^a ed. Maceió: EDUFAL, 1990.
- LIN, T. Y. et al. Both Phosphorus Fertilizers and Indigenous Bacteria Enhance Arsenic Release into Groundwater in Arsenic-Contaminated Aquifers. **J Agric Food Chem**, v. 64, n. 11, p. 2214-22, Mar 23 2016.
- LIU, X. et al. Lead Induces Genotoxicity via Oxidative Stress and Promoter Methylation of DNA Repair Genes in Human Lymphoblastoid TK6 Cells. **Med Sci Monit**, v. 24, p. 4295-4304, Jun 22 2018.
- LIU, Z. et al. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 9, p. 6053-8, Apr 30 2002.
- LOPES, A. C. et al. Lead Exposure and Oxidative Stress: A Systematic Review. **Rev Environ Contam Toxicol**, v. 236, p. 193-238, 2016.
- LU, J.; HOLMGREN, A. Selenoproteins. **J Biol Chem**, v. 284, n. 2, p. 723-7, Jan 9 2009.

MACDONALD GIBSON, J. et al. Deaths and medical visits attributable to environmental pollution in the United Arab Emirates. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e57536, 2013.

MAERTENS DE NOORDHOUT, C. et al. Mapping EQ-5D utilities to GBD 2010 and GBD 2013 disability weights: results of two pilot studies in Belgium. **Arch Public Health**, v. 75, p. 6, 2017.

MAHESHWARI, N.; KHAN, F. H.; MAHMOOD, R. Sodium meta-arsenite induced reactive oxygen species in human red blood cells: impaired antioxidant and membrane redox systems, haemoglobin oxidation, and morphological changes. **Free Radic Res**, v. 51, n. 5, p. 483-497, May 2017.

MAHRAM, M. et al. Comparison of hypertension and diabetes mellitus prevalence in areas with and without water arsenic contamination. **J Res Med Sci**, v. 18, n. 5, p. 408-12, May 2013.

MAIOLI, O. L. G. et al. Polycyclic aromatic and aliphatic hydrocarbons in *Mytella charruana*, a bivalve mollusk from Mundaú Lagoon, Brazil. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 172-179, 2010.

MAIWORM, A. I., PRESTA, G. A., SANTOS-FILHO, S. D., PAOLI, S. DE, GIANI, T. S., FONSECA, A. S., & BERNARDO-FILHO, M. Osmotic and morphological effects on red blood cell membrane: action of an aqueous extract of *Lantana camara*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 42-46, 2008.

MARSHALL, B. G. et al. Evidence of mercury biomagnification in the food chain of the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi* (Osteichthyes: Characidae) in the Rio Negro, central Amazon, Brazil. **J Fish Biol**, v. 89, n. 1, p. 220-40, Jul 2016.

MARTELLI, A. et al. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1807-14, Nov 2006.

MATOS, J. A. **VARIAÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL DAS CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNIO ASSOCIADO AO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO EM PARACATU** 2014. 114 Dissertação de Mestrado (Master). Universidade Federal Fluminense, Niterói.

MEARNS, A. J. et al. Effects of Pollution on Marine Organisms. **Water Environ Res**, v. 90, n. 10, p. 1206-1300, Oct 1 2018.

MEENA, R. A. A. et al. Heavy metal pollution in immobile and mobile components of lentic ecosystems-a review. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 25, n. 5, p. 4134-4148, Feb 2018.

MENKE, A. et al. Cadmium levels in urine and mortality among U.S. adults. **Environ Health Perspect**, v. 117, n. 2, p. 190-6, Feb 2009.

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. Sistema Imunitário – Parte II: Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 09/23/2019 2010.

METERE, A. et al. Peroxynitrite signaling in human erythrocytes: synergistic role of hemoglobin oxidation and band 3 tyrosine phosphorylation. **Arch Biochem Biophys**, v. 484, n. 2, p. 173-82, Apr 15 2009.

MEYER, A. J.; HELL, R. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. **Photosynth Res**, v. 86, n. 3, p. 435-57, Dec 2005.

MILLER, D. M.; BUETTNER, G. R.; AUST, S. D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. **Free Radic Biol Med**, v. 8, n. 1, p. 95-108, 1990.

MILLER, S. et al. Mercury-associated nephrotic syndrome: a case report and systematic review of the literature. **Am J Kidney Dis**, v. 62, n. 1, p. 135-8, Jul 2013.

MILLS, G. C. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. **J Biol Chem**, v. 229, n. 1, p. 189-97, Nov 1957.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, May 25 1972.

MITCHELL, T. et al. The mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone protects against cold storage injury of renal tubular cells and rat kidneys. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 336, n. 3, p. 682-92, Mar 2011.

MOHANA, K.; ACHARY, A. Human cytosolic glutathione-S-transferases: quantitative analysis of expression, comparative analysis of structures and inhibition strategies of isozymes involved in drug resistance. **Drug Metab Rev**, v. 49, n. 3, p. 318-337, Aug 2017.

MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3939-48, Nov 15 2008.

MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E.; RIFKIND, J. M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. **Front Physiol**, v. 5, p. 84, 2014.

MONCADA, S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. **Ann N Y Acad Sci**, v. 811, p. 60-7; discussion 67-9, Apr 15 1997.

MORGANO, M. A. O., A.P.F.; RABONATO, L.C.; MILANI, R.F.; VASCONCELLOS, J.P.; CITTI, A.L.; TELLES, E.O.; BALIAN, S.C. Inorganic contaminants (As, Cd, Cr, Hg and Pb) in fish species. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 497-506, 2011.

