



Paula Cristina Guerreiro Nobre

Licenciatura Química Aplicada

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DE UM
QUELANTE MACROCÍCLICO NA RECUPERAÇÃO
DA ATIVIDADE DO SISTEMA DA TIORREDOXINA
INIBIDO POR COMPOSTOS DE MERCÚRIO**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Vasco Branco, Investigador, FFUL

Co-orientador: Margarida Castro Caldas, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Júri

Presidente: Prof. Doutora Paula Maria Theriaga Mendes Bernardo
Gonçalves

Arguente: Prof. Doutor Nuno Filipe da Rocha Guerreiro de Oliveira

Vogal: Prof. Doutor Vasco Rui Veloso Neves Branco



Dezembro 2020



Paula Cristina Guerreiro Nobre

Licenciatura Química Aplicada

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DE UM
QUELANTE MACROCÍCLICO NA RECUPERAÇÃO
DA ATIVIDADE DO SISTEMA DA TIORREDOXINA
INIBIDO POR COMPOSTOS DE MERCÚRIO**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Vasco Branco, Investigador, FFUL

Co-orientador: Margarida Castro Caldas, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Júri

Presidente: Prof. Doutora Paula Maria Theriaga Mendes Bernardo
Gonçalves

Arguente: Prof. Doutor Nuno Filipe da Rocha Guerreiro de Oliveira

Vogal: Prof. Doutor Vasco Rui Veloso Neves Branco



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro 2020

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DE UM QUELANTE MACROCICLICO NA RECUPERAÇÃO DA ATIVIDADE DO SISTEMA DA TIORREDOXINA INIBIDO POR COMPOSTOS DE MERCÚRIO

Copyrigh Paula Cristina Guerreiro Nobre, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Na tomada de decisão na minha vida para conclusão de um segundo ciclo de estudos superiores, não pensei que fosse tão trabalhosa a realização deste projeto, e para o qual contribuíram de sobremaneira algumas pessoas às quais estou agradecida.

Assim, quero expressar publicamente o meu agradecimento ao professor doutor Vasco Branco, pela sua partilha de conhecimento, dedicação, disponibilidade e incentivo, que foram sempre uma constante ao longo destes dois anos;

À professora doutora Margarida Castro Caldas pelas suas sugestões na elaboração da escrita da tese;

À professora doutora Fátima Cabral e professora doutora Judite Costa por facultarem o composto químico 1-tia-4,7,10,13-tetraazaciclopentadecano;

Aos meus colegas de laboratório pela ajuda na realização de algumas tarefas com as quais eu não estava familiarizada;

À minha colega e amiga Ana Margarida Madureira pelos conselhos e incentivo na escrita da dissertação;

Às minha filhas pela criação de condições em ambiente familiar que me permitiram trabalhar com tranquilidade;

E por fim à minha entidade patronal, a Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, na altura sob representação da professora doutora Matilde Castro, que me permitiu ter um horário laboral flexível e a utilização da estrutura da faculdade para realização do trabalho.

RESUMO

O mercúrio é um dos mais relevantes poluentes ambientais, especialmente sob a forma molecular de metilmercúrio (MeHg) que é um composto altamente neurotóxico ao qual as populações humanas estão expostas por via do consumo de peixe. Uma vez nas células, o MeHg liga-se ativamente a tióis e selenóis, interferindo com a atividade das enzimas redox, como a tiorredoxina (Trx) e a selenoenzima tiorredoxina redutase (TrxR), que integram o sistema da tiorredoxina, tendo-se demonstrado que a inibição desse sistema pelo MeHg é uma etapa crítica no desenrolar da morte celular. As abordagens clínicas atuais para mitigar a toxicidade do MeHg dependem do uso de quelantes, como o ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), que substituiu amplamente o 2,3 dimercaptopropan-1-ol (BAL). No entanto, a eficácia terapêutica é limitada e, portanto, novas opções terapêuticas são necessárias. Neste trabalho, avaliamos a eficácia de um quelante macrocíclico, o 1-tia-4,7,10,13-tetraazaciclopentadecano ([15]anoN₄S), na prevenção da toxicidade do etilmercúrio (EtHg), cloreto de mercúrio (II) (HgCl₂) e do MeHg, nomeadamente observando os efeitos sobre o sistema da tiorredoxina, usando soluções enzimáticas purificadas e em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Os resultados mostram que o [15]anoN₄S teve uma eficácia semelhante ao DMSA e ao BAL em reverter a inibição do mercúrio sobre TrxR e Trx purificadas. Nas experiências com células, nenhum dos agentes quelantes conseguiu reverter a inibição do TrxR pelo MeHg, o que corrobora a alta afinidade do MeHg ao selenol no local ativo da TrxR. Contudo, o [15]anoN₄S e BAL, ao contrário do DMSA, preveniram a inibição da Trx, o que permite a manutenção das funções a jusante. De assinalar que o [15]anoN₄S apresentou um menor efeito sobre a viabilidade das células SH-SY5Y que o BAL no ensaio do MTT. Os resultados obtidos destacam o potencial do uso do quelante [15]anoN₄S como opção mais segura e eficaz no tratamento de intoxicações com MeHg e encorajam a realização estudos *in vivo* para validação destes resultados.

Palavras chave: mercúrio; quelantes; tiorredoxina redutase; tiorredoxina; toxicologia clínica

ABSTRACT

Mercury is one of the most relevant environmental pollutants, especially in the molecular form of methylmercury, which is a highly neurotoxic compound to which human populations are exposed through the consumption of fish. Once in cells, MeHg binds actively to thiols and selenols, interfering with the activity of redox enzymes, such as thioredoxin (Trx) and the selenoenzyme thioredoxin reductase (TrxR), which are part of the thioredoxin system. It has been shown that inhibition of this system by MeHg is a critical step in the unfolding of cell death. Current clinical approaches to mitigate the toxicity of MeHg depend on the use of chelators, such as meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA), which largely replaced British anti-Lewisite (BAL). However, the therapeutic efficacy is limited and therefore new therapeutic options are needed. In this work we evaluated the effectiveness of a macrocyclic chelator, 1-thia-4,7,10,13-tetraazacyclopentadecane ([15]aneN₄S), in preventing the toxicity of ethylmercury (EtHg), mercury chloride (II) (HgCl₂) and MeHg, namely observing the effects on the thioredoxin system, using purified enzyme solutions and with human neuroblastoma cells (SH-SY5Y). The results showed that [15]aneN₄S had a similar efficacy to DMSA and BAL in reversing the inhibition of mercury over purified TrxR and Trx. In experiments with cells, none of the chelating agents could reverse the inhibition of TrxR by MeHg, which corroborates the high affinity of MeHg to the selenol in TrxR active site. However, [15]aneN₄S and BAL, unlike DMSA, could prevent inhibition of Trx, which allows the maintenance of downstream functions. Most importantly, [15]aneN₄S did not produce a significant effect over cellular viability as BAL, as measured by the MTT assay. Overall these findings highlight the potential of using [15]aneN₄S as a safer and effective option in the treatment of MeHg poisoning and encourage further validation studies, namely *in vivo*.

Key words: mercury; chelators; thioredoxin reductase; thioredoxin; clinical toxicology

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Introdução Geral	1
1.2 Ciclo Biogeoquímico do Mercúrio.....	2
1.3 Exposição aos compostos de mercúrio	4
1.3.1 Exposição a Vapor de Mercúrio (Hg ⁰)	6
1.3.2 Exposição a Metilmercúrio (MeHg)	7
1.3.3 Exposição a Etilmercúrio (EtHg)	7
1.4 Toxicocinética e efeitos tóxicos do mercúrio.....	8
1.4.1 Toxicocinética	8
1.4.2 Efeitos na saúde	11
1.5 O Sistema Tiorredoxina.....	12
1.5.1 Tiorredoxina (Trx)	14
1.5.2 Tiorredoxina redutase (TrxR)	15
1.5.3 Mecanismo de ação do sistema tiorredoxina	16
1.5.4 Interação do mercúrio com o sistema tiorredoxina.....	17
1.6 Terapêutica Clínica.....	18
1.6.1 BAL (2,3 dimercaptopropan-1-ol).....	20
1.6.2 DMSA (ácido meso-dimercaptosuccínico) e DMPS (2,3-dimercapto-1-ácido propanossulfónico).....	21
1.7 Composto macrocíclico [15]anoN ₄ S.....	21
2. OBJECTIVO	23
3. MÉTODOS E REAGENTES	24
3.1 Reagentes	24
3.2 Determinação da Atividade da TrxR pelo ensaio de redução do DTNB.....	25
3.2.1. Princípio do ensaio	25
3.2.2. Curvas de inibição da TrxR pelos compostos de Hg.....	25
3.2.3. Recuperação da actividade da TrxR pelos compostos quelantes.....	26
3.3 Determinação da Atividade do Sistema da tiorredoxina pelo ensaio de redução da Insulina.....	28
3.3.1. Princípio do ensaio	28
3.3.2. Metodologia do Ensaio.....	28
3.4 Cultura Celular	28
3.5 Ensaio de viabilidade celular	29
3.6. Preparação de lisados celulares	30

3.7	Quantificação do Total de proteínas solúveis	31
3.8	Determinação da actividade da TrxR e Trx em lisados celulares	31
3.9	Avaliação da expressão proteica da TrxR e Trx	32
3.4	Tratamento Estatístico dos Resultados	33
4.	RESULTADOS	34
4.1	Determinação da Atividade da TrxR pelo ensaio de redução do DTNB.....	34
4.1.1	Curvas de inibição da TrxR pelos compostos de Hg.....	34
4.1.2	Recuperação da actividade da TrxR pelos compostos quelantes	34
4.2	Determinação da Atividade do Sistema da tiorredoxina pelo ensaio de redução da Insulina.....	37
4.3	Ensaio de viabilidade celular	38
4.4	Determinação da actividade da TrxR e Trx em lisados celulares	39
4.5	Avaliação da expressão proteica da TrxR e Trx	40
5.	DISCUSSÃO	41
6.	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
Figura 1.1 - Ciclo do Mercúrio.	3
Figura 1.2 – Concentração de mercúrio na biosfera.	4
Figura 1.3 – Alguns dos estudos mais representativos sobre a relação entre fonte de mercúrio e exposição.	5
Figura 1.4 – Trabalhadores na Tanzânia misturando manualmente mercúrio com sedimentos dragados do leito do rio ou de terra escavada, para provocar a amálgama com pequenas partículas de ouro que posteriormente é separada da lama.	6
Figura 1.5 – Absorção de MeHg. O complexo Cys-S-HgMe pode entrar na célula através do polipeptídeo transportador de iões orgânicos (OATP). As reações de troca -SH podem ocorrer com GSH e/ ou outras moléculas de baixo peso molecular (LMM)-SH e alto peso molecular (HMM)-S(e)H. O GSH-S-HgMe pode ser metabolizado a dipeptídeo cisteinilglicina (GlyCys), pela enzima γ -glutamiltansferase (GGT), o grupo MeHg continua ligado à fração tiol da Cys, que pode ser ainda mais degradada para produzir Cys-S-HgMe. Os complexos LMM-S-HgMe (GSH-S-HgMe e/ ou Cys-S-HgMe) podem atingir a corrente sanguínea através de transportadores.	9
Figura 1.6 – Fluxo dos elétrões desde o NADPH até à oxidação da proteína. Trx- tiorredoxina; TrxR tiorredoxina redutase.	13
Figura 1.7 – Estrutura da Trx1 humana.	15
Figura 1.8 – Estrutura da TrxR1 reduzida, com o grupo selenol tiol (C497+U498) no terminal C, e o terminal N com os ditiois (C59+C64).	16
Figura 1.9 – Fluxo dos elétrões desde o NADPH até ao sítio ativo da TrxR.	16
Figura 1.10 – Possível mecanismo envolvendo inativação de uma proteína contendo um grupo selenol pelo MeHg, e ação de um agente quelante. O MeHg poderá causar uma alteração da conformação da proteína não sendo possível a ligação ao agente quelante.	18
Figura 1.11 – Estruturas químicas do quelante macrocíclico em estudo, DMSA e BAL.	22
Figura 1.12 – Representação da síntese e estrutura do quelante macrocíclico [15]anoN ₄ S.	22
Figura 3.1 – Imagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y aderidas a alta e baixa densidade.	29
Figura 3.2 – Placa ensaio 24h	30
Figura 3.3 – Membrana corada com Ponceau S; MeHg + N - MeHg com coexposição ao - [15]anoN ₄ S; N - [15]anoN ₄ S.	32
Figura 4.1 – Gráfico da atividade TrxR versus concentração de cloreto de mercúrio (a) etilmercúrio (b) e metilmercúrio (c). * * Diferença estatisticamente muito significativa para o grupo controlo (p<0,01).	35
Figura 4.2 – Recuperação da atividade TrxR quando exposta a Hg ₂ ⁺ (a), EtHg (b) e MeHg (c), em função dos quelantes em estudo. * Diferença estatisticamente significativa para o	36

grupo controle ($p < 0,05$); * * diferença estatisticamente muito significativa para o grupo controle ($p < 0,05$); # diferença estatisticamente significativa para o grupo EtHg/MeHg ($p < 0,05$)

Figura 4.3 – Recuperação da atividade da TrxR pelo método do DTNB (a) e do sistema da tiorredoxina pelo método da insulina (b) quando expostas a MeHg. * Diferença estatisticamente significativa para o controle ($p < 0,05$); # diferença estatisticamente significativa para o MeHg ($p < 0,05$). 37

Figura 4.4 - Alterações na capacidade de redução do MTT por células SH-SY5Y após exposição por 3h (a) e 24 horas (b) a diferentes concentrações de agentes quelantes. * Diferença estatisticamente significativa para o controle ($p < 0,05$); * * diferença estatisticamente muito significativa para o controle ($p < 0,01$). 38

Figura 4.5 – Recuperação da atividade da TrxR (a) e da Trx (b) em células SH-SY5Y, após 24h de exposição ao MeHg. * Diferença estatisticamente significativa para o controle ($p < 0,05$); # diferença estatisticamente significativa para a exposição ao MeHg ($p < 0,05$). 39

Figura 4.6 - Expressão de TrxR e Trx em células SH-SY5Y expostas a MeHg e/ ou agentes quelantes por 24 h. As imagens de Western blot são representativas de três experiências independentes (a). A intensidade da banda para TrxR (b) e Trx (c) foi quantificada em todas as repetições, normalizada para a expressão de GAPDH. * Diferença estatisticamente significativa para o controle ($p < 0,05$). [C - Controle; M - MeHg; M+N - MeHg com coexposição a [15]anoN₄S; N - [15]anoN₄S; M+B - MeHg com coexposição ao BAL; B - BAL; M+D - MeHg com coexposição a DMSA; D – DMSA. 40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabelas	Página
Tabela 1.1 - Quantidade de mercúrio emitido para a atmosfera por sector de atividade e em diferentes regiões do mundo, em 2015.	2
Tabela 1.2 – Função das tiorredoxinas em diferentes organismos.	13
Tabela 1.3 – Quelantes terapêuticos com relevância: respetivas formas de administração e LD ₅₀ .	20
Tabela 3.1 – Concentrações dos compostos de mercúrio.	26
Tabela 3.2 – Ensaios de avaliação da recuperação da atividade da TrxR – uso de quelantes	27