MOSCHONAS, I. C.; TSELEPIS, A. D. The pathway of neutrophil extracellular traps towards atherosclerosis and thrombosis. **Atherosclerosis**, v. 288, p. 9-16, Jun 29 2019.

MRUGESH, T.; DIPA, L.; MANISHIKA, G. Effect of lead on human erythrocytes: an in vitro study. **Acta Pol Pharm**, v. 68, n. 5, p. 653-6, Sep-Oct 2011.

MURPHY, M. P. Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, n. 6, p. 476-95, Mar 15 2012.

NAVANEETHAKRISHNAN, S.; ROSALES, J. L.; LEE, K. Y. ROS-Mediated Cancer Cell Killing through Dietary Phytochemicals. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2019, p. 9051542, 2019.

NAVAS-ACIEN, A. et al. Metals in urine and peripheral arterial disease. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 2, p. 164-9, Feb 2005.

NAZIMA, B.; MANOHARAN, V.; MILTONPRABU, S. Oxidative stress induced by cadmium in the plasma, erythrocytes and lymphocytes of rats: Attenuation by grape seed proanthocyanidins. **Hum Exp Toxicol**, v. 35, n. 4, p. 428-47, Apr 2016.

NCM. **Cadmium Review** MINISTERS, N. C. O.: Nordic Council of Ministers: 26 p. 2003.

NELSON, D. L. C., M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6^a. Freeman, W. H. & Company, 2014. 1328 ISBN 8428216037.

NELSON, L. S., LEWIN, N.A., HOWLAND, M.A., HOFFMAN, R.S., GOLDFRANK, L.R., FLOMENBAUM, N.E. **Principles of Managing the Acutely Poisoned or Overdosed Patient**. Goldfrank's Toxicologic Emergencies. New York: McGrawHill: Virginia Commonwealth University Libraries 2011.

NIKOLIĆ-KOKIĆ, A.; BLAGOJEVIĆ, D.; SPASIĆ, M. Complexity of free radical Metabolism in human Erythrocytes. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 189-195, 2010.

OFFICIOSO, A. et al. Comparative Analysis of the Effects of Olive Oil Hydroxytyrosol and Its 5-S-Lipoyl Conjugate in Protecting Human Erythrocytes from Mercury Toxicity. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 9042192, 2018.

OGURA, H.; TAKEUCHI, T.; MORIMOTO, K. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. **Mutat Res**, v. 340, n. 2-3, p. 175-82, Jun 1996.

OLIVEIRA, A. M., KJERFVE, B. Environmental Responses of a Tropical Coastal Lagoon System to Hydrological Variability: Mundaú-Manguaba, Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 37, n. 6, p. 575-591, Dez 1993 1993.

OMANWAR, S. et al. Modulation of vasodilator response via the nitric oxide pathway after acute methyl mercury chloride exposure in rats. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 530603, 2013.

ONG, C. N.; LEE, W. R. Distribution of lead-203 in human peripheral blood in vitro. **Br J Ind Med**, v. 37, n. 1, p. 78-84, Feb 1980.

PABST, M. J.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferase A. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration. **J Biol Chem**, v. 249, n. 22, p. 7140-7, Nov 25 1974.

PADMAJA, S.; HUIE, R. E. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 195, n. 2, p. 539-44, Sep 15 1993.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. v. 70, n. 1, p. 158-169, 03/21/1967 1967.

PAL, S. et al. The association of type 2 diabetes and insulin resistance/secretion with persistent organic pollutants in two First Nations communities in northern Ontario. **Diabetes Metab**, v. 39, n. 6, p. 497-504, Dec 2013.

PANDA, S. et al. Study of Red Cell Fragility in Different Stages of Chronic Kidney Disease in Relation to Parathyroid Hormone. **J Clin Diagn Res**, v. 11, n. 8, p. BC29-BC32, Aug 2017.

PASTOR, N. et al. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. **J Mol Biol**, v. 304, n. 1, p. 55-68, Nov 17 2000.

PASTORELLI, A. A. et al. Human exposure to lead, cadmium and mercury through fish and seafood product consumption in Italy: a pilot evaluation. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 29, n. 12, p. 1913-21, 2012.

PATIL, A. J. et al. Effect of lead (Pb) exposure on the activity of superoxide dismutase and catalase in battery manufacturing workers (BMW) of Western Maharashtra (India) with reference to heme biosynthesis. **Int J Environ Res Public Health**, v. 3, n. 4, p. 329-37, Dec 2006.

PATRICK, L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. **Altern Med Rev**, v. 11, n. 1, p. 2-22, Mar 2006.

PESCA. Relações das Colônias dos Pescadores do Estado de Alagoas. 2019. Disponível em: < <http://www.pesca.al.gov.br/pescadores-colonias-e-associacoes/relacoes-das-colonias-dos-pescadores-do-estado-de-alagoas> >. Acesso em: 16/07/2019.

PINHEIRO, M. C. et al. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon. **Environ Res**, v. 107, n. 1, p. 53-9, May 2008.

POLYKRETIS, P. et al. Cadmium effects on superoxide dismutase 1 in human cells revealed by NMR. **Redox Biol**, v. 21, p. 101102, Feb 2019.

PONCZEK, M. B.; WACHOWICZ, B. [Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with proteins]. **Postepy Biochem**, v. 51, n. 2, p. 140-5, 2005.

PRETORIUS, E. Basic principles of allergic reactions. **SADJ**, v. 57, n. 8, p. 332-4, Aug 2002.

QUINTANAR-ESCORZA, M. A. et al. Oxidative damage increases intracellular free calcium [Ca²⁺]_i concentration in human erythrocytes incubated with lead. **Toxicol In Vitro**, v. 24, n. 5, p. 1338-46, Aug 2010.

RABENSTEIN, D. L.; FAIRHURST, M. T. Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. XI. The binding of methylmercury by sulfhydryl-containing amino acids and by glutathione. **J Am Chem Soc**, v. 97, n. 8, p. 2086-92, Apr 16 1975.

RABENSTEIN, D. L.; ISAB, A. A.; REID, R. S. A proton nuclear magnetic resonance study of the binding of methylmercury in human erythrocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 720, n. 1, p. 53-64, Feb 10 1982.

RADI, R. et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch Biochem Biophys**, v. 288, n. 2, p. 481-7, Aug 1 1991a.

_____. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **J Biol Chem**, v. 266, n. 7, p. 4244-50, Mar 5 1991b.

RAFATI-RAHIMZADEH, M.; KAZEMI, S.; MOGHADAMNIA, A. A. Current approaches of the management of mercury poisoning: need of the hour. **Daru**, v. 22, p. 46, Jun 2 2014.

RANI, V. et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sci**, v. 148, p. 183-93, Mar 1 2016.

REISZ, J. A. et al. Oxidative modifications of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulate metabolic reprogramming of stored red blood cells. **Blood**, v. 128, n. 12, p. e32-42, Sep 22 2016.

RICE, K. M. et al. Environmental mercury and its toxic effects. **J Prev Med Public Health**, v. 47, n. 2, p. 74-83, Mar 2014.

RIFKIND, J. M.; NAGABABU, E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 17, p. 2274-83, Jun 10 2013.

RIFKIND, J. M. et al. Hemoglobin redox reactions and oxidative stress. **Redox Rep**, v. 8, n. 5, p. 234-7, 2003.

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**, v. 737, p. 183-9, 2012.

RISHER, J. F. et al. Updated toxicological profile for mercury. **Toxicol Ind Health**, v. 15, n. 5, p. 480-2, Aug 1999.

RITTER, L. et al. Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry. **J Toxicol Environ Health A**, v. 65, n. 1, p. 1-142, Jan 11 2002.

ROBINSON, J.; COOPER, J. M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. **Anal Biochem**, v. 33, n. 2, p. 390-9, Feb 1970.

ROTTER, I. et al. Relationship between the concentrations of heavy metals and bioelements in aging men with metabolic syndrome. **Int J Environ Res Public Health**, v. 12, n. 4, p. 3944-61, Apr 10 2015.

RUBBO, H. et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **J Biol Chem**, v. 269, n. 42, p. 26066-75, Oct 21 1994.

SACHDEVA, C. et al. Lead: Tiny but Mighty Poison. **Indian J Clin Biochem**, v. 33, n. 2, p. 132-146, Apr 2018.

SALLES, V. **Guia do Meio Ambiente - Litoral de Alagoas**. Maceió: Instituto do Meio Ambiente (IMA): 186 p. 1995.

SALVI, M. et al. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. **J Biol Chem**, v. 282, n. 33, p. 24407-15, Aug 17 2007.

SANDERS, T. et al. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review. **Rev Environ Health**, v. 24, n. 1, p. 15-45, Jan-Mar 2009.

SANTOS, E. C. D.; SAMPAIO, C. L. S. A Pesca Artesanal na Comunidade de Fernão Velho, Maceió (Alagoas, Brasil): de Tradicional a Marginal. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 13, n. 4, p. 513-524, 2013.

SANTOS, J. C. N. et al. Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). **Int J Biol Macromol**, v. 113, p. 1032-1040, Jul 1 2018.

SANTOS, M. C. **Níveis de Elementos Potencialmente Tóxicos na Água e no Sururu da Lagoa Mundaú (Alagoas, Brasil): Contaminação Ambiental e Potencial Exposição à Saúde Humana**. 2019. 111 (Doutorado). Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

SANTOS, T. M. M. **Análise química e microbiológica do sururu "Mytella falcata" com e sem leite de coco**. 2009. 102 Dissertação (Master). FACULDADE DE NUTRIÇÃO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Maceió.

SARAH, R. et al. Bioaccumulation of heavy metals in *Channa punctatus* (Bloch) in river Ramganga (U.P.), India. **Saudi J Biol Sci**, v. 26, n. 5, p. 979-984, Jul 2019.

SAULICK, B. et al. Heavy metal bioaccumulation in commercial Lethrinidae fish species in Mauritius. **Ital J Food Saf**, v. 6, n. 4, p. 6607, Oct 20 2017.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med**, v. 30, n. 11, p. 1191-212, Jun 1 2001.

SCHAUR, R. J. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. **Mol Aspects Med**, v. 24, n. 4-5, p. 149-59, Aug-Oct 2003.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-38, Nov 15 2008.

SCHIPPER, H. M. et al. Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. **J Neurochem**, v. 110, n. 2, p. 469-85, Jul 2009.

SCHIRALDI, M.; MONESTIER, M. How can a chemical element elicit complex immunopathology? Lessons from mercury-induced autoimmunity. **Trends Immunol**, v. 30, n. 10, p. 502-9, Oct 2009.

SCHOBER, P.; BOER, C.; SCHWARTE, L. A. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. **Anesth Analg**, v. 126, n. 5, p. 1763-1768, May 2018.

SCHULZ, R. et al. Review on environmental alterations propagating from aquatic to terrestrial ecosystems. **Sci Total Environ**, v. 538, p. 246-61, Dec 15 2015.

SEATON, A.; GODDEN, D. J.; BROWN, K. Increase in asthma: a more toxic environment or a more susceptible population? **Thorax**, v. 49, n. 2, p. 171-4, Feb 1994.