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS

- ASSGM** – *Artisanal and Small Scale Gold Mining*/ Mineração artesanal e em pequena escala de ouro
- BAL** – 2,3 dimercaptopropan-1-ol ou *British Anti-Lewisite*
- BHE** – Barreira Hematoencefálica
- CIS** - *Commonwealth of Independent States*/ Comunidade dos Estados Independentes
- Cys** - Cisteína
- DMPS** - Dimercapto-1-ácido propanossulfónico ou dimercaptopropano sulfonato
- DMSA** - Ácido meso-dimercaptosuccínico ou succímero
- EMA** – *European Medicines Agency*/ Agência Europeia de Medicamentos
- Eq.** - Equação
- EtHg** - Etilmercúrio
- EU/ EU 28** ou **UE** – *European Union* /União Europeia
- FAO** – *Food and Agriculture Organization*/ Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
- FFUL** – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
- GAPDH** - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- Grx** – Enzima glutarredoxina
- GSH** - Glutathiona
- HEPES** – Solução tampão de ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-il]-etanossulfónico
- IC₅₀** – *Half maximal Inhibitory Concentration*/ 50% da concentração inibitória máxima
- ILO** – *International Labor Organization*/ Organização Internacional do Trabalho
- LAT1** - *Large neutral Amino acid Transporter 1*
- LD₅₀** – *Median Lethal Dose*/ Dose Letal mediana
- MeHg** - Metilmercúrio
- MT** – Metalotioneínas
- PBS/ PBS-T** – Solução tampão fosfato salino/ Solução tampão fosfato salino com Tween 20
- RNR** - *Ribonucleotide Reductase* / Ribonucleotídeo redutase ou ribonucleosídeo difosfato redutase
- ROS** - *Reactive Oxygen Species*/ Espécies reativas de oxigénio
- SCOEL** - *Scientific Committee on Occupational Exposure Limits*/ Comité Científico em matéria de limites e Exposição Ocupacional
- Sec** - Selenocisteína
- SeH** – Grupo químico selenol
- SH** – Grupo químico tiol
- SNC** – Sistema Nervoso Central
- Trx** – Enzima tiorredoxina
- TrxR** – Enzima tiorredoxina redutase
- WHO** – *World Health Organization*/ Organização Mundial de Saúde

1. INTRODUÇÃO

1.1 Introdução Geral

O mercúrio é um metal tóxico que se encontra distribuído por todo o planeta, sendo um dos mais relevantes poluentes ambientais (1). O elemento Hg é introduzido na biosfera através de fontes naturais como a atividade vulcânica, erosão dos solos e depósitos geológicos ou volatilização a partir dos oceanos. São, contudo, as fontes antropogénicas as responsáveis pela maioria da poluição associada a este elemento (2).

Este metal tem vindo a ser utilizado desde há milhares de anos para os mais diversos fins. Foi utilizado no tempo dos Egípcios, Gregos e Romanos sob a forma de sulfureto de mercúrio (HgS ou cinabar), como cosmético e elemento decorativo. A partir da época medieval os sais de mercúrio começaram a ser utilizados para tratamento de várias doenças como a sífilis. Foi no séc. XVI que Paracelsus, médico renascentista suíço-alemão, constatou que “pouco poderia ser bom, mas em demasia poderia ser mortal” a propósito do uso deste metal como medicamento (3).

Ao longo dos tempos o mercúrio tem sido usado pelo homem na indústria e tem sido a causa de várias doenças graves resultantes da exposição a este elemento, como no caso do eretismo, acrodinia e síndrome de Minamata. A utilização de mercúrio na área farmacêutica foi uma constante até ao séc. XX, sendo ainda utilizado como conservante em algumas vacinas e como agente ligante em amálgamas dentárias.

Atualmente é utilizado principalmente na indústria, especialmente na fundição de metais, produção de cimento e produção de cloro/soda cáustica; e também na mineração de ouro de pequena escala (ASSGM) (2).

Como nunca é destruído, o Hg circula nos ecossistemas e deposita-se nos oceanos e solo, e apesar dos esforços para a diminuição da utilização de mercúrio, com o compromisso de vários países com a assinatura da Convenção de Minamata (4), prevê-se que os seus níveis se mantenham e a deposição de mercúrio nos oceanos continue devido à herança antropogénica dos últimos séculos (2).

O Hg não exerce qualquer função essencial para os humanos, sendo que existem três formas químicas relevantes para a exposição humana, o mercúrio elementar (Hg^0), mercúrio divalente (Hg^{2+}) e mercúrio orgânico, sob a forma de metil ou etil mercúrio (5). Como estes apresentam propriedades físico-químicas diferentes têm consequentemente diferentes perfis de toxicidade.

O Hg^0 é líquido à pressão atmosférica da superfície terrestre e à temperatura ambiente. Devido à sua elevada pressão de vapor facilmente se volatiliza. Na sua forma catiónica, normalmente denominada de “mercúrio inorgânico”, o Hg existe no estado sólido sob a forma de sais, podendo estes ser monovalentes (Hg_2^{2+}) ou divalentes (Hg^{2+}). Normalmente nestes compostos o mercúrio encontra-se quimicamente ligado a átomos de cloro, enxofre ou oxigénio, como por exemplo o cloreto de mercúrio (II) (HgCl_2). Na forma alquilada, comumente denominado de mercúrio “orgânico”, o átomo de mercúrio está ligado a um átomo de carbono, sendo o composto mais

comum o metilmercúrio (MeHg), embora o etilmercúrio (EtHg) também tenha relevância toxicológica.

Atualmente intoxicações agudas pelo mercúrio são raras, resultando principalmente de acidentes, porém no que respeita a intoxicações crônicas a Organização Mundial de Saúde (WHO) considera o mercúrio como um dos dez principais produtos químicos, ou grupos de produtos químicos, de grande preocupação para a saúde pública (6).

1.2 Ciclo Biogeoquímico do Mercúrio

Os compostos de mercúrio são emitidos para a atmosfera, águas e solos. Apesar de muitas destas emissões terem origem natural, a sua libertação atual para o meio tem sobretudo origem antropogénica devida às atividades de produção de energia pelo carvão, indústria, mineração artesanal e de pequena escala de ouro, e uso intencional de mercúrio, por exemplo como germicida ou em equipamentos de medição (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Quantidade de mercúrio emitido para a atmosfera por sector de atividade e em diferentes regiões do mundo, em 2015, adaptado de (2).

	Grupo sectorial (emissões/ ton)				Total por região (intervalo/ ton)	% do global
	Combustível	Indústria	Uso intencional	ASSGM		
Austrália, Nova Zelândia e Oceânia	3,57	4,07	1,15	0,0	8,79 (6,93-13,7)	0,4
América Central e Caraíbas	5,69	19,1	6,71	14,3	45,8 (37,2-61,4)	2,1
CIS e outros países europeus	26,4	64,7	20,7	12,7	124 (105-170)	5,6
Este e Sudeste Asiático	229	307	10	214	859 (685-1430)	38,6
EU 28	46,5	22,0	8,64	0,0	77,2 (67,2-107)	3,5
Estados do Médio Oriente	11,4	29,0	12,1	0,225	52,8 (40,7-93,8)	2,4
África do Norte	1,36	12,6	6,89	0,0	20,9 (13,5-45,8)	0,9
América do Norte	27	7,63	5,77	0,0	40,4 (33,8-59,6)	1,8
América do Sul	8,25	47,3	13,5	340	409 (308-522)	18,4
Sul Asiático	125	59,1	37,2	4,5	225 (190-296)	10,1
África Subsariana	48,9	41,9	17,1	252	360 (276-445)	16,2
GLOBAL	533	614	239	838	2220 (2000-2820)	100,0

O relatório da *Global Mercury Assessment* 2013 estima que as atividades antropogénicas cumulativamente aumentaram a concentração do mercúrio atmosférico em 300-500% ao longo do

século XX e a quantidade de mercúrio existente nas águas superficiais (até 200m de profundidade) triplicou aproximadamente no mesmo período (2).

Como o mercúrio não é destruído dá origem a um ciclo, O Ciclo do Mercúrio (Figura 1.1). O mercúrio é libertado de fontes naturais (e.g. vulcanismo) ou antropogénicas (e.g. combustíveis fósseis) e existe na atmosfera na forma de Hg^0 . Após oxidação a Hg^{2+} , pode depositar-se no solo e águas por via da precipitação. Esta oxidação é relativamente lenta o que permite que o mercúrio elementar se difunda em toda a atmosfera e se disperse por todo o planeta (7). Nas massas de água pode ser reduzido novamente a Hg^0 e evaporado de novo para a atmosfera.

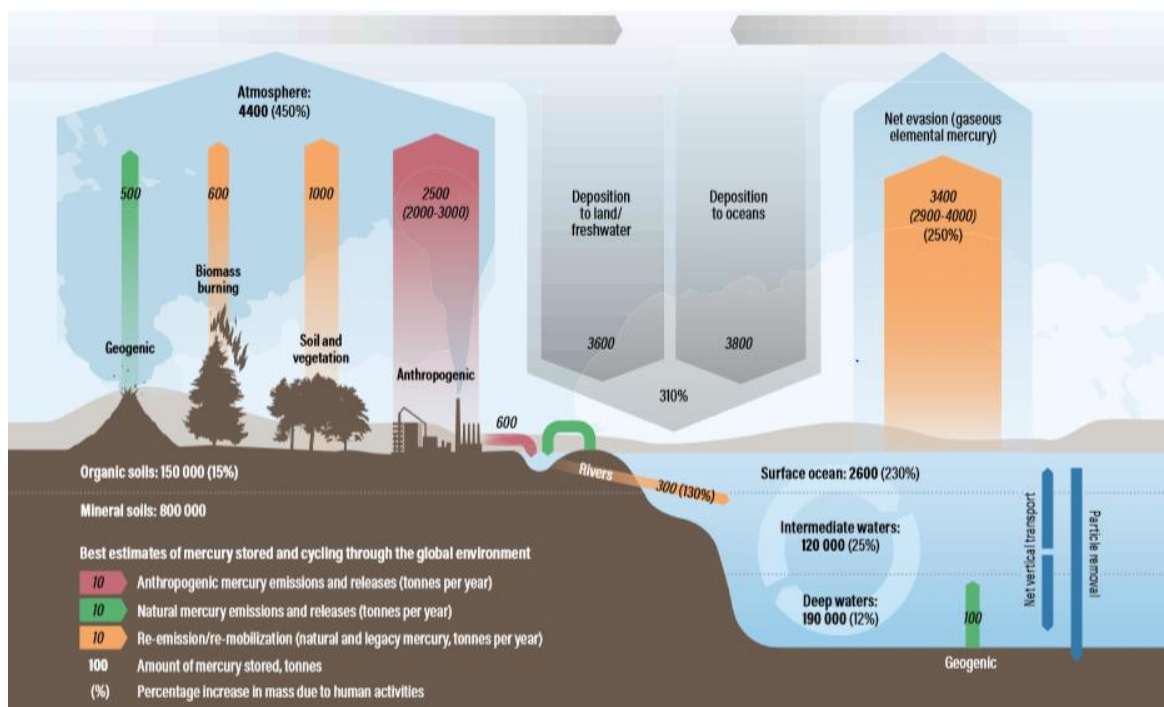


Figura 1.1 – Ciclo do Mercúrio, retirado de *Global Mercury Assessment 2018* (2).

Paralelamente o mercúrio pode ser incorporado pelas plantas, cujo solo e/ou a água de rega estejam contaminados, ou metilado por ação microbiana nos sedimentos e águas pobres em oxigénio de lagos e oceanos dando origem a metilmercúrio.

O mecanismo para a metilação do Hg é ainda incerto, embora maior parte da reação seja provavelmente impulsionada por processos microbianos (7). O MeHg é assimilado na base da cadeia trófica, nas bactérias e plâncton, e eficientemente transferido para os níveis tróficos seguintes. A cada passo da cadeia alimentar, a concentração de metilmercúrio nos tecidos dos organismos aumenta, ocorrendo uma bioamplificação da ordem de 10^9 desde o nível da água (ordem dos ppb) até ao que se encontra nos tecidos dos predadores de topo (ordem dos ppm) (8). Devido à grande afinidade que o Hg tem para o grupo tiol (SH), o MeHg liga-se aos resíduos de cisteína (Cys) fazendo com que a eliminação do organismo seja lenta, provocando uma bioacumulação ao longo do tempo de vida dos seres vivos. Devido à bioamplificação e bioacumulação, muitas espécies de animais marinhos que estejam no topo da cadeia trófica e tenham um tempo de vida longo, como tubarões, raias, atuns e espadartes, têm valores de metilmercúrio nos seus tecidos musculares muito elevados. Este facto é de especial importância

pois muitas destas espécies fazem parte da dieta das populações humanas o que conseqüentemente as torna vulneráveis à exposição a este metal. O teor em MeHg nos tecidos animais de peixes que habitam rios, lagos e oceanos, é frequentemente usado como bioindicador de contaminação por mercúrio no ecossistema (Figura. 1.2).

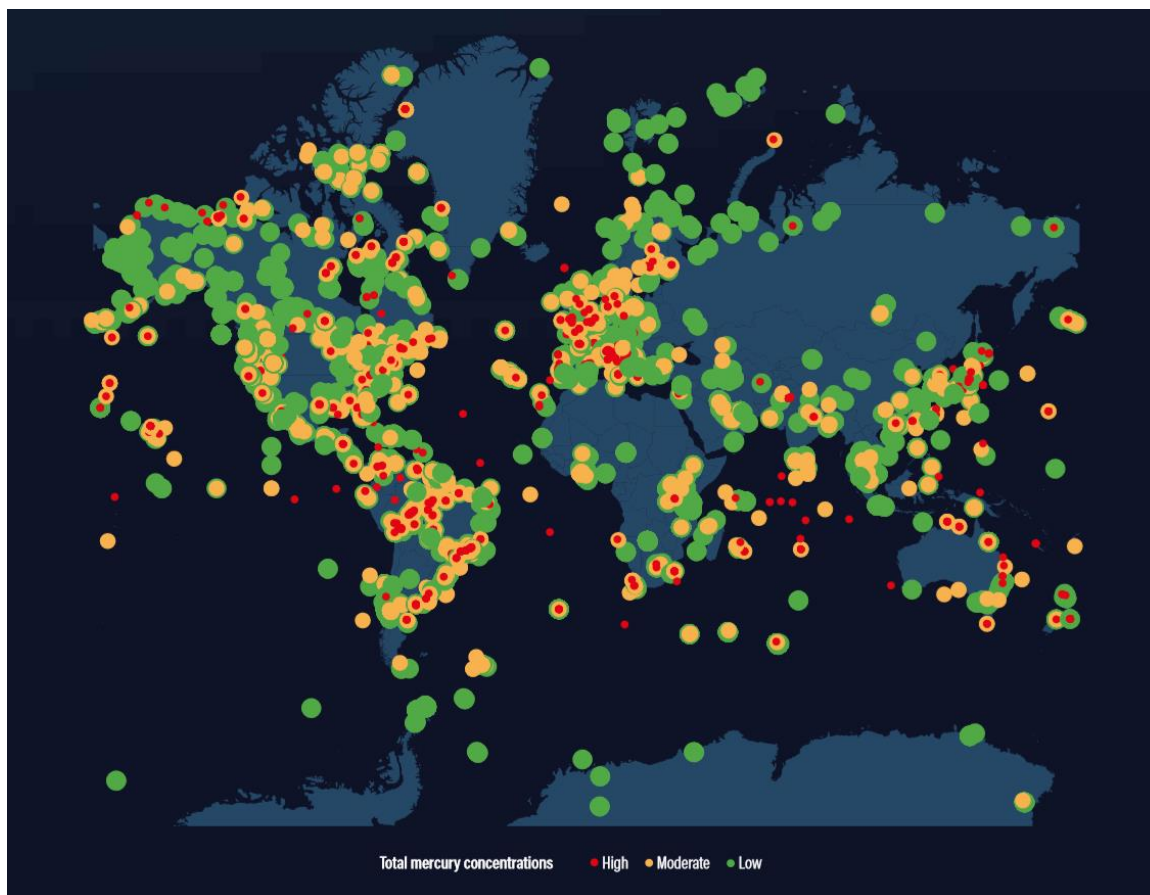


Figura 1.2 – Concentração de mercúrio na biosfera, retirado de *Global Mercury Assessment 2018* (2).