SHANKAR, S.; SHANKER, U.; SHIKHA. Arsenic contamination of groundwater: a review of sources, prevalence, health risks, and strategies for mitigation. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 304524, 2014.

SHENKER, B. J. et al. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. II. Alterations in cell viability. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 14, n. 3, p. 555-77, 1992.

SHENKER, B. J.; GUO, T. L.; SHAPIRO, I. M. Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence of mitochondrial dysfunction. **Environ Res**, v. 77, n. 2, p. 149-59, May 1998.

SHENKER, B. J. et al. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. I. Suppression of T-cell activation. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 14, n. 3, p. 539-53, 1992.

SHI, H. et al. Arsenite causes DNA damage in keratinocytes via generation of hydroxyl radicals. **Chem Res Toxicol**, v. 17, n. 7, p. 871-8, Jul 2004.

SHIKAMA, K. The Molecular Mechanism of Autoxidation for Myoglobin and Hemoglobin: A Venerable Puzzle. **Chem Rev**, v. 98, n. 4, p. 1357-1374, Jun 18 1998.

SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks In: SIES, H. (Ed.). **In Oxidative stress**. London: Academic Press, 1985. cap. 1, p.1-8.

_____. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol**, v. 4, p. 180-3, 2015.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annu Rev Biochem**, v. 86, p. 715-748, Jun 20 2017.

SILVA, F. F. **Avaliação da mobilidade de arsênio, cádmio, cromo, cobre, níquel, chumbo e zinco nos sedimentos da bacia do Rio Ribeira de Iguape**. 2014. 248 (Doutorado). Instituto de Química Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, I. A. et al. Mercury exposure, malaria, and serum antinuclear/antinucleolar antibodies in Amazon populations in Brazil: a cross-sectional study. **Environ Health**, v. 3, n. 1, p. 11, Nov 2 2004.

SIMÕES-ALVES, A. C. et al. Neonatal treatment with fluoxetine improves mitochondrial respiration and reduces oxidative stress in liver of adult rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 8, p. 6555-6565, 2018.

SKALDINA, O.; PERANIEMI, S.; SORVARI, J. Ants and their nests as indicators for industrial heavy metal contamination. **Environ Pollut**, v. 240, p. 574-581, Sep 2018.

SMOLDERS, R. et al. Inter- and intra-individual variation in urinary biomarker concentrations over a 6-day sampling period. Part 1: metals. **Toxicol Lett**, v. 231, n. 2, p. 249-60, Dec 1 2014.

SOLENKOVA, N. V. et al. Metal pollutants and cardiovascular disease: mechanisms and consequences of exposure. **Am Heart J**, v. 168, n. 6, p. 812-22, Dec 2014.

SOREK-HAMER, M.; JUST, A. C.; KLOOG, I. Satellite remote sensing in epidemiological studies. **Curr Opin Pediatr**, v. 28, n. 2, p. 228-34, Apr 2016.

SPAHS, S.; BORYS, J. M.; LEVY, E. Metabolic Syndrome as a Multifaceted Risk Factor for Oxidative Stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 26, n. 9, p. 445-461, Mar 20 2017.

SPILLER, H. A. Rethinking mercury: the role of selenium in the pathophysiology of mercury toxicity. **Clin Toxicol (Phila)**, v. 56, n. 5, p. 313-326, May 2018.

STEFFENSEN, I. L. et al. Cytotoxicity and accumulation of Hg, Ag, Cd, Cu, Pb and Zn in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes in vitro. **Gen Pharmacol**, v. 25, n. 8, p. 1621-33, Dec 1994.

STORELLI, M. M.; BARONE, G. Toxic metals (Hg, Pb, and Cd) in commercially important demersal fish from Mediterranean sea: contamination levels and dietary exposure assessment. **J Food Sci**, v. 78, n. 2, p. T362-6, Feb 2013.

SUDO, K. et al. Comparative analysis of in vitro neurotoxicity of methylmercury, mercury, cadmium, and hydrogen peroxide on SH-SY5Y cells. **J Vet Med Sci**, v. 81, n. 6, p. 828-837, Jun 6 2019.

SUGAWARA, E. et al. Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. **Br J Ind Med**, v. 48, n. 4, p. 239-42, Apr 1991.

SUHAIL, M., SUHAIL, M.F., KHAN, H. Alterations in antioxidant and pro-oxidant balance in preeclampsia – impact on erythrocyte osmotic fragility. **Biochem Med**, v. 18, n. 3, p. 331 - 341, June 28, 2008 2008.

SUN, K. et al. Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia. **Nat Commun**, v. 7, p. 12086, Jul 15 2016.

SUWALSKY, M. et al. Effects of lead on the human erythrocyte membrane and molecular models. **J Inorg Biochem**, v. 97, n. 3, p. 308-13, Nov 1 2003.

SYVERSEN, T.; KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. **J Trace Elem Med Biol**, v. 26, n. 4, p. 215-26, Oct 2012.

TAMANO, L. T. O. A., D.M.; LIMA, B. B. C.; SILVA, F. N. F.; SILVA, J. Socioeconomics and health of *Mytella falcata* fishermen in Mundaú lagoon, Maceió, AL. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 10, n. 3, p. 699-710, Set/Dez 2015.

TSINOVOI, C. L. et al. Arsenic Exposure in Relation to Ischemic Stroke: The Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke Study. **Stroke**, v. 49, n. 1, p. 19-26, Jan 2018.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, v. 552, n. Pt 2, p. 335-44, Oct 15 2003.

UNION, E. **Directive 2010/75/EU of the European Parliament and of the Council of 24 November 2010 on industrial emissions (integrated pollution prevention and control)**. Official Journal of the European Union 2010.

VACCHI-SUZZI, C. et al. Low levels of lead and glutathione markers of redox status in human blood. **Environ Geochem Health**, v. 40, n. 4, p. 1175-1185, Aug 2018.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAS, J.; MONESTIER, M. Immunology of mercury. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1143, p. 240-67, Nov 2008.

VENKATESWARLU, K. et al. Abandoned metalliferous mines: ecological impacts and potential approaches for reclamation. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, n. 2, p. 327-354, 2016.

VERCESI, A. E. et al. Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. **Free Radic Biol Med**, v. 129, p. 1-24, Dec 2018.

VERMA, N. et al. In Vitro Studies on Ameliorative Effects of Limonene on Cadmium-Induced Genotoxicity in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 187, n. 4, p. 1384-1397, Apr 2019.

VEZZONE, M. et al. Metal pollution in surface sediments from Rodrigo de Freitas Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): Toxic effects on marine organisms. **Environ Pollut**, v. 252, n. Pt A, p. 270-280, May 21 2019.

VONA, R. et al. Biomarkers of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome and Associated Diseases. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2019, p. 8267234, 2019.

VU, C. T. et al. Bioaccumulation and potential sources of heavy metal contamination in fish species in Taiwan: assessment and possible human health implications. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 24, n. 23, p. 19422-19434, Aug 2017.

WANG, B.; DU, Y. Cadmium and its neurotoxic effects. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, p. 898034, 2013.

WANG, D. et al. Total arsenic and speciation analysis of saliva and urine samples from individuals living in a chronic arsenicosis area in China. **Environ Health Prev Med**, v. 22, n. 1, p. 45, May 11 2017.

WANI, A. L.; ARA, A.; USMANI, J. A. Lead toxicity: a review. **Interdiscip Toxicol**, v. 8, n. 2, p. 55-64, Jun 2015.

WHO. **Mercury in Health Care** World Health Organization. DEPARTMENT OF PROTECTION OF THE HUMAN ENVIRONMENT WATER, S. A. H. Geneva: 2 p. 2005.

_____. **EXPOSURE TO CADMIUM: A MAJOR PUBLIC HEALTH CONCERN**. ENVIRONMENT, P. H. A. Geneva World Health Organization: 4 p. 2010a.

_____. **EXPOSURE TO LEAD: A MAJOR PUBLIC HEALTH CONCERN** Geneva: World Health Organization: 6 p. 2010b.

_____. **Arsenic in Drinking-water** World Health Organization
24 p. 2011.

_____. Asthma. Update in: August/2017. 2017. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/>>. Acesso em: June/15/2019.

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

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nat Chem Biol**, v. 4, n. 5, p. 278-86, May 2008.

WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 6, p. 1430-42, Jun 2000.

WU, M. M. et al. Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan. **Environ Health Perspect**, v. 109, n. 10, p. 1011-7, Oct 2001.

WU, X. et al. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 23, n. 9, p. 8244-59, May 2016.

XIONG, R. et al. Disease-related responses induced by cadmium in an in vitro human airway tissue model. **Toxicol Lett**, v. 303, p. 16-27, Mar 15 2019.

XIONG, W. et al. Biological consequences of environmental pollution in running water ecosystems: A case study in zooplankton. **Environ Pollut**, v. 252, n. Pt B, p. 1483-1490, Jun 24 2019.

YACHIE-KINOSHITA, A. et al. A metabolic model of human erythrocytes: practical application of the E-Cell Simulation Environment. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 642420, 2010.

YILDIZ, M. et al. Lipid peroxidation and DNA oxidation caused by dental filling materials. **J Dent Sci**, v. 12, n. 3, p. 233-240, Sep 2017.

ZANATTA, A. et al. Neurochemical evidence that the metabolites accumulating in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency induce oxidative damage in cerebral cortex of young rats. **Cell Mol Neurobiol**, v. 33, n. 1, p. 137-46, Jan 2013.

ZHANG, J. H. et al. Neutrophil stimulation and priming by direct contact with activated human T lymphocytes. **J Immunol**, v. 148, n. 1, p. 177-81, Jan 1 1992.

ZHANG, Q. et al. Spatial heterogeneity of heavy metal contamination in soils and plants in Hefei, China. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 1049, Jan 31 2019.

ZHAO, C. N. et al. Emerging role of air pollution in autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**, v. 18, n. 6, p. 607-614, Jun 2019.

ZHONG, Z. et al. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. **Nat Commun**, v. 4, p. 1611, 2013.

ZHOU, R. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 221-5, Jan 13 2011.

ZUO, Y. et al. Oxidative modification of caspase-9 facilitates its activation via disulfide-mediated interaction with Apaf-1. **Cell Res**, v. 19, n. 4, p. 449-57, Apr 2009.

9 MATERIA SUPLEMENTAR

9.1 Correlação de Spearman entre Hg no sangue e parâmetros de Bioquímica clínica do grupo exposto

Tabela S1 — Correlações de Spearman entre o nível de Hg e parâmetros de Bioquímica clínica do grupo exposto (n = 47-50).