1.3 Exposição aos compostos de mercúrio

Todas as formas de mercúrio são tóxicas para os mamíferos, a extensão dos danos causados depende da forma química do mercúrio presente e do tempo e via de exposição.

Sob o ponto de vista da toxicidade o mercúrio elementar (Hg^0), o MeHg, o EtHg e o mercúrio divalente (Hg^{2+}) - na perspectiva de resultante da oxidação do Hg^0 ou desmetilação/desetilização dos compostos orgânicos - são os compostos de maior relevância toxicológica.

Normalmente são as diferentes formas de mercúrio que determinam a via de exposição, forma de absorção, distribuição e toxicidade nos órgãos alvo.

Nos últimos anos têm sido realizados vários estudos em populações por todo o mundo e todos evidenciam uma relação direta entre fonte/exposição (Figura. 1.3) (2).

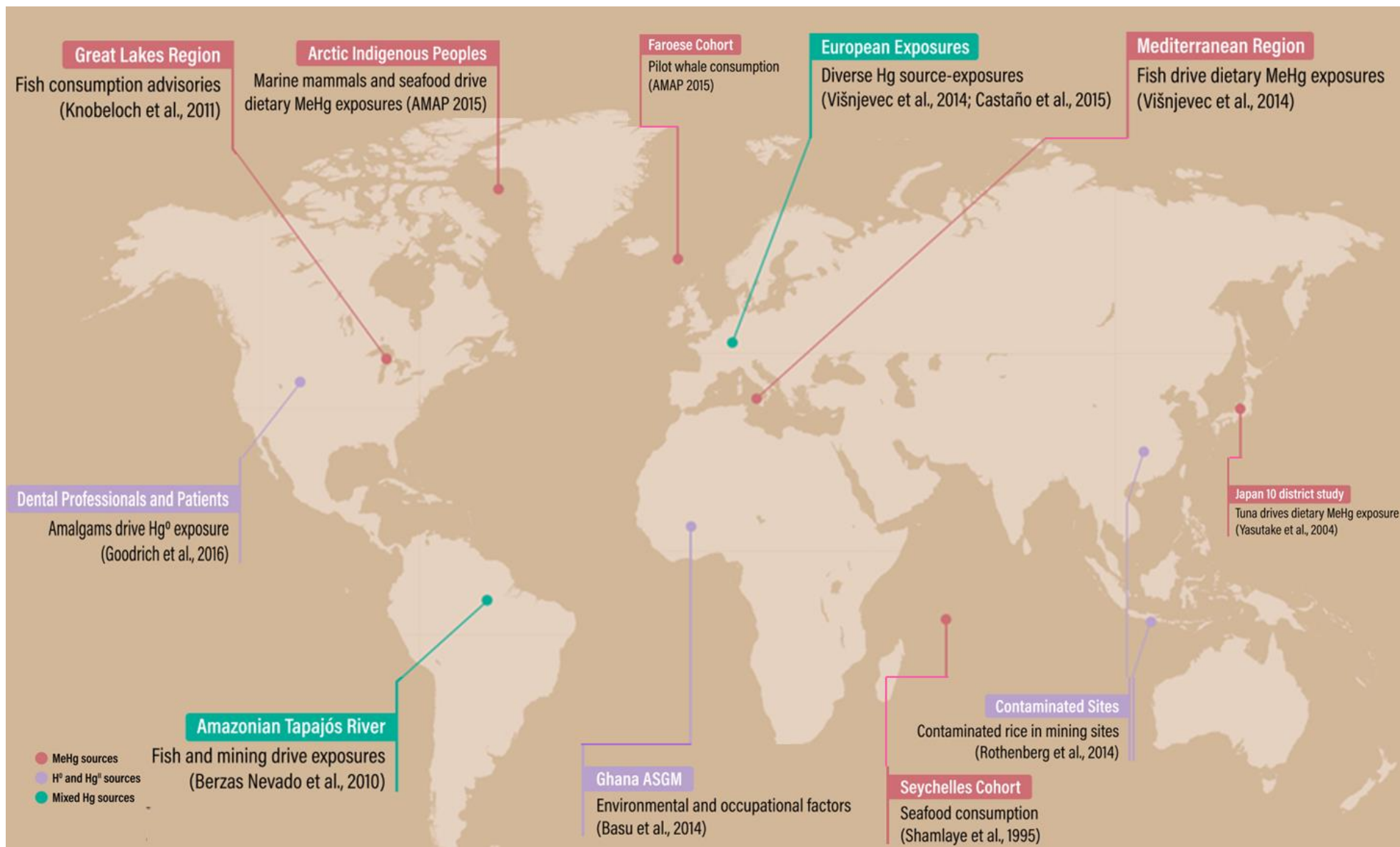


Figura 1.3 – Alguns dos estudos mais representativos sobre a relação entre fonte de mercúrio e exposição, retirado de *Global Mercury Assessment 2018* (2).

1.3.1 Exposição a Vapor de Mercúrio (Hg⁰)

A exposição a vapor de mercúrio da espécie humana sobrevem principalmente por inalação de mercúrio elementar (Hg⁰), o que ocorre principalmente por via ocupacional e/ou por libertação das amálgamas dentárias.

Para a população em geral a concentração de Hg⁰ no ar ambiente não é preocupante pois o valor médio é na ordem dos 2–20 ng/ m³ (9), muito abaixo do valor máximo recomendado para a exposição ocupacional.

Segundo o Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL), o limite máximo de exposição média é de 0,02 mg/ m³ durante 8 horas, o que corresponde a um dia de trabalho (10). Sobre a libertação de mercúrio das amálgamas dentárias, cuja formulação padrão contém cerca de 50% de mercúrio, e apesar de especialistas de toda a Europa, Estados Unidos, Canadá e Austrália concluírem que não há evidências científicas fortes para uma relação de exposição/efeito adverso para a saúde, ainda permanece um receio significativo entre a população em geral (11).

Ao nível ocupacional a mineração artesanal e em pequena escala de ouro é a atividade com risco para a exposição ao Hg⁰ que maior atenção tem atraído. Nesta ocupação, o ouro é extraído através de uma amálgama que é posteriormente aquecida e o Hg⁰ evaporado (Figura 1.4).



Figura 1.4 – Trabalhadores na Tanzânia misturando manualmente mercúrio com sedimentos dragados do leito do rio ou de terra escavada, para provocar a amálgama com pequenas partículas de ouro que posteriormente é separada da lama (12).

A ASSGM é uma importante atividade em muitos países em vias de desenvolvimento pois fornece uma fonte primária e adicional de rendimento, particularmente em regiões rurais onde as alternativas económicas para a agricultura são limitadas. A Organização Internacional do Trabalho (ILO) estima que existem 13 milhões de mineiros artesanais em 55 países (Tabela.1.1) (13).

1.3.2 Exposição a Metilmercúrio (MeHg)

Para a população em geral a ingestão de peixe, marisco e mamíferos marinhos é a principal via de exposição a MeHg.

Por essa razão, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO)/WHO identificou as populações que têm o peixe como fonte principal de proteína na sua dieta, como especialmente vulneráveis à exposição pelo metilmercúrio (14).

Em Portugal, o consumo de peixe é o mais elevado da União Europeia (EU) e o terceiro a nível mundial (15), pelo que o risco de exposição a MeHg é elevado. Com efeito, recentemente foi publicado um estudo sobre a avaliação de risco de mulheres grávidas na Ilha da Madeira, onde se concluiu que 30% das mulheres grávidas tinham um teor total de mercúrio no sangue superior ao recomendado pela WHO, devido à sua dieta com consumo de peixes predadores, e que os níveis de mercúrio total no cordão umbilical dos recém-nascidos eram 1,3 vezes superiores aos do sangue materno (16). Vários estudos anteriores haviam já apontado para esse risco em Portugal (17–19).

1.3.3 Exposição a Etilmercúrio (EtHg)

Uma fonte adicional de exposição teve início na década de 1930, quando o tiosalicilato de etilmercúrio, sob o nome comercial de timerosal, foi introduzido como conservante em muitas preparações medicinais e vacinas (20). Este produto é utilizado como conservante em vacinas multidoses devido às suas propriedades fungicida e bactericida. O composto ao ser metabolizado liberta etilmercúrio (EtHg).

No início do século XXI, fizeram-se alguns estudos que indicavam que a quantidade potencial de etilmercúrio que uma criança recebe nos primeiros tempos de vida, seguindo o quadro padrão de vacinação dos Estados Unidos, excedia os valores limites aconselhados para a ingestão de metilmercúrio por mulheres grávidas (0,1 µg/kg/dia) (21). Porém, o potencial tóxico dos compostos é diferente e conseqüentemente o MeHg não é uma referência adequada para avaliação de risco de exposição ao timerosal (22).

Comparativamente, e a título de exemplo, uma vacina poderá conter cerca de 50 µg de mercúrio, o que será o equivalente a uma refeição de 100g de peixe com MeHg (0,5 mg/kg).

A incerteza sobre o risco de utilização de vacinas preservadas com timerosal levou a que os países desenvolvidos eliminassem o composto das suas vacinas (23).

Contudo, face à falta de evidência científica forte quanto aos efeitos na saúde e à alteração logística e orçamental que a passagem de vacinas multidoses para unidoses implicaria em países em desenvolvimento, a WHO mantém como seguras as vacinas contendo timerosal (20). Assim, embora o timerosal não seja usado na maioria das vacinas nos países desenvolvidos, ainda o é em países em vias de desenvolvimento (11).

1.4 Toxicocinética e efeitos tóxicos do mercúrio

As propriedades toxicológicas das diferentes formas de mercúrio nos organismos resultam em grande parte das complexas interações de ligação que ocorrem entre os íons de mercúrio e várias proteínas e tióis no meio extracelular e intracelular.

1.4.1 Toxicocinética

MERCÚRIO ELEMENTAR

A absorção do mercúrio elementar ocorre maioritariamente por inalação. Devido à estrutura alveolar do pulmão, o ar entra em contato com uma grande área de superfície pulmonar que é separada dos capilares sanguíneos por membranas muito finas e que são irrigadas continuamente através da circulação pulmonar, a uma taxa de 0,5 dm³/minuto. Devido a este elevado fluxo, rapidamente os constituintes do ar difundem-se pelo corpo humano (24).

A absorção de Hg⁰ ocorre imediatamente após a exposição pois o vapor de mercúrio atravessa a membrana alveolar por difusão com quase 100% de biodisponibilidade (25).

O mercúrio elementar ao entrar na corrente sanguínea, uma parte é absorvida pelos glóbulos vermelhos, enquanto outra parte permanece no plasma. Nos glóbulos vermelhos o Hg⁰ é oxidado a Hg²⁺, esta reação demora alguns minutos, permitindo a circulação de mercúrio elementar pelo corpo o tempo suficiente para se difundir e chegar a todos os órgãos e tecidos. O Hg⁰ é lipossolúvel e não reativo, contudo uma vez dentro da célula pode sofrer oxidação a Hg²⁺ que é bastante reativo (20).

O maior reservatório de Hg²⁺ no corpo humano é o rim (24,26). Neste órgão, o mercúrio acumula-se na parte periférica do córtex renal, uma grande parte deste mercúrio encontra-se ligado a metalotioneínas (MT) (27,28).

O segundo maior reservatório de mercúrio no corpo está no fígado, com as maiores concentrações nas áreas periféricas. Outros órgãos ou células em que o Hg²⁺ tende a acumular-se são as membranas mucosas do trato intestinal e do epitélio da pele, o baço, as células intersticiais dos testículos (28).

Para além disso, o Hg⁰ atravessa duas barreiras críticas, a placenta e a barreira hematoencefálica (BHE), atingindo o feto em desenvolvimento e o sistema nervoso central (SNC) (28).

Estudos em ratos expostos ao Hg⁰ mostraram que a taxa de eliminação é muito mais lenta para o cérebro do que para outros órgãos, provavelmente devido à oxidação do vapor de mercúrio a Hg²⁺, pois este não atravessa a BHE resultando na sua acumulação no cérebro (29).

Apesar do mercúrio ser um metal tóxico, ele esteve presente ao longo da evolução no meio ambiente. Os organismos vivos desenvolveram a capacidade de destoxificar quantidades limitadas deste metal, a glutatona e as metalotioneínas são moléculas que podem neutralizar o íon mercúrico (Hg²⁺) e impedi-lo de perturbar os sistemas bioquímicos dinâmicos da célula. Ligado a essas moléculas, o mercúrio pode ser transportado, armazenado e eliminado do corpo (30).

O mercúrio é metabolizado no fígado e eliminado principalmente pelas fezes e urina. Estudos revelam que a excreção fecal é responsável pela maioria da eliminação nos primeiros dias após a

exposição, contudo, em exposições ocupacionais de longo prazo a excreção urinária torna-se dominante (20).

A taxa de excreção depende da dose e foram observadas diferenças consideráveis. Dados limitados de estudos humanos indicam que a maior parte do mercúrio acumulado no corpo é excretado com semi-vida biológica de aproximadamente 60 dias (28).

Parte do mercúrio acumulado no cérebro é eliminado lentamente com uma semi-vida biológica que pode atingir vários anos, este facto foi confirmado no cérebro humano em casos de exposição ocupacional ao mercúrio (28,31).

METILMERCÚRIO

O metilmercúrio é absorvido pela via gastrointestinal. A maioria do mercúrio em peixes está na forma de MeHg, tendo estudos em animais demonstrado que a taxa de absorção deste será de 90-100% (11,20,25). Estudos mais recentes indicam que a taxa de absorção pode ser menor dependendo da forma como o alimento é cozinhado (11).

O mercúrio, devido à sua estrutura eletrónica, apresenta uma grande afinidade para os grupos tiol (SH), sendo que raramente se apresentam num estado livre não ligado (32). No músculo dos peixes o metilmercúrio encontra-se ligado aos grupos tiol dos resíduos de cisteína (Cys) das proteínas (33).

Após ingestão, o complexo MeHg-Cys é absorvido no intestino eficazmente pois a sua estrutura é semelhante à do aminoácido metionina (Figura. 1.5) (8).