	Hg Sangue	Eritrócitos	Hemoglobina	Hematócrito	Linfócitos	Monócitos	Glicose	Col. Total	HDL	LDL	Triglicerídeos	ALT	AST
Hg Sangue	1												
Eritrócitos	0,0778	1											
Hemoglobina	0,1598	0,5598****	1										
Hematócrito	0,1737	0,6907****	0,8288****	1									
Linfócitos	0,3844**	0,0543	-0,0354	-0,0970	1								
Monócitos	0,3119*	0,2795*	0,2978*	0,1038	0,3999**	1							
Glicose	0,2117	0,2293	0,1918	0,2677	0,1144	0,1827	1						
Col. Total	0,1641	-0,0819	-0,1720	-0,1573	0,1900	0,0087	0,0595	1					
HDL	0,2027	-0,0822	0,1988	0,1733	0,1756	-0,0231	0,1581	-0,2009	1				
LDL	0,1206	0,0142	0,0578	0,0235	0,0748	0,0327	0,0073	0,6071****	0,2610	1			
Triglicerídeos	0,1880	-0,0100	0,0990	-0,0583	0,1539	0,0588	0,1037	0,3923**	0,1035	0,0650	1		
ALT	-0,1072	0,0092	0,1591	0,0768	-0,0984	0,2654	-0,1879	0,3524*	0,2408	0,0448	0,4257**	1	
AST	0,0332	0,2944*	0,4564**	0,3625*	-0,0123	0,1833	-0,0290	0,2696	0,1136	0,0536	0,3729*	0,5428****	1

*Correlação significativa quando nível de $p < 0,05$ (2-tailed), ** Correlação significativa quando nível de $p < 0,005$ (2-tailed), **** Correlação significativa quando nível de $p < 0,0001$ (2-tailed).

ANEXOS

Anexo A – Termo de Livre Consentimento e Esclarecimento (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

(Em 2 vias, firmado por cada participante-voluntário(o,a) da pesquisa e pelo responsável)

Eu, tendo sido convidado(o,a) a participar como voluntário(o,a) do estudo *Avaliação da exposição a contaminantes inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) no ambiente e parâmetros bioquímicos associados ao estresse oxidativo da população circunvizinha ao Complexo Lagunar Mundaú-Manguaba (Maceió-AL): correlação entre contaminação ambiental e qualidade da saúde humana*, recebi do Sr. Josué Carinhonha Caldas Santos, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

Que o estudo se destina a obtenção de amostras biológicas (sangue e urina) referentes à população que reside em torno do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM) do município de Maceió-AL para avaliação de contaminante inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) e biomarcadores do estresse oxidativo.

Que a importância deste estudo é a de gerar informações sobre a possível contaminação da população residente ou que trabalha no CELMM (Maceió-AL), sua relação com doenças relacionadas ao estresse oxidativo que estas espécies inorgânicas podem causar em função da exposição ambiental.

Que os resultados que se desejam alcançar são a concentração de contaminante inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) e de biomarcadores do estresse oxidativo nas amostras de sangue e urina, a fim de estabelecer uma relação entre estes parâmetros com o desenvolvimento de patologias e contaminação ambiental.

Que esse estudo começará em novembro/2016 e terminará em novembro/2019, considerando as oficinas informativas como primeira atividade relacionada a este projeto junto a comunidade.

Que o estudo será feito da seguinte inicialmente com ciclo de oficinas com palestras informativas visando o levantamento de possíveis voluntários, em seguida, serão realizadas a coleta das amostras de sangue e urina segundo práticas já estabelecidas, assim como, a aplicação de questionário epidemiológico. De posse das amostras e dos dados epidemiológicos serão realizadas as medidas laboratoriais baseadas em protocolos consolidados para quantificação de Hg, As, Se, Cd, Pb e produção de espécies reativas de oxigênio, glutatona reduzida e oxidada, superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, desidratase gama-aminolevulinato e 8-isoprostano. Por fim, estes dados serão avaliados com rigor estatístico sendo gerados relatórios, resumo e artigos com intuito de divulgar para sociedade os resultados obtidos. As amostras de sangue e urina coletadas podem ser utilizadas para medição de outros parâmetros químicos e bioquímicos que forem necessários para um melhor entendimento das hipóteses do projeto.

Que eu participarei das seguintes etapas: i) responder as questões específicas do estudo contidas no questionário epidemiológico de avaliação, ii) permitir medidas de peso e altura para calcular o índice de massa corpórea, e iii) fornecer amostras de sangue e urina.

Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: possíveis desconfortos durante a coleta de sangue (punção venosa).

Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental seriam possivelmente durante a coleta de sangue, na qual podem ocorrer dor, hematomas, acidente com perfurocortantes, punção acidental de

uma artéria e lesão nervosa. Contudo, este procedimento será realizado por profissional da saúde com experiência e segundo as boas práticas individuais que seguem tal procedimento visando eliminar tais riscos.

Que deverei contar com a assistência de profissionais da saúde com experiência comprovada, sendo responsáveis pela coleta das amostras de sangue.

Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são obtenção de resultados relacionados com contaminantes inorgânicos e biomarcadores do estresse oxidativo e a influência da contaminação ambiental quanto ao estado de saúde da população em estudo.

Que a minha participação será acompanhada por profissionais da saúde para recolhimento das amostras de sangue e coordenador do projeto para esclarecimento sobre eventuais dúvidas que possam surgir durante a realização da pesquisa.

Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.

Que eu serei informado sobre o resultado final da pesquisa.

Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.

Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

O estudo não acarretará nenhuma despesa para o participante da pesquisa.

Que eu serei indenizado por qualquer dano que venha a sofrer com a participação na pesquisa.

Que eu receberei uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) participante-voluntári(o,a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a).

Domicílio: (rua, praça, conjunto)

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):

Nome: Josué Carinhonha Caldas Santos

Endereço: Rua Prof. Vital Barbosa, 1207.

Complemento: Ed. Key West, Ap. 402

Bairro: Ponta Verde, CEP 57035-400, Maceió-AL

Telefones para contato: (82) 99660-1688 ou (82) 3214-1347

Instituição: Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas

Prédio da Reitoria, 1º Andar, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária

Telefone: 3214-1041, Maceió-AL

Maceió,

Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntário(o,a) ou responsável legal e rubricar as demais folhas	Josué Carinhonha Caldas Santos <i>Responsável pelo estudo</i>

Anexo B – Questionário Epidemiológico

Projeto: Avaliação da exposição a contaminantes inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) no ambiente e parâmetros bioquímicos associados ao estresse oxidativo da população circunvizinha ao Complexo Lagunar Mundaú-Manguaba (Maceió-AL); correlação entre contaminação ambiental e qualidade da saúde humana.
Chamada FAPEAL 06/2016-PPSUS, Programa Pesquisa para o SUS: Gestão compartilhada em Saúde.

Questionário epidemiológico

Dados pessoais		
1. Nome: Código de identificação: exemplo, M01 (mulher) ou H01 (homem)		
2. Sexo:	<input type="checkbox"/> Homem	<input type="checkbox"/> Mulher
3. Idade:	4. Altura:	5. Cor:
6. Índice de massa corpórea (IMC):		
7. Escolaridade (número de anos que estudou):		
8. Pescador:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
9. Fumante:	<input type="checkbox"/> Sim	Frequência (número de cigarros por dia/semana):
	<input type="checkbox"/> Não	
10. Consome bebida alcoólica:	<input type="checkbox"/> Sim	Frequência (número de dias por semana):
	<input type="checkbox"/> Não	
11. Histórico de doenças:		
<input type="checkbox"/> Diabetes	<input type="checkbox"/> Hipertensão	<input type="checkbox"/> Câncer
<input type="checkbox"/> Cardiopatia	<input type="checkbox"/> Outra:	
Exposição ao ambiente		
12. Tipo de contato com a água do CELMM (Maceió - AL):		
<input type="checkbox"/> banho	<input type="checkbox"/> cozinhar	<input type="checkbox"/> pescar
<input type="checkbox"/> beber	<input type="checkbox"/> lavar roupa	<input type="checkbox"/> limpeza da casa
<input type="checkbox"/> lavar prato	<input type="checkbox"/> Outros:	
<input type="checkbox"/> não tenho contato		
13. Frequência de contato com a água do CELMM (Maceió - AL):		
<input type="checkbox"/> diário	<input type="checkbox"/> 5-3 vezes na semana	<input type="checkbox"/> 1-2 vezes na semana
14. Come sururu pescado no CELMM (Maceió - AL):		
<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
15. Frequência que come sururu pescado do CELMM (Maceió - AL):		
<input type="checkbox"/> diário	<input type="checkbox"/> 5-3 vezes na semana	<input type="checkbox"/> 1-2 vezes na semana
16. Massa aproximada que consome sururu pescado do CELMM (Maceió - AL):		
<input type="checkbox"/> > 500 g	<input type="checkbox"/> 100-500 g	<input type="checkbox"/> < 100 g

Maceió ____ / ____ / ____

Declaro que estou de acordo com as informações fornecidas acima em função da minha anuência registrada pelo termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e que as mesmas são verdadeiras.

Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a)

Nome e assinatura do(s) responsável(is) pelo estudo



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>



Toxicity of thimerosal in biological systems: Conformational changes in human hemoglobin, decrease of oxygen binding capacity, increase of protein glycation and amyloid's formation



Marina de Magalhães Silva^a, Maria Dayanne de Araújo Dantas^a, **Reginaldo Correia da Silva Filho^a**, Marcos Vinicius dos Santos Sales^a, Jadriane de Almeida Xavier^a, Ana Catarina Rezende Leite^a, Marília Oliveira Fonseca Goulart^a, Luciano Aparecido Meireles Grillo^b, Wellington Alves de Barros^c, Ângelo de Fátima^c, Isis Martins Figueiredo^a, Josué Carinhonha Caldas Santos^{a,*}

^a Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas (UFAL), Campus A.C. Simões, 57072-900 Maceió, Alagoas, Brazil

^b Pharmacy Institute, Federal University of Alagoas (UFAL), Campus A.C. Simões, 57072-900 Maceió, Alagoas, Brazil

^c Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais (UFMG), 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2019

Received in revised form 11 February 2020

Accepted 16 March 2020

Available online 19 March 2020

Keywords:

Red cells and human erythrocytes

Advanced glycation end products

Vaccines and cosmetics

ABSTRACT

Thimerosal (TH), an organomercurial compound, is used as a preservative in vaccines and cosmetics. Its interaction with human hemoglobin (Hb) was investigated under physiological conditions using biophysical and biological assays, aiming to evaluate hazardous effects. TH interacts spontaneously with Hb (stoichiometry 2:1, ligand-protein), preferably by electrostatic forces, with a binding constant of $1.41 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Spectroscopic data allows to proposing that TH induces structural changes in Hg, through ethylmercury transfer to human Hb-Cys93 residues, forming thiosalicylic acid, which, in turn, interacts with the positive side of the amino acid in the Hb-HgEt adduct chain. As a consequence, inhibition of Hb-O₂ binding capacity up to 72% (human Hb), and 50% (human erythrocytes), was verified. Dose-dependent induction of TH forming advanced glycation end products (AGE) and protein aggregates (amyloids) was additionally observed. Finally, these results highlight the toxic potential of the use of TH in biological systems, with a consequent risk to human health.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Thimerosal (TH) is an organic compound that presents about 49.6% of mercury in mass. This organomercurial compound is currently used as a preservative in cosmetics, toiletries, antiseptic sprays. Due to its wide range of bactericidal and fungicidal activities, it has been widely used as a preservative in vaccines [1]. Although the World Health Organization [2] indicates that ethylmercury (TH) used as a preservative in vaccines does not pose any health risk, several studies have questioned its toxicity. For instance, studies have shown that the administration of TH leads to neurotoxic and behavioral effects in animal models [3,4] and oxidative stress and cytotoxicity in human cell lines [5]. Additionally, Chen et al. [6] have demonstrated that TH produces a significant reduction in immunogenicity in certain vaccines due to the thiol group blockade. Table S1 (Supplementary material) presents a compilation of studies that have evaluated the toxic effect of TH in different biological systems.