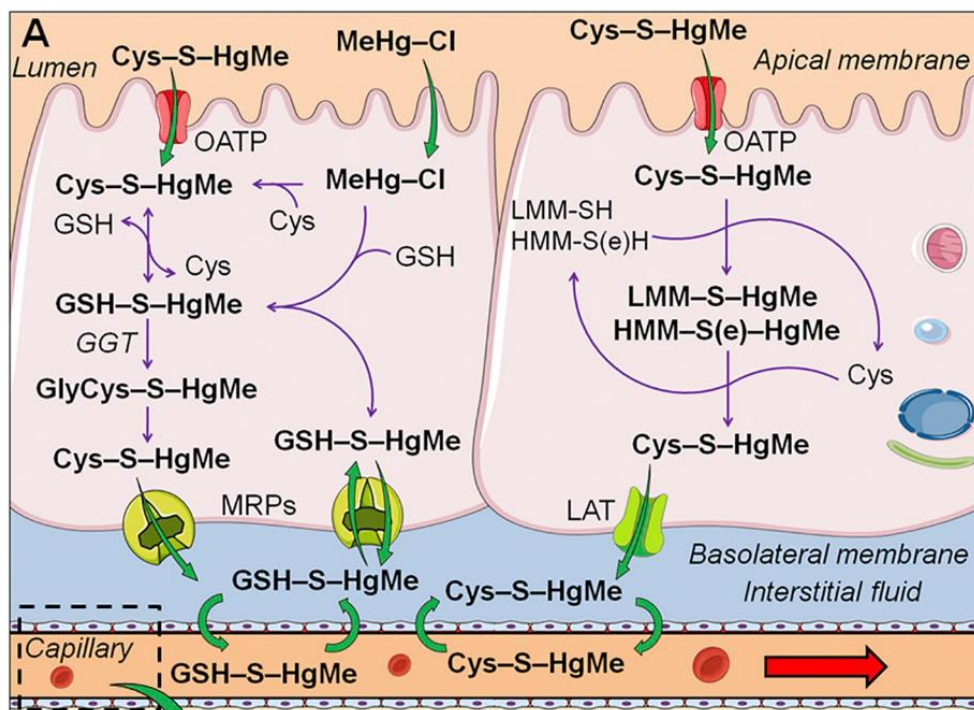


Figura 1.5 – Absorção de MeHg. O complexo Cys-S-HgMe pode entrar na célula através do polipeptídeo transportador de iões orgânicos (OATP). As reações de troca -SH podem ocorrer com GSH e/ ou outras moléculas de baixo peso molecular (LMM)-SH e alto peso molecular (HMM)-S(e)H. O GSH-S-HgMe pode ser metabolizado a dipeptídeo cisteinilglicina (GlyCys), pela enzima γ -glutamilttransferase (GGT), o grupo MeHg

continua ligado à fração tiol da Cys, que pode ser ainda mais degradada para produzir Cys-S-HgMe. Os complexos LMM-S-HgMe (GSH-S-HgMe e/ ou Cys-S-HgMe) podem atingir a corrente sanguínea através de transportadores (34).

Embora o MeHg, forme complexos estáveis com resíduos Cys, a ligação S-Hg é lábil, como consequência podem ocorrer reações de troca na presença de outros grupos -SH ou -SeH. Com efeito, o MeHg⁺ irá migrar da ligação sulfeto de mercúrio de um complexo proteína-S-HgMe para outro -SH livre conforme a composição do meio fisiológico (34).

A velocidade de reação de troca difere conforme o tipo de proteínas que contém o grupo tiol ou selenol, da sua estrutura e de fatores termodinâmicos.

No sangue, o MeHg é acumulado nos glóbulos vermelhos ligando-se aos resíduos de cisteína da molécula de hemoglobina (28).

A cinética do MeHg tem sido analisada em múltiplos estudos animais. Após a sua absorção o MeHg é distribuído de forma uniforme pelo organismo, atravessando a BHE e atingindo o sistema nervoso central - assim como a placenta. A sua difusão pelo corpo é devida ao mecanismo de mimetização da metionina (ver legenda figura 1.5) que possibilita a utilização do transportador de aminoácidos neutros, LAT1 (35).

A distribuição do sangue para os tecidos é lenta e o equilíbrio é alcançado cerca de 4 dias após a exposição. Aproximadamente 10% da carga corporal encontra-se na região da cabeça, tendo-se demonstrado que a concentração no cérebro pode ser 3 a 6 vezes superior à do sangue. Cerca de 20% do MeHg presente no cérebro encontra-se principalmente como complexo MeHg-Glutationa (36).

Estudos recentes revelaram a presença de seleneto de mercúrio (HgSe) no cérebro de baleias e humanos, concluindo-se que é possível a desmetilação do MeHg nos tecidos de mamíferos. Contudo o processo é lento e aparentemente não é uma reação catalisada, sendo a quebra da ligação C-Hg atribuída a um processo espontâneo (34).

O MeHg é principalmente metabolizado no fígado, onde reage com a glutatona e é excretado através da biliar para o lúmen intestinal. No entanto, no intestino, o complexo metilmercúrio-glutatona é hidrolisado e o MeHg reabsorvido. Esta recirculação entero-hepática torna a eliminação do MeHg ineficiente e apenas 1% do MeHg é excretado nas fezes. Porém, a excreção fecal ainda é a principal via de eliminação do MeHg, que ocorre na forma de Hg²⁺ após a quebra da ligação Hg-C pela microflora intestinal (37).

ETILMERCÚRIO

A exposição ao etilmercúrio resulta da injeção intramuscular de vacinas que contenham timerosal. Esta molécula rapidamente se dissocia no interior do corpo humano libertando EtHg (38). A taxa de absorção e o volume de distribuição inicial do Hg total aparentemente são semelhantes entre o MeHg ingerido e o timerosal injetado, a maior diferença são os tempos de semi-vida de cada composto, sugerindo que o EtHg é mais rapidamente degradado e eliminado que o MeHg (22).

Porém, estudos experimentais que abordaram a exposição precoce ao timerosal indicam que em fetos, neonatos e recém-nascidos expostos, o mercúrio permanece no sangue em concentração e tempo suficientes para atingir o cérebro e afetar o neurodesenvolvimento (39).

Para além disso o EtHg que atinge o cérebro é mais rapidamente transformado em Hg^{2+} comparativamente ao MeHg, como demonstrado *in vivo* em primatas não-humanos (*Macaca fascicularis*) (22).

1.4.2 Efeitos na saúde

Os compostos de mercúrio têm como principais alvos o sistema nervoso central, fígado e rins.

Os principais efeitos adversos para saúde são a neurotoxicidade, a teratogenicidade, a nefrotoxicidade e imunotoxicidade. O efeito da toxicidade depende da idade, dose e duração da exposição (40).

Os dados disponíveis indicam que existem algumas semelhanças significativas entre os mecanismos neurotóxicos de MeHg, EtHg e Hg^0 (41). Nomeadamente, nas últimas três décadas estudos mostraram que a exposição a baixos níveis de mercúrio ou a doses ambientais, têm efeitos sobre o desenvolvimento fetal, demonstrando-se que este é muito suscetível à exposição ao Hg durante a organogénese. Este facto tem suscitado uma maior atenção para a exposição ao mercúrio da mulher grávida (20).

Os sintomas atribuídos à exposição aguda ao Hg^0 incluem danos nos pulmões (toxicidade pulmonar), alterações da membrana mucosa, vômitos, diarreia, náuseas, erupções cutâneas, aumento da frequência cardíaca ou pressão arterial (hipertensão), disfunção renal (nefrotoxicidade) e anomalias neurológicas graves (42).

A exposição a longo termo de baixa dose afeta o sistema neurológico resultando em sintomas como tremores, neuropatias, mudanças na personalidade, distúrbios da fala, delírio e rigidez muscular (43).

Nos adultos os efeitos tóxicos do MeHg são caracterizados por um longo período de latência antes do aparecimento dos sintomas. Os sintomas iniciais incluem visão turva, perda de peso, parestesias das mãos e pés, seguidos de constrição do campo visual, ataxia e sintomatologia psiquiátrica. Além disso, em adultos, os sinais e sintomas de envenenamento por MeHg estão associados à perda de células neuronais em regiões cerebrais específicas, como o córtex visual e o cerebelo, o que leva a alterações da capacidade motora (44,45).

No sistema nervoso central (SNC), o MeHg pode acumular-se em muitos tipos de células, contudo existem evidências que os astrócitos representam um local preferencial (46).

Embora o metilmercúrio possa sofrer desmetilação, a neurotoxicidade do MeHg no cérebro é causada maioritariamente pela espécie alquilada uma vez que Hg^{2+} representa somente 10% do acumulado no cérebro (47).

O MeHg ao atravessar a placenta acumula-se no SNC do feto. Em equilíbrio, o cérebro fetal pode ter a mesma concentração que o cérebro da mãe, contudo dados experimentais revelam que a concentração sanguínea fetal, na espécie humana, pode ser superior à da mãe, facto que é explicado por diferenças na hemoglobina dos adultos e dos fetos (48).

Na União Europeia, estima-se que mais de 1,8 milhões de crianças nascem todos os anos com exposições ao MeHg acima de 0,58 µg/g, e cerca de 200.000 nascimentos excedem o limite superior de 2,5 µg/g proposto pela WHO (49).

A exposição pré e/ou perinatal prolongada ao MeHg, mesmo em doses moderadas, está relacionada com múltiplos défices em neurónios e células da glia, incluindo alterações na migração, diferenciação neuronal e crescimento celular desregulado. A exposição pré-natal ao MeHg está associada a um baixo peso ao nascer, atraso no neurodesenvolvimento, crescimento e desenvolvimento das crianças (11).

Existem muitas semelhanças nos mecanismos de ação tóxica do metilmercúrio e do etilmercúrio, a diferença na toxicidade entre os dois compostos alquilados é provavelmente resultado do metabolismo e eliminação mais rápida do EtHg e da dose, isto é, a exposição MeHg resulta do consumo frequente de peixe versus exposição a concentrações mais baixas e amplamente espaçada a EtHg (38). No cérebro e contrariamente ao MeHg, o EtHg é convertido em larga escala a Hg²⁺ (22).

Outro aspeto importante na intoxicação crónica com o mercúrio são os efeitos combinados de diferentes tipos de mercúrio, como por exemplo exposição de crianças ao metilmercúrio por via da alimentação e etilmercúrio por via da vacinação (50).

No que respeita à fisiopatologia, no caso geral dos metais esta depende da criação de stress oxidativo, isto é, da geração de um desequilíbrio no estado redox da célula, que se caracteriza por um aumento da concentração de espécies reativas de oxigénio (ROS), esgotamento das reservas de antioxidantes intracelulares e inibição ou redução da atividade de enzimas que contribuem significativamente para o metabolismo de ROS levando a dano celular (51).

Para além de provocar stress oxidativo, o Hg enquanto elemento eletrófilo tem uma vasta gama de moléculas celulares como candidatas a reações, principalmente proteínas que desempenham papéis fundamentais na regulação do ambiente celular, como é o caso do sistema da tiorredoxina que subsequentemente se apresenta.

1.5 O Sistema Tiorredoxina

A regulação do estado de redução/oxidação é crítica para a viabilidade celular, uma vez que as ROS são produzidas nos organismos como resultado do metabolismo celular normal e de fatores ambientais.

Dado que as ROS são moléculas muito reativas, e em altas concentrações podem danificar estruturas celulares, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (30); os organismos aeróbios têm sistemas antioxidantes integrados, que incluem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

Para além da manutenção do estado reduzido no meio intracelular, a atividade enzimática e vias de sinalização molecular dependem muitas vezes do estado de oxidação dos resíduos de Cys da proteína. Para algumas proteínas os grupos tiol (SH) específicos de Cys devem ser mantidos na forma reduzida (-SH), enquanto que para outras o estado de oxidação de dissulfeto (-SS) é essencial para a função biológica. Se um estado redox de tiol-dissulfeto expressa uma atividade

biológica, então em princípio, a atividade biológica pode ser modulada pela oxidação e redução de tióis e dissulfetos proteicos específicos (52).

O principal sistema dissulfeto redutase omnipresente nos organismos responsável por manter as proteínas no seu estado reduzido é o sistema da tioredoxina que é constituído pela tioredoxina (Trx), pela selenoenzima tioredoxina redutase (TrxR) e pelo NADPH como dador de eletrões (Figura 1.6).

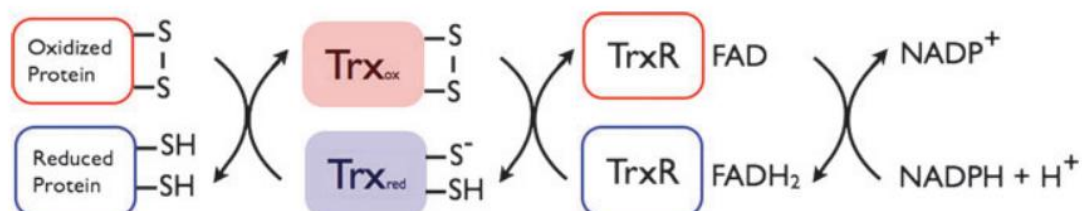


Figura 1.6 – Fluxo dos eletrões desde o NADPH até à redução da proteína. Trx- tioredoxina; TrxR tioredoxina redutase (53)

Este sistema tem um papel fundamental na manutenção do estado redox das células, estando associado à manutenção e sobrevivência celular, incluindo reparação de proteínas, regulação do ciclo celular e sinalização celular, e encontra-se em todos os tecidos (Tabela 1.2) (54).

Tabela 1.2 – Função das tioredoxinas em diferentes organismos, adaptada de (55).

Organismo	Função Sistema Tiorredoxina	Comentário
Todos os seres vivos (?)	Síntese DNA	A tioredoxina é um dador de protões para a ribonucleotídeo redutase;
	Redução das proteínas a ditiol.	A tioredoxina é um elemento chave para manter os ditiois nas proteínas intracelulares;
Muitos organismos	Redução H ₂ O ₂	Muitas peroxirredoxinas requerem redução pela tioredoxina, evitando se assim o stress oxidativo e a indução de apoptose;
	Redução do sulfóxido de metionina na reparação proteica	A tioredoxina é dadora de protões para as redutases de sulfóxido de metionina;
Fagos de <i>E. Coli</i> (T7, f1, M13)	Participa na montagem dos filamentos do fago	A tioredoxina é a única proteína hospedeira de <i>E. coli</i> necessária para a montagem e exportação do fago;
Bactérias e leveduras	Dador de protões para a 3'-fosfoadenilsulfato (PAPS) redutase	Assimilação de enxofre por redução de sulfato a sulfito;
Plantas	Regulação de enzimas fotossintéticas	Regulação da fotossíntese via ferredoxina;

Mamíferos	Regulação redox de fatores de transcrição, como por exemplo NFkB, AP-1	Diferentes fatores de transcrição são ativados ou inibidos pela Trx;
	Regulação da apoptose	A tioredoxina no seu estado reduzido $-(SH)_2$, forma um complexo com a ASK1 impedindo a sinalização a jusante da apoptose;
	Immunomodulação	A tioredoxina extracelular é uma co-citocina e uma quimiocina - a sua forma truncada estimula os eosinófilos;
	Gravidez	A síntese intracelular e extracelular de tioredoxina a partir de citotrofblastos auxilia na implantação e no estabelecimento da gravidez;
	Parto	Proteção contra hiperóxia no nascimento;
	SNC	A tioredoxina secretada pelas células gliais promove a sobrevivência neuronal na isquemia / reperfusão

1.5.1 Tiorredoxina (Trx)

A Trx é uma proteína de 12 kDa com um ditiol no centro ativo, cuja sequência -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys foi conservada ao longo da evolução. Os tióis do centro ativo são ambos necessários para a atividade catalítica da Trx (56). A Trx foi descoberta pela primeira vez como um dador de elétrons para a ribonucleotídeo redutase (RNR), a enzima reduz os ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos, uma etapa essencial para a síntese e reparação do DNA (56).

Existem duas isoformas de tioredoxina, a Trx1 que existe predominantemente no citoplasma, no núcleo e no espaço intermembranar mitocondrial, e a Trx2 que se encontra na matriz da mitocôndria.

Nos mamíferos a Trx1 tem três resíduos cisteína estruturais adicionais (Cys 62, Cys 69 e Cys 73) que não são propriamente necessários para o mecanismo de catálise, mas influenciam as propriedades termodinâmicas da proteína (Figura.1.7) (53). A Trx2 não tem estes resíduos Cys estruturais e é mais resistente à oxidação do que Trx1 (57).

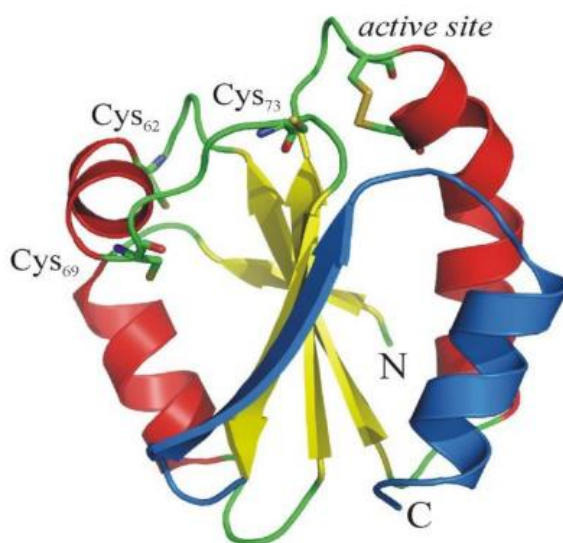


Figura 1.7 – Estrutura da Trx1 humana (58).

1.5.2 Tiorredoxina redutase (TrxR)

As tiorredoxinas redutases são enzimas pertencentes à família das flavoproteínas de piridina nucleotídeo-dissulfeto oxidoredutases que inclui enzimas como a lipoamida desidrogenase ou a glutationa redutase. As TrxR são proteínas homodiméricas em que cada monômero inclui um grupo prostético dinucleótido de flavina e adenina (FAD), um local de ligação NADPH e um centro ativo contendo um dissulfeto redox. No caso da TrxR dos mamíferos, para além do dissulfeto redox (Cys 64 e Cys 59) no terminal N, existe na região terminal C uma Cys extra (Cys 497) e um resíduo de selenocisteína (Sec 498) que é muito reativo e essencial para a atividade catalítica (Figura 1.8). O NADPH liga-se ao domínio NADPH e os eletrões fluem deste para o FAD, de seguida para o centro ativo da cisteína terminal N e posteriormente para o resíduo de Sec do terminal C (Figura 1.9).

Os eletrões são transferidos do NADPH via FAD para o dissulfeto do centro ativo e depois para o selenol-tiol que então reduz o substrato (59). A descoberta fortuita que a TrxR dos mamíferos é uma selenoproteína, vinculou o sistema da tiorredoxina ao selénio e à sua a função nas células (60). A pH fisiológico, devido ao seu baixo pKa (5.4), o grupo selenol (SeH) do resíduo de Sec está desprotonado na forma de selenolato (Se⁻) sendo por isso muito reativo.

A alta reatividade do selenolato e um centro ativo aberto e acessível são as razões para a ampla especificidade de substrato da TrxR de mamíferos em comparação com seus equivalentes bacterianos (61). A lista de substratos inclui Trxs de outras espécies, DTNB, entre outros (54).

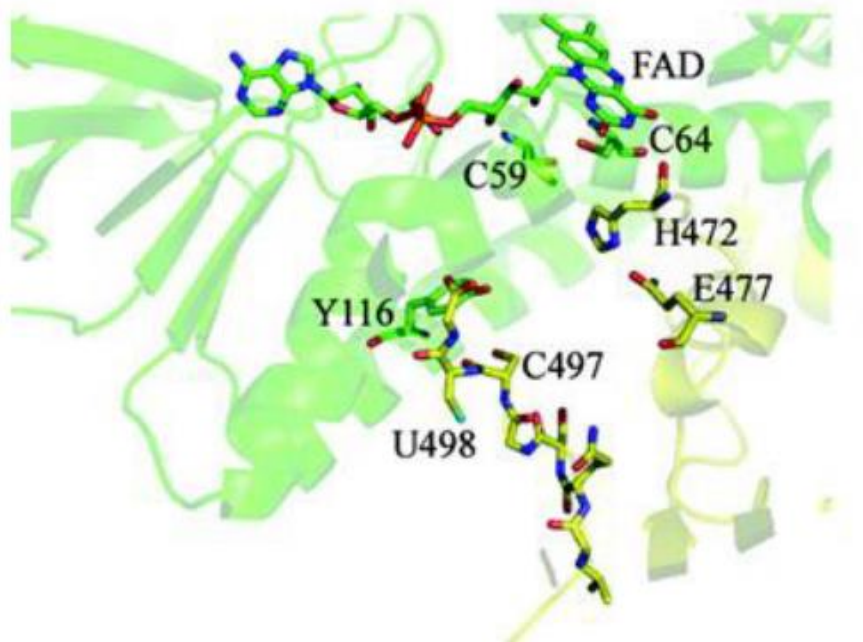


Figura 1.8 – Estrutura da TrxR1 reduzida, com o grupo selenolliol (C497+U498) no terminal C, e o terminal N com os ditiois (C59+C64) (8).

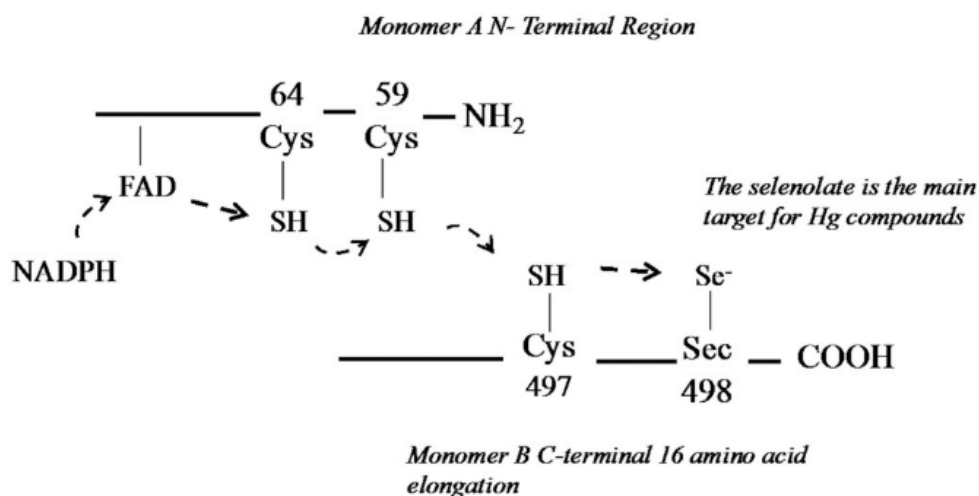


Figura 1.9 – Fluxo dos elétrons desde o NADPH até ao sítio ativo da TrxR (62).

1.5.3 Mecanismo de ação do sistema tioredoxina

A reação catalisada pela Trx é uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN₂). A reação pode ser vista como uma transferência da ligação dissulfeto da proteína substrato para a Trx, isto é, os elétrons vindos da Trx são transferidos para a proteína substrato. Assim, apesar do ambiente redutor intracelular, as Trx formam uma ligação dissulfeto após um único ciclo catalítico. Esta ligação não é um dissulfeto estrutural, mas funciona como um interruptor redox. A Trx oxidada é mais estável do que Trx reduzida (53).

A Trx oxidada é depois reduzida pela TrxR usando elétrons vindos do NADPH (Figura 1.6).

1.5.4 Interação do mercúrio com o sistema tiorredoxina

Uma vez que o sistema tiorredoxina está a montante de várias vias bioquímicas, a sua inibição por compostos de Hg representa uma etapa chave no desenvolvimento de toxicidade (62).

Como referido anteriormente o Hg tem uma alta afinidade para os grupos SH e SeH, e como tal é expectável que o sistema da tiorredoxina e especialmente a TrxR sejam alvos primordiais na ligação ao mercúrio. A tiorredoxina, através dos grupos tiol, e a tiorredoxina redutase, através do grupo selenol e da sua posição espacial no centro ativo relativamente desprotegido, são os principais motivos para que sejam alvos primários do Hg.

Um trabalho pioneiro demonstrou que o Hg^{2+} e o MeHg inibem rapidamente a atividade da TrxR1 recombinante de rato purificada. Este efeito foi confirmado em células HeLa com 24h de exposição a Hg^{2+} ou a MeHg, que inibiram a atividade TrxR com um IC_{50} de 5,4 μM e 1,4 μM , respetivamente (63).

O efeito inibitório do Hg^{2+} sobre a TrxR1 de rato foi também demonstrado em culturas de monócitos THP1 (64) e estudos em células HepG2 e SH-SY5Y também demonstraram que o etilmercúrio (EtHg) afeta a TrxR de forma semelhante ao MeHg (65).

Em peixes expostos por 28 dias ao MeHg, a atividade da TrxR no cérebro e no fígado foi inversamente correlacionada com a exposição. Além disso, os animais expostos foram submetidos a um período de depuração e os níveis de MeHg diminuíram no fígado, e a atividade da enzima recuperou para os níveis da pré-exposição (66).

Para além disso, foi demonstrado que a inibição de TrxR ocorre antes que o dano patológico seja estabelecido, o que fortalece a hipótese de que a inibição da TrxR é um evento precoce na toxicidade do mercúrio (40).

A tiorredoxina também é um dos alvos dos compostos de Hg. O efeito oxidante sobre Trx1 humana recombinante é mais forte para Hg^{2+} quando comparado com MeHg (63), de igual forma experiências em células revelaram um forte efeito oxidativo do Hg^{2+} sobre Trx1 contrastando com pouca oxidação de GSH (67).

Na experiência com células HeLa referidas anteriormente, o IC_{50} para a inibição da Trx foi aproximadamente 6 vezes maior do que o observado para TrxR, tanto para o Hg^{2+} como para o MeHg.

A menor inibição de Trx por Hg^{2+} , MeHg e também do EtHg foi subsequentemente confirmada em células HepG2, assim como em animais. Nestes, a diminuição da atividade da Trx ocorreu apenas no núcleo do cerebelo dos ratinhos machos, ao contrário da atividade da TrxR, que foi amplamente afetada (68).

A não diminuição da atividade da Trx quando a TrxR está inibida pode dever-se ao facto da glutarredoxina (Grx) e a GSH funcionarem como dadores alternativos de eletrões para a Trx1 (62). Com efeito, isto foi demonstrado por Branco et al. (69) com neurónios primários de ratinho sem glutarredoxina mitocondrial. Nestes, a oxidação da Trx2 foi superior aos ratinhos *wild-type*. Uma vez que a TrxR2 já estava inibida, a ausência do mecanismo de recurso via glutarredoxina mitocondrial agravou os efeitos sobre a Trx2.

O NADPH é um co-fator para os sistemas redox fornecendo os elétrons necessários às reações. Na produção de NADPH interferem várias enzimas com grupos tiol que podem ser alvos dos compostos de Hg. Embora poucos estudos tenham abordado as interações entre os compostos de mercúrio e a produção de NADPH, é expectável uma alteração nos níveis da sua produção (65).

1.6 Terapêutica Clínica

A detecção precoce e eliminação/diminuição da carga de mercúrio no organismo são críticas para uma efetiva desintoxicação e prevenção dos danos patológicos.

A terapia de eleição para desintoxicação de metais é o tratamento com agentes quelantes (70) que removem metais do organismo por meio da formação de complexos estáveis (Figura 1.10) (70,71).

Não existe um agente quelante específico para a desintoxicação pelo mercúrio e não existe qualquer quelante eficaz para tratamento de intoxicações crônicas com metilmercúrio (72).

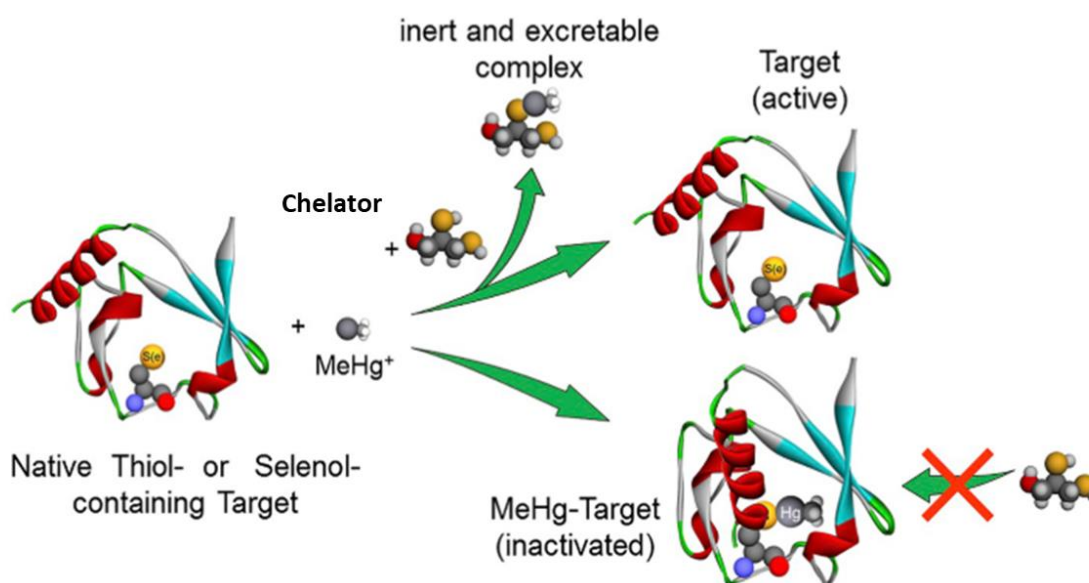


Figura 1.10 – Possível mecanismo envolvendo inativação de uma proteína contendo um grupo selenol pelo MeHg, e ação de um agente quelante. O MeHg poderá causar uma alteração da conformação da proteína não sendo possível a ligação ao agente quelante (34).

Normalmente, os átomos doadores de elétrons na molécula quelante podem ser o enxofre, azoto e/ou oxigênio, em grupos -SH, -SS, -NH₂, =NH, -OH, OPO₃H ou >C=O. A força das ligações químicas dentro da coordenação dos complexos (quelante/metálico) depende dos elementos envolvidos e da estereoquímica (73).

Com a variedade de metais existente nos organismos que se pode ligar competitivamente ao quelante, como por exemplo, cálcio, magnésio, zinco, cobre, manganês, entre outros, e que

normalmente excedem as concentrações dos metais tóxicos presentes, o metal que se irá ligar predominantemente a um agente quelante vai depender: i) da acessibilidade do quelante aos tecidos; ii) de quão fortemente o metal tóxico está ligado aos alvos moleculares; iii) da afinidade do metal tóxico para se ligar ao quelante; iv) das quantidades relativas dos vários íons metálicos (74).

Outra consideração é a solubilidade do complexo em água e em lipídios. A solubilidade aquosa facilita o transporte dentro do sangue e a excreção via rim, enquanto um complexo lipofílico pode exibir maior penetração das membranas celulares (incluindo aquelas dentro do sistema nervoso central) para quelar elementos intracelulares. Um quelante lipofílico é excretado em maior quantidade pela biliar e conseqüentemente através das fezes (73).

A maioria dos quelantes não são capazes de cruzar a barreira hematoencefálica e, portanto, têm uma capacidade limitada de remover os metais do tecido cerebral (75). Por isso, um composto químico que se qualifique como um agente quelante ideal *in vitro* pode não o ser *in vivo*, seja devido à distribuição, a considerações de toxicidade ou devido à presença de substâncias endógenas como a hemoglobina, citocromos, etc., que podem atuar como quelantes.

Além disso, o pH também é um fator importante que influencia a formação e estabilidade do complexo. Um complexo é mais instável a pH baixo, enquanto que a pH alto os metais tendem a formar hidróxidos insolúveis que são menos acessíveis aos agentes quelantes. Essa característica torna-se significativa em condições patológicas que levam à acidose ou alcalose (76).

Assim, um quelante deverá satisfazer os critérios que lhe permitam: transporte através de barreiras fisiológicas para estruturas onde o metal tóxico está concentrado; formar um complexo estável com o metal após removê-lo do alvo molecular biológico; e formar um complexo de quelação desprovido de toxicidade que facilite a sua excreção, não apenas do local de deposição, mas também do corpo. Isto significa que um quelante ideal deve ter alta solubilidade em água, ser resistente à biotransformação, ter capacidade de alcançar os locais de deposição do metal, reter a capacidade quelante no pH dos fluidos corporais e a propriedade de formar complexos de metal que são menos tóxicos do que o íon de metal livre (76).

No mecanismo da destoxificação de metais pesados deverá atender-se que os agentes quelantes terapêuticos utilizados são excretados rapidamente, em algumas horas ou dias, em oposição aos elementos tóxicos que sofrem acumulação por longos períodos de tempo e estão distribuídos em vários órgãos, nem todos eles sendo igualmente acessíveis aos agentes quelantes. Normalmente, um agente quelante mobiliza os metais mais prontamente disponíveis primeiro, geralmente no plasma, rins, fígado, e em menor extensão, nos ossos e no sistema nervoso central (73).

Historicamente, os quelantes mais comumente usados na terapia por Hg contêm grupos -SH e são o BAL (2,3 dimercaptopropan-1-ol), DMSA (ácido meso-dimercaptosuccínico), DMPS (2,3-dimercapto-1-ácido propanossulfônico) e D-penicilamina (DPA) (77). Na Tabela 1.3 apresentam-se, a título de exemplo, o DL₅₀ de alguns dos quelantes usados em intoxicações com metais pesados. Na UE os medicamentos autorizados pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA)

para tratamento de intoxicações pelo mercúrio são o DMSA, DMPS, penicilamina e BAL (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu311944>).

Tabela 1.3 – Quelantes terapêuticos com relevância: respectivas formas de administração e DL₅₀, adaptado de (78).

Composto	DL ₅₀	Espécie
CaNa ₂ EDTA	4 – 6 g/ kg	rato, ratinho
BAL	90 – 180 mg/ kg	rato
DMPS	1,1 – 1,4 g/ kg	rato, ratinho
DMSA	2,48 g/ kg	ratinho
D-penicilamina	337 mg/ Kg	ratinho

Os tratamentos não deverão ser agressivos e devem ser prolongados no tempo. A terapia de combinação deverá também ser considerada pois pode aumentar a mobilização do metal no corpo, reduzir as doses individuais de quelantes e diminuir a redistribuição de metais tóxicos de um local para outros mais sensíveis, como o cérebro (73).

1.6.1 BAL (2,3 dimercaptopropan-1-ol)

Durante a Segunda Guerra Mundial foi desenvolvido um antídoto contra o gás de guerra química Lewisite. O composto responsável pela toxicidade do gás é caracterizado por uma ligação carbono-arsénio.

O BAL (Figura 1.11) compete com sucesso com os grupos de proteína -SH para o tratamento de envenenamentos com arsénio (As), também forma complexos estáveis com outros metais tóxicos, nomeadamente com o Hg²⁺. Por várias décadas, após a Segunda Guerra Mundial, foi recomendado para tratamento de envenenamentos por Hg (Hg⁰; Hg⁺; Hg²⁺), arsénico, antimónio, ouro e bismuto (79).

O BAL tem uma semi-vida curta, sendo metabolizado e excretado em quatro horas. Por isso é mais eficaz quando administrado imediatamente após a exposição.

Nas doses terapêuticas, este quelante apresenta efeitos adversos graves. Devido à sua natureza lipofílica, o BAL não é absorvido por via oral e a administração requer uma injeção intramuscular que é extremamente dolorosa; como o composto está dissolvido em óleo de amendoim, é também potencialmente alergénico (76).

Para além do baixo índice terapêutico, tem tendência a redistribuir o As, Hg e Pb, causando um aumento destes metais no cérebro (76).

Atualmente é apenas usado em tratamentos de curta duração em intoxicações agudas de As e de Pb, em que haja risco de vida (80).

O BAL está contra-indicado no tratamento de intoxicações com cádmio, bem como em compostos alquil- e aril-Hg, tendo sido amplamente suplantado pelo ácido dimercaptosuccínico (DMSA ou succímero) e pelo dimercaptopropano sulfonato (DMPS).

1.6.2 DMSA (ácido meso-dimercaptosuccínico) e DMPS (2,3-dimercapto-1-ácido propanossulfónico)

O DMSA (Figura 1.11) e DMPS são agentes quelantes que formam complexos solúveis em água, com uma estrutura química análoga ao BAL, e são habitualmente os antídotos de primeira linha no tratamento de intoxicações agudas ou crónicas de muitos dos sais metálicos (81). Estes compostos foram extensivamente pesquisados na Rússia, China e Japão a partir da década de 50. Foram introduzidos na Europa e Estados Unidos apenas a partir da década de 70 (82).

Estes ditióis são hidrofílicos tendo sobretudo uma ação extracelular. São administrados oralmente, por via intravenosa, com recurso a supositórios ou via transdérmica. A dose absorvida é excretada com semi-vida de aproximadamente 3 horas (77).

O DMSA é considerado o fármaco de escolha em intoxicações por compostos orgânicos de Hg (79). Apesar de não passar a barreira hematoencefálica, parece reduzir indiretamente a carga cerebral de MeHg, alterando o equilíbrio cérebro-sangue (78).

Em comparação com outros antídotos de ditiol, o DMSA é menos tóxico, tem um alto índice terapêutico e tem a vantagem de praticamente não haver perda de metais essenciais (Fe, Ca, Mg), sendo observadas apenas pequenas mudanças no metabolismo do cobre (76).

Trabalhos em animais revelam que o DMPS praticamente não altera os níveis de metilmercúrio no cérebro, mas a sua remoção do rim é superior comparativamente com a DMSA (83).

Não obstante, o DMPS é preferencialmente utilizado em intoxicações por mercúrio inorgânico (79). Carvalho et al., realizaram um estudo sobre o efeito que os quelantes BAL, DMSA e DMPS têm sobre a recuperação da atividade da TrxR quando inibida por compostos mercúricos, tendo observado relativa eficácia na proteção da TrxR da inibição do Hg²⁺. Porém, tiveram um efeito limitado sobre a inibição por MeHg, estando em concordância com as evidências anteriores (84).

Num exame retrospectivo dos vários antídotos existentes, conclui-se que não há unanimidade global de opinião em relação à eficácia de um determinado regime de tratamento. O sucesso de qualquer tratamento depende do fato de o medicamento ser de ação rápida, ter uma semi-vida longa e útil, de ter o mínimo de efeitos colaterais e de ser facilmente aplicado (76).

Como a maioria dos quelantes convencionais estão comprometidos com muitos efeitos colaterais e desvantagens, e porque não há tratamento seguro e eficaz disponível para envenenamento por metais pesados, torna-se essencial o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento deste tipo de intoxicações.

1.7 Composto macrocíclico [15]anoN₄S

Nos últimos anos, tem-se explorado uma variedade de ligantes quelantes macrocíclicos para modificar e controlar as propriedades dos iões metálicos em sistemas biológicos.

Os compostos macrocíclicos podem exibir propriedades importantes como alta estabilidade cinética e termodinâmica e baixa toxicidade, tornando-os agentes muito promissores no contexto terapêutico das intoxicações por metais (85).

Os macrocíclos são vantajosos em termos de seletividade, uma vez que possuem estruturas mais rígidas, podem assim impor uma geometria de coordenação específica ao íão metálico, enquanto quelantes de cadeia aberta, como por exemplo o BAL ou DMSA (Figura. 1.12), podem-se adaptar mais facilmente às exigências geométricas do centro metálico (86).

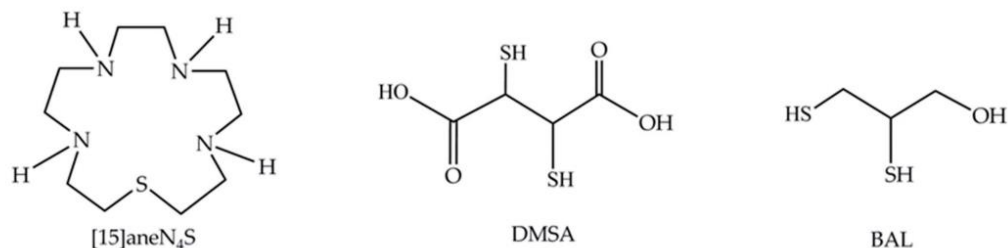


Figura 1.11 – Estruturas químicas do quelante macrocíclico em estudo, DMSA e BAL (87).

O quelante macrocíclico, 1-tia-4,7,10,13-tetraazaciclopentadecano ([15] anoN₄S) foi sintetizado por investigadores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL), segundo o protocolo descrito por Torres et al. (86). O quelante apresenta quatro átomos de azoto e um de enxofre que atua como dador de eletrões, a sua síntese encontra-se representada na Figura 1.12.

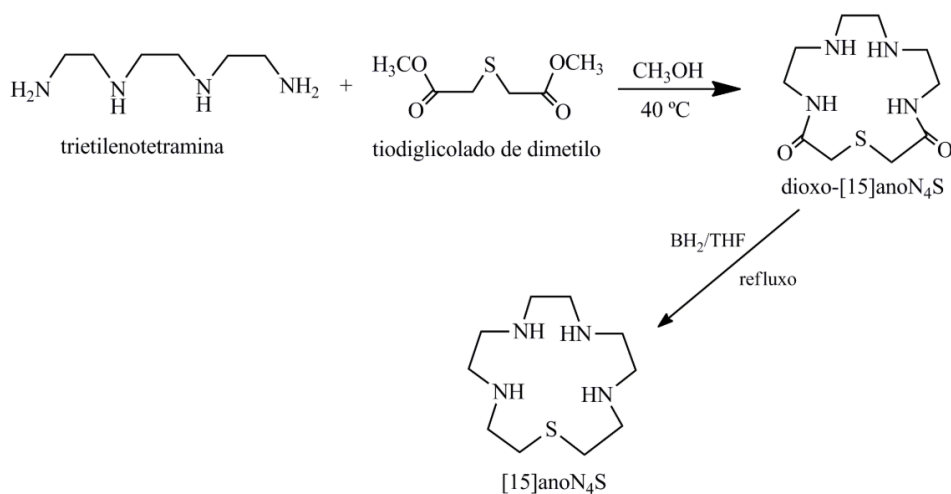


Figura 1.12 – Representação da síntese e estrutura do quelante macrocíclico [15] anoN₄S (88).

Os estudos potenciométricos realizados sobre este composto mostraram uma alta seletividade para o Hg²⁺, cobre e níquel. O mercúrio divalente foi o que apresentou uma maior constante de estabilidade térmica a pH 7,4 (log KML = 23,74). Especialmente relevante é o facto deste composto, nas condições experimentais de teste, não ter originado a formação de complexos com Ca²⁺, evidenciando assim um potencial quelante para compostos de mercúrio (88).

2. OBJECTIVO

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar a eficácia do quelante macrocíclico [15]anoN₄S na recuperação da atividade da enzima tiorredoxina redutase e sistema da tiorredoxina, previamente inibidos por compostos de mercúrio. Esta avaliação engloba a comparação dos resultados obtidos para o [15]anoN₄S com dois quelantes de uso terapêutico, o ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) e o 2,3-dimercapto-1-propanol (British anti-Lewisite - BAL).

O estudo compreende duas fases, uma primeira fase em que se avalia a eficácia da recuperação da enzima *in vitro* numa dimensão química, isto é, os ensaios cinéticos são realizados com a enzima pura e são avaliadas as curvas de inibição enzimática.

Numa segunda fase, avalia-se a eficácia da recuperação da atividade enzimática numa dimensão biológica, isto é, os ensaios são realizados em células humanas de neuroblastoma (SH-SY5Y) e determinada a recuperação da atividade do sistema tiorredoxina/ tiorredoxina redutase.

O estudo compreende três objetivos específicos, sendo que os dois primeiros reportam ao trabalho realizado com soluções purificadas de enzima e o terceiro objetivo ao trabalho realizado com culturas de células SH-SY5Y:

- 1) Comparar a capacidade de inibição da TrxR de 3 compostos de Hg: mercúrio (II) (Hg²⁺), etilmercúrio (EtHg) e metilmercúrio (MeHg);
- 2) Avaliar a capacidade de recuperação da atividade da TrxR e o sistema da tiorredoxina inibidos por compostos de Hg com cada um dos três quelantes: BAL, DMSA e [15]anoN₄S;
- 3) Avaliar em células a recuperação da atividade da TrxR e Trx inibidas por MeHg com cada um dos três quelantes.

3. MÉTODOS E REAGENTES

3.1 Reagentes

Para os ensaios da recuperação da atividade da tiorredoxina redutase e da tiorredoxina em enzimas puras utilizaram-se os seguintes reagentes:

- Cloreto de Etilmercúrio (AlfaAesar);
- Cloreto de Mercúrio (II) (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de Metilmercúrio (II) (Sigma-Aldrich);
- DTNB, 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoato) (Sigma-Aldrich);
- NADPH, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (Sigma-Aldrich);
- TrxR1 recombinante de rato (IMCO);
- Trx1 humana (IMCO);
- Insulina humana recombinante (Sigma-Aldrich);
- BAL, 2,3-dimercapto-1-propanol (Sigma-Aldrich);
- DMSA, ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (Sigma-Aldrich);
- Composto macrocíclico [15]anoN₄S sintetizado de acordo com a referência bibliográfica, em solução aquosa 2,2 mM com a sua concentração exata determinada por potenciometria (89).

Para os ensaios da recuperação da atividade da tiorredoxina redutase e da tiorredoxina em células e para realização do Western Blot utilizaram-se os seguintes reagentes:

- Linha celular SH-SY5Y (ATCC);
- Meio DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco-ThermoFisher);
- Meio F-12 (Gibco-ThermoFisher);
- Penicilina/estreptomicina (Gibco-ThermoFisher);
- FBS soro fetal bovino (Biochrome) inativado a 56°C antes de usado;
- MTT brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (Sigma-Aldrich);
- Cocktail inibidor de proteases (Roche);
- Corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (AlfaAesar);
- BSA albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich);
- Marcador de peso molecular See blue plus 2 (ThermoFisher);
- Tampão de corrida MES (Thermofisher);
- Membrana de nitrocelulose (Biorad);
- Corante Ponceau S (ThermoFisher);
- Anticorpo policlonal de coelho Anti TrxR1 humana (Santa Cruz Biotechnologies);
- Anticorpo policlonal de coelho Anti Trx1 humana (IMCO Corp);
- Anticorpo policlonal de coelho Anti GAPDH humana (Santa Cruz Biotechnologies);
- Anticorpo secundário anti-coelho (Santa Cruz Biotechnologies);
- Reagente quimioluminescência *Immobilon Western* (Milipore)

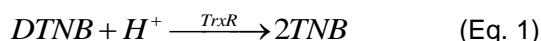
Para além dos reagentes mencionados acima utilizaram-se também sais, solvente e outros reagentes de uso comum em laboratório para elaboração de soluções.

3.2 Determinação da Atividade da TrxR pelo ensaio de redução do DTNB

O trabalho iniciou-se com a avaliação da inibição da TrxR pelos três compostos de mercúrio com o ensaio do DTNB (5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoato)). Depois determinou-se a concentração de inibitória de 80% (IC₈₀) da atividade enzimática para ser utilizada nos ensaios posteriores. Incubou-se a enzima com diferentes concentrações dos compostos de mercúrio e traçaram-se as curvas de cinética enzimática.

3.2.1. Princípio do ensaio

A atividade foi determinada recorrendo ao método de redução do DTNB. Este é um método colorimétrico baseado na redução dos grupos tiol do 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoato) (DTNB) pela tiorredoxina redutase e NADPH, formando-se 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) que tem uma forte coloração amarela, com um máximo de absorvância a 412 nm.(Eq. 1) (90)



Quanto mais enzima estiver inibida pelos compostos de mercúrio menor será a formação de TNB e conseqüentemente menor a intensidade da coloração amarela.

3.2.2. Curvas de inibição da TrxR pelos compostos de Hg

Os ensaios foram realizados numa placa de 96 poços e para um volume total de 100 µL por poço. A técnica consistiu em misturar enzima TrxR1 recombinante de rato (20 nM) em tampão Tris-Cl 50 mM pH 7,5, adicionando-se de seguida NADPH 100 µM e por fim o composto de mercúrio de forma a obter as concentrações referidas na Tabela 3.1. Posteriormente a solução foi incubada a 37°C durante 5 minutos, introduzindo logo de seguida 66 µL por poço de uma solução contendo o DTNB em tampão Tris-Cl (63).

A variação da absorvância a 412 nm foi seguida num leitor de microplacas (Anthos zenyth 3100) durante 5 minutos tendo sido consideradas as leituras dos dois primeiros minutos por corresponderem à região linear da reação.

Tabela 3.1 – Concentrações dos compostos de mercúrio.

Etilmercúrio [nM]	Metilmercúrio [nM]	Cloreto de mercúrio [nM]
0	0	0
50	50	5
75	75	10
100	100	50
200	200	--

3.2.3. Recuperação da actividade da TrxR pelos compostos quelantes

Utilizando a concentração de cada composto que inibiu 80% a atividade da TrxR (200 nM para EtHg e MeHg, e 50 nM Hg²⁺) avaliou-se a capacidade de recuperação da atividade por cada um dos três quelantes.

Nas três experiências, a enzima inibida foi tratada com os quelantes em estudo numa concentração 5 vezes superior à concentração molar dos compostos de mercúrio e numa concentração de 40 µM.

Estas concentrações foram escolhidas com base em trabalhos anteriores, o valor de concentração 5x superior à concentração do Hg, corresponde à concentração que conseguiu reverter a inibição da glutatona redutase em solução (dados não publicados), a concentração de 40 µM corresponde à concentração esperada no organismo humano após uma dose terapêutica de DMSA (30 mg / kg) (84).

Foram realizados os ensaios descritos na Tabela 3.2, num mínimo de três ensaios independentes em dias diferentes, com três replicados por dia. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente para evitar problemas de estabilidade.

Tabela 3.2 – Ensaios de avaliação da recuperação da atividade da TrxR – uso de quelantes

TIPO DE MERCÚRIO	ENSAIOS									
ETILMERCÚRIO	Controlo (tampão, enzima e NAPH)	EtHg 200 nM	EtHg 200 nM + [15]anoN ₄ S 1 µM	EtHg 200 nM + [15]anoN ₄ S 40 µM	[15]anoN ₄ S 40 µM	EtHg 200 nM + BAL 1 µM	EtHg 200 nM + BAL 40 µM	EtHg 200 nM + DMSA 1 µM	EtHg 200 nM + DMSA 40 µM	DMSA 40 µM
CLORETO DE MERCÚRIO		HgCl ₂ 50 nM	HgCl ₂ 50 nM + [15]anoN ₄ S 250 nM	HgCl ₂ 50 nM + [15]anoN ₄ S 40 µM	[15]anoN ₄ S 40 µM	HgCl ₂ 50 nM + BAL 250 nM	HgCl ₂ 50 nM + BAL 40 µM	HgCl ₂ 50 nM + DMSA 250 nM	HgCl ₂ 50 nM + DMSA 40 µM	DMSA 40 µM
METILMERCÚRIO		MeHg 200 nM	MeHg 200 nM + [15]anoN ₄ S 1 µM	MeHg 200 nM + [15]anoN ₄ S 40 µM	[15]anoN ₄ S 40 µM	MeHg 200 nM + BAL 1 µM	MeHg 200 nM + BAL 40 µM	MeHg 200 nM + DMSA 1 µM	MeHg 200 nM + DMSA 40 µM	DMSA 40 µM

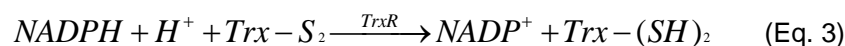
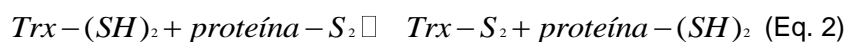
3.3 Determinação da Atividade do Sistema da tiorredoxina pelo ensaio de redução da Insulina

3.3.1. Princípio do ensaio

Determinou-se a atividade do sistema Tiorredoxina/ Tiorredoxina Redutase para os ensaios com o metilmercúrio pelo ensaio da redução da insulina.

Este método aumenta o grau de complexidade face ao método do DTNB, uma vez que, para além da TrxR, está presente na reação o seu principal substrato, a Trx, sendo por isso um ensaio mais próximo da reação que ocorre nas células.

Este ensaio baseia-se em duas propriedades funcionais que caracterizam o sistema tiorredoxina: a Trx reduzida com um grupo ditiol no local ativo (Trx- (SH)₂) reduz os grupos dissulfeto de proteínas, neste caso da insulina (Eq. 2); oxidando-se; a Trx oxidada com um dissulfeto no centro ativo (Trx-S₂) é reduzida pela TrxR, que adquire eletrões do NADPH (Eq. 3) (90).



3.3.2. Metodologia do Ensaio

Os ensaios foram realizados numa placa de 96 poços para um volume total de 100 µL. Utilizou-se TrxR1 recombinante de rato 20 nM, Trx1 humana 3 µM e NADPH 100 µM (concentrações finais), as placas foram pré-incubadas a 37°C por 5 min. em Tris 50 mM, pH 7,5 com MeHg 200 nM e duas concentrações diferentes de [15]anoN₄S, BAL ou DMSA, 1 e 40 µM. Em seguida, adicionou-se aos poços uma mistura contendo insulina e NADPH com concentrações finais de 160 e 200 µM, respetivamente. Foi lida a absorvância num leitor de placas a 340 nm. A variação da absorvância indica o consumo de NADPH. A atividade foi calculada com base nos valores de absorvância durante os 5 minutos da leitura. Um mínimo de 3 replicados independentes foi realizado para cada condição experimental.

3.4 Cultura Celular

Na segunda fase do trabalho, os ensaios com células foram realizados com coexposição apenas com metilmercúrio e os três quelantes individualmente. A atividade da enzima foi determinada após coexposição de 24h. Paralelamente foi estudada a viabilidade celular por exposição a cada um dos quelantes em diferentes concentrações. Verificou-se ainda se os quelantes não interfeririam na expressão genética da enzima.

Os ensaios foram realizados com células de neuroblastoma humano SH-SY5Y adquiridas à ATCC® (Figura. 3.1).

As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e de meio F-12, na proporção de 1:1 de meio suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de uma mistura de penicilina/estreptomicina. As células foram incubadas num incubador humidificado a 37°C e 5% de CO₂.

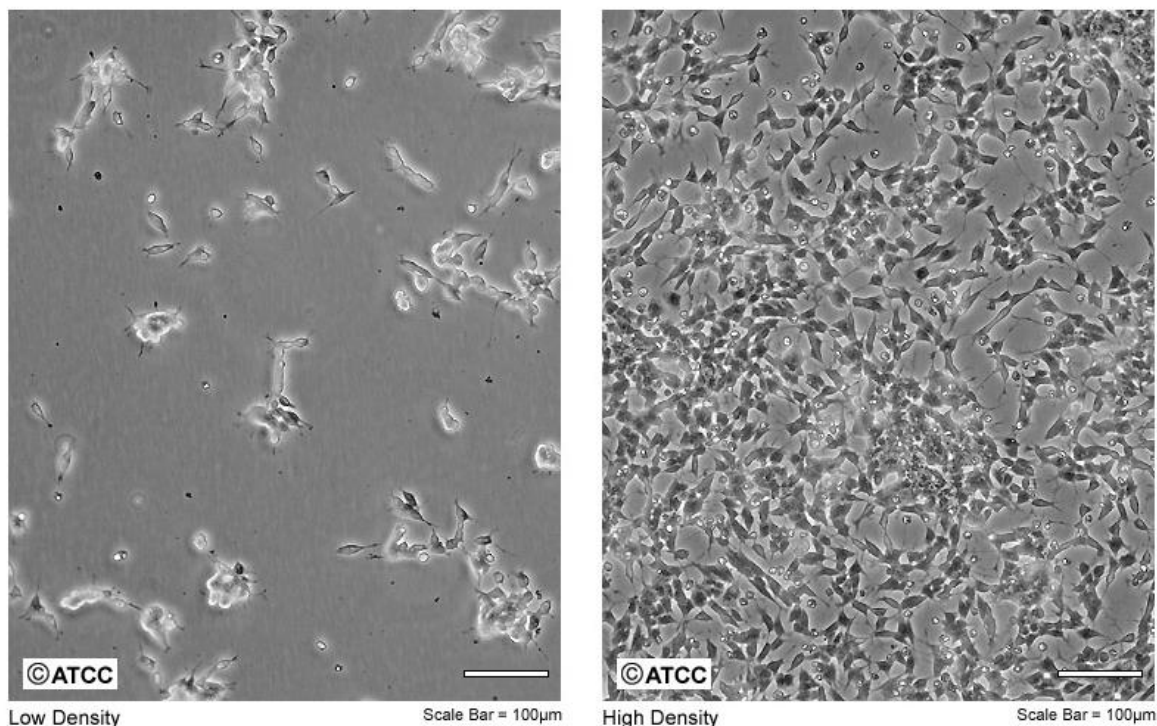


Figura 3.1 –Imagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y aderidas a alta e baixa densidade (<https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/BD0339F70429411C80D5A27FC4FDE1DC.ashx> 08/03/2020).

3.5 Ensaios de viabilidade celular

Determinou-se a viabilidade de células expostas aos três quelantes, [15]anoN₄S, BAL e DMSA, num gradiente de concentrações (20, 40, 80, 100 e 120 µM), pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio). Este ensaio é baseado na capacidade que as células têm, por via das desidrogenases, de reduzirem os sais tetrazólicos, formando-se formazan, um cristal de cor arroxeada (91).

As células foram sedimentadas em placas de 96 poços com uma concentração de 1x10⁴ células por poço. Após 24h de cultura foram adicionadas as várias concentrações dos agentes quelantes (20, 40, 80, 100 e 120 µM), em poços por condição experimental, tendo-se realizado um mínimo de três ensaios independentes por cada tempo de exposição. A viabilidade celular foi determinada após 3h e 24 h de exposição a cada composto.

O MTT foi adicionado às placas na concentração final de 400 mg/ mL, seguido de incubação a 37°C por 2 h. Após a incubação, o meio foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos num tampão de DMSO/ glicina na proporção 4:1 a pH 10,5, com agitação por 15 min à temperatura ambiente. A viabilidade celular foi então avaliada medindo a absorção de formazan a 550 nm num leitor de microplacas (92).

Foram realizados controles para os solventes PBS e etanol 0,4% (solvente da solução mãe de DMSA), e para a redução espontânea de MTT pelos quelantes (Figura 3.2.).

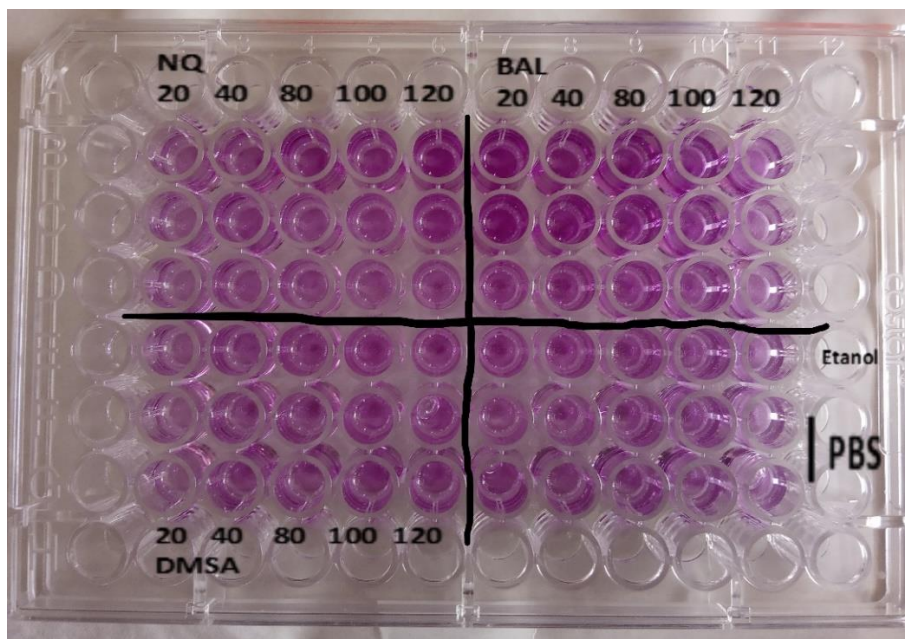


Figura 3.2 – Placa ensaio 24h

Com base nos resultados de viabilidade obtidos as concentrações para as experiências subsequentes foram estabelecidas em 40 μM para todos os agentes quelantes. A concentração de MeHg utilizada foi de 2,5 μM , com base em resultados anteriores com células SH-SY5Y (69).

3.6. Preparação de lisados celulares

As células foram plaqueadas em caixas de cultura de 100mm de diâmetro, na concentração de 1×10^6 células/placa. Cresceram até ter uma confluência de 70% a 80%. Com o meio fresco e com o volume por placa de 8 mL, adicionou-se MeHg, de forma a que a concentração na placa fosse 2,5 μM , e em simultâneo os agentes quelantes numa concentração final por placa 40 μM .

Por ensaio foram utilizadas 8 placas com as seguintes condições:

- Controlo (placa sem qualquer adição)
- Placa com MeHg
- Placa com MeHg + [15]anoN₄S
- Placa com [15]anoN₄S
- Placa com MeHg + BAL
- Placa com BAL
- Placa com MeHg + DMSA
- Placa com DMSA

Incubaram-se as células durante 24h, após o que as mesmas foram recolhidas por tripsinização, lavadas duas vezes com PBS a pH=7,4 e centrifugadas a 600 x g durante 5 min. O pellet final foi ressuspenso em tampão de lise (Tris– Cl 25 mM a pH 7,5; NaCl 100 mM; EDTA 2,5 mM; EGTA

2.5 mM; NaF 20 mM, Na₃VO₄ 1 mM, Na₄P₂O₇ 20 mM; C₃H₇Na₂O₆P 20 mM; TritonX-100 a 0,5% e cocktail de inibidores de proteases (1 comprimido por 10 mL). As amostras foram congeladas a -20°C até análise posterior.

3.7 Quantificação do Total de proteínas solúveis

Após descongelação, os lisados celulares foram centrifugados a 12.000 × *g* a 4°C por 5 min. A proteína solúvel total e as atividades enzimáticas foram determinadas no sobrenadante.

A proteína total foi quantificada pelo método de Bradford, um ensaio colorimétrico baseado na mudança de absorvância do corante Coomassie Brilliant Blue G-250. O corante Coomassie existe em três formas: a aniônica com coloração azul, a neutra com coloração verde e a catiónica com coloração vermelha. A forma do corante ligada à proteína tem a cor azul e um máximo de absorvância a 595 nm. Um aumento da absorvância a 595 nm é proporcional à quantidade de proteína presente na amostra (93). O reagente de Bradford (5x concentrado) foi preparado na concentração 0,5g/L de Coomassie em 24% de metanol e 50% de ácido fosfórico 85%.

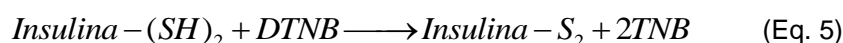
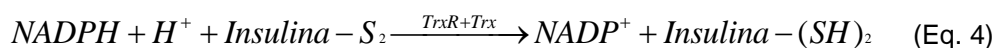
Para quantificação da proteína nas amostras recorreu-se a uma curva de calibração utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão, o traçado da curva foi realizado no intervalo 0-16 µg proteína/ µL.

Cada amostra e solução padrão foi misturada com o reagente de Bradford diluído 1:5 em placas de 96 poços, seguido da medição da absorvância a 595 nm num leitor de microplacas.

Depois de determinado teor de proteína de cada amostra, calculou-se o volume necessário da mesma para que os ensaios subsequentes tivessem 30 µg de proteína.

3.8 Determinação da actividade da TrxR e Trx em lisados celulares

A determinação da atividade das enzimas TrxR e Trx foi realizada pelo método *Insulin end-point*, este protocolo tem por base o método de redução da insulina já referido anteriormente, estando adaptado a amostras biológicas complexas. No ensaio da *Insulin end-point*, o número de tióis formados na insulina reduzida, resultante da atividade do sistema Trx/ TrxR, é determinado com recurso ao DTNB, a reação é interrompida pelo cloridrato de guanidina e o DTNB é reduzido pela insulina reduzida existente no meio (Eq. 4 e 5) (90).



Para medir a atividade da TrxR, as amostras (30 µg de proteína) foram incubadas em placas de 96 poços, para um volume total de 50 µL, com insulina (0,3 mM), NADPH (660 µM), EDTA (2 mM) e Trx 2 µM, em tampão HEPES 85 mM a pH 7,6, a 37° C durante 20 min. A Trx usada foi previamente reduzida com ditioneitol (DTT) e dessalinizada numa coluna NAP-5.

Em paralelo foram preparados os poços de controlo que continham os mesmos reagentes à exceção da adição de Trx. Após o período de incubação, foram adicionados 250 µL de uma

solução de DTNB 1 mM em cloridrato de guanidina 6 M (pH 8,0), a cada poço. A absorbância foi medida num leitor de microplacas a 412 nm.

A atividade da TrxR é nos dada pela diferença na absorbância entre o poço contendo Trx e o poço controle.

A determinação da atividade de Trx seguiu o mesmo procedimento usado para TrxR, mas com as amostras sendo incubadas com TrxR de rato recombinante 100 nM.

3.9. Avaliação da expressão proteica da TrxR e Trx

Recorreu-se à técnica de Western Blot para determinar se o metilmercúrio e os quelantes tinham alguma influência na expressão proteica das enzimas TrxR e Trx.

As amostras, num volume correspondente a 40 µg de proteína, foram separadas em condições redutoras num gel SDS-PAGE com gradiente de Bis-Tris de 4% a 12%, utilizando-se como tampão de corrida MES (tampão de 2- (4-morfolino) etanossulfónico).

De seguida procedeu-se à transferência (2h a 30 V, 4°C) das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, usando tampão Tris-glicina com 20% de metanol. A membrana foi corada com Ponceau S para avaliação da eficácia de transferência. Posteriormente cortou-se a membrana em 3 partes, de acordo com os pesos moleculares das enzimas, TrxR, Trx e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), esta última usada para controlo de *loading* (Figura 3.3).

As três membranas foram depois lavadas com PBS-T e bloqueadas com solução de leite magro a 5% durante 1h à temperatura ambiente.

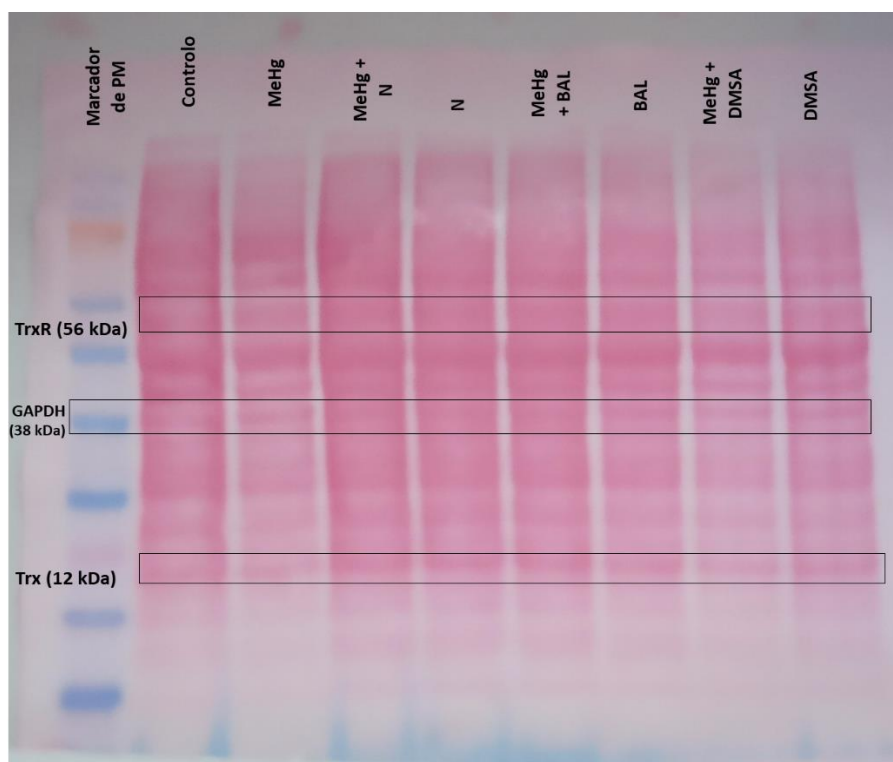


Figura 3.3 – Membrana corada com Ponceau S; MeHg + N - MeHg com coexposição ao - [15]anoN₄S; N - [15]anoN₄S.

Cada membrana foi em seguida lavada e incubada com o anticorpo primário respectivo: IgG policlonal de coelho anti-TrxR1 e -Trx1 na diluição 1:1000 e IgG policlonal de coelho anti-GAPDH na diluição 1:500, a 4°C com agitação durante a noite.

No dia seguinte as membranas foram lavadas com PBS, incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho (1:2000) diluído em leite magro a 5%, com agitação durante 3h à temperatura ambiente.

Foram de imediato reveladas com o reagente *Immobilon Western* e o sinal de quimioluminiscência foi detetado no equipamento *ChemiDoc* (Biorad).

A intensidade de cada banda foi quantificada usando o *QuantityOne Software* (Biorad).

3.4 Tratamento Estatístico dos Resultados

Os resultados são apresentados como a média \pm o desvio padrão da média (SEM) de, no mínimo, três experiências independentes. Cada experiência tem três replicados.

Devido ao número de experiências ser inferior a 30 e desconhecer-se a forma de distribuição dos dados, aplicou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney considerando que existe uma diferença nos resultados estatisticamente significativa para $p < 0,05$ e muito significativa para $p < 0,01$. Os resultados do teste foram obtidos com recurso ao software *STATISTICA*.

4. RESULTADOS

4.1 Determinação da Atividade da TrxR pelo ensaio de redução do DTNB

4.1.1 Curvas de inibição da TrxR pelos compostos de Hg

Os resultados do ensaio do DTNB relativos à inibição da atividade da TrxR pelos compostos de Hg mostram que todos produzem uma inibição forte da atividade com Hg^{2+} >> EtHg~MeHg (Figura 4.1). Com efeito, o Hg^{2+} foi o composto que inibiu a TrxR a menor concentração, com um IC_{50} de cerca de 10 nM e um IC_{80} de 50 nM. Para o EtHg e MeHg, os valores de inibição foram muito semelhantes, com um IC_{50} de 100 nM e um IC_{80} de 200 nM.

Com base nestes resultados, nos ensaios de avaliação da recuperação da atividade utilizaram-se as concentrações de 50nM e 200 nM para $HgCl_2$ e EtHg/MeHg respectivamente.

4.1.2 Recuperação da actividade da TrxR pelos compostos quelantes

Os resultados do ensaio de recuperação da atividade da TrxR recombinante de rato com os três quelantes, expressos na Figura 4.2, mostram que de um modo geral, a capacidade de reverter a inibição da TrxR foi modesta. No caso da inibição por Hg^{2+} , o BAL e o DMSA conseguem uma recuperação ligeira (45% e 35%) da atividade mas o [15]anoN₄S não (Figura 4.2a). De igual modo, nas concentrações usadas, a capacidade dos quelantes reverterem a inibição da TrxR pelo EtHg foi limitada, tendo neste caso o [15]anoN₄S, na concentração 5x superior à concentração do EtHg, levado a uma recuperação de cerca de 20% da atividade (Figura 4.2b).

Analisando os resultados da atividade da enzima na presença de MeHg (Figura 14.2c) e na concentração de 40 μ M de quelante, observa-se uma recuperação da atividade de cerca de 30% na presença de [15]anoN₄S e DMSA.

De assinalar que durante a exposição da TrxR aos quelantes na concentração 40 μ M observou-se uma perda de atividade de 10 a 25%, no caso do BAL e DMSA, sendo que o [15]anoN₄S não teve impacto sobre a atividade.

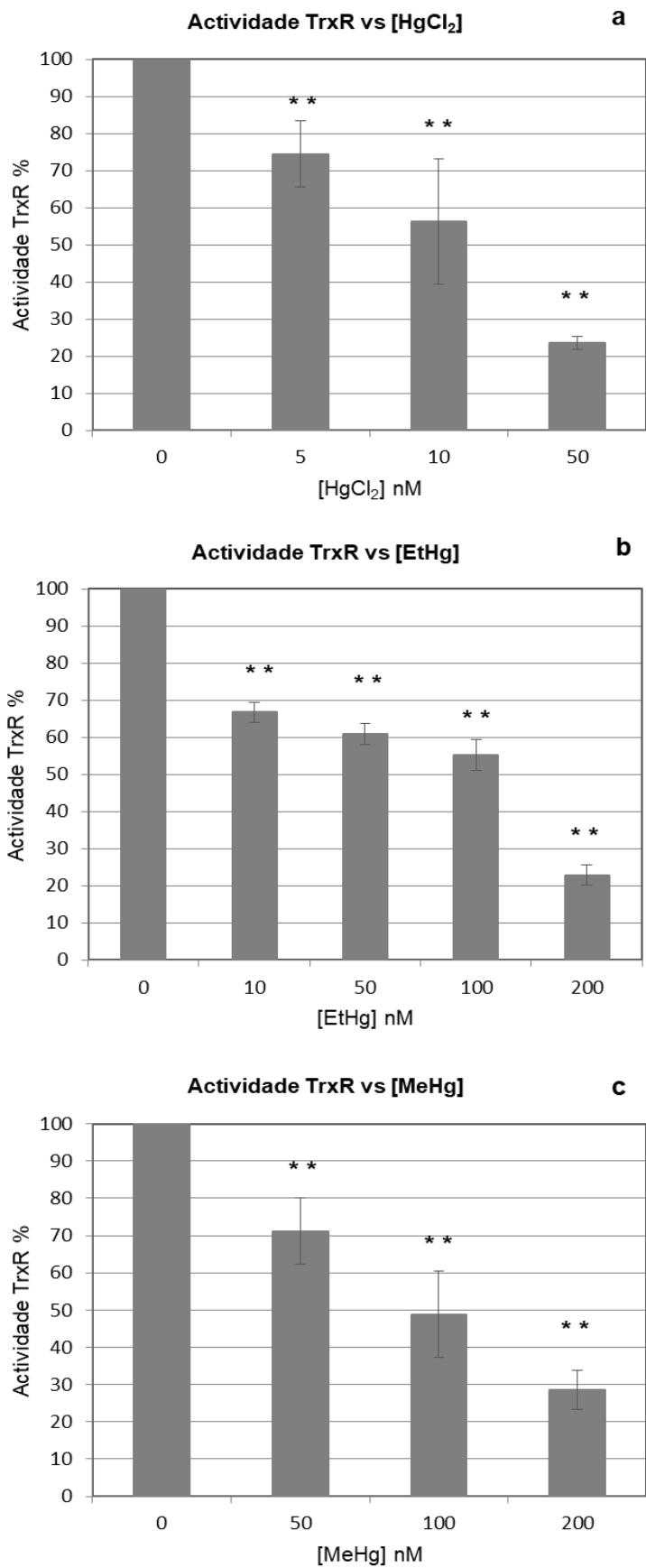


Figura 4.1 – Gráfico da atividade TrxR versus concentração de cloreto de mercúrio (a) etilmercúrio (b) e metilmercúrio (c). ** Diferença estatisticamente muito significativa para o grupo controlo ($p < 0,01$).