The toxic potential of TH may be related to its degradation products in a biological medium, thiosalicylic acid (ATS) and ethylmercury (EtHg⁺), which presents *in vitro* toxicity comparable to methylmercury [7]. The deleterious *in vivo* effects of these mercury species result from their high affinity for thiol groups present in various biomolecules, such as peptides and proteins [8], which causes structural changes or alters some biological activities [9].

The interaction of mercury species with thiol groups present in biomolecules plays an essential role in mercury transport as well as in its toxicity mechanisms. Trümpler et al. [10] evaluated the interaction of TH with free thiol groups from β -lactalbumin and bovine serum albumin (BSA) using LC/ICP-MS, confirming the formation of EtHg-protein adducts. Shen et al. [11] and Chunmei et al. [12], using molecular spectroscopic techniques, reported changes in the secondary structure of BSA after interaction with Hg(II), which may be responsible for *in vivo* inorganic mercury toxicity.

However, there is still limited information regarding affinity and conformational mercury species-induced changes in proteins, and their consequent lost or decreased functionality. Thus, it is urgently required to conducting studies that evaluate the interaction process of potentially mercury species under physiological conditions, seeking to

* Corresponding author.

E-mail address: josue@iqb.ufal.br (J.C.C. Santos).



Role of Modulation of Hippocampal Glucose Following Pilocarpine-Induced Status Epilepticus

Igor Santana de Melo¹ · Yngrid Mickaelli Oliveira dos Santos¹ · Amanda Larissa Dias Pacheco¹ · Maisa Araújo Costa¹ · Vanessa de Oliveira Silva¹ · Jucilene Freitas-Santos¹ · Cibelle de Melo Bastos Cavalcante¹ · Reginaldo Correia Silva-Filho² · Ana Catarina Rezende Leite² · Daniel Góes Leite¹ · Marcelo Duzzioni¹ · Robinson Sabino-Silva^{1,3} · Alexandre Urban Borbely¹ · Olagide Wagner de Castro¹

Received: 9 August 2020 / Accepted: 14 October 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Status epilepticus (SE) is defined as continuous and self-sustaining seizures, which trigger hippocampal neurodegeneration, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and energy failure. During SE, the neurons become overexcited, increasing energy consumption. Glucose uptake is increased via the sodium glucose cotransporter 1 (SGLT1) in the hippocampus under epileptic conditions. In addition, modulation of glucose can prevent neuronal damage caused by SE. Here, we evaluated the effect of increased glucose availability in behavior of limbic seizures, memory dysfunction, neurodegeneration process, neuronal activity, and SGLT1 expression. Vehicle (VEH, saline 0.9%, 1 μ L) or glucose (GLU; 1, 2 or 3 mM, 1 μ L) were administered into hippocampus of male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) before or after pilocarpine to induce SE. Behavioral analysis of seizures was performed for 90 min during SE. The memory and learning processes were analyzed by the inhibitory avoidance test. After 24 h of SE, neurodegeneration process, neuronal activity, and SGLT1 expression were evaluated in hippocampal and extrahippocampal regions. Modulation of hippocampal glucose did not protect memory dysfunction followed by SE. Our results showed that the administration of glucose after pilocarpine reduced the severity of seizures, as well as the number of limbic seizures. Similarly, glucose after SE reduced cell death and neuronal activity in hippocampus, *subiculum*, thalamus, amygdala, and cortical areas. Finally, glucose infusion elevated the SGLT1 expression in hippocampus. Taken together our data suggest that possibly the administration of intrahippocampal glucose protects brain in the earlier stage of epileptogenic processes via an important support of SGLT1.

Keywords Sodium glucose cotransporter · Epileptogenic · Glucose · Hippocampus

Introduction

Status epilepticus (SE) is defined as continuous and self-sustaining seizures lasting > 30 min, reaching a significant number of patients [1–4]. Because it is an epileptogenic insult,

SE is capable of leading to temporal lobe epilepsy (TLE) and promoting severe damage to the central nervous system (CNS), such as activation of a recurrent excitatory circuit, neurodegeneration, aberrant neurogenesis, and mossy fiber sprouting [5–7]. Despite treatment with AEDs, about 30% of patients may be refractory to standard drugs, experiencing frequent and lasting seizures capable of promoting brain damage [8–10].

Putative neuroprotective substances have been increasingly identified using animal models of seizures. Intrahippocampal administration of pilocarpine has typically been used to induce TLE in rodents, mimicking epileptic seizures in humans, which initiate as focal and then evolve to generalized [11–13]. After the infusion of H-PILO, the animal behavior is altered, presenting wet dog shake (WDS), forelimb myoclonus, rearing, and falling [14–16]. As a consequence of PILO-induced SE, especially after 24 h, selective cell death occurs in DG hilus, CA3 and CA1 hippocampal subareas, as

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02173-0>.

✉ Olagide Wagner de Castro
olagidewww@gmail.com

¹ Department of Physiology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, AL, Brazil

² Bioenergetics Laboratory, Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, AL, Brazil

³ Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil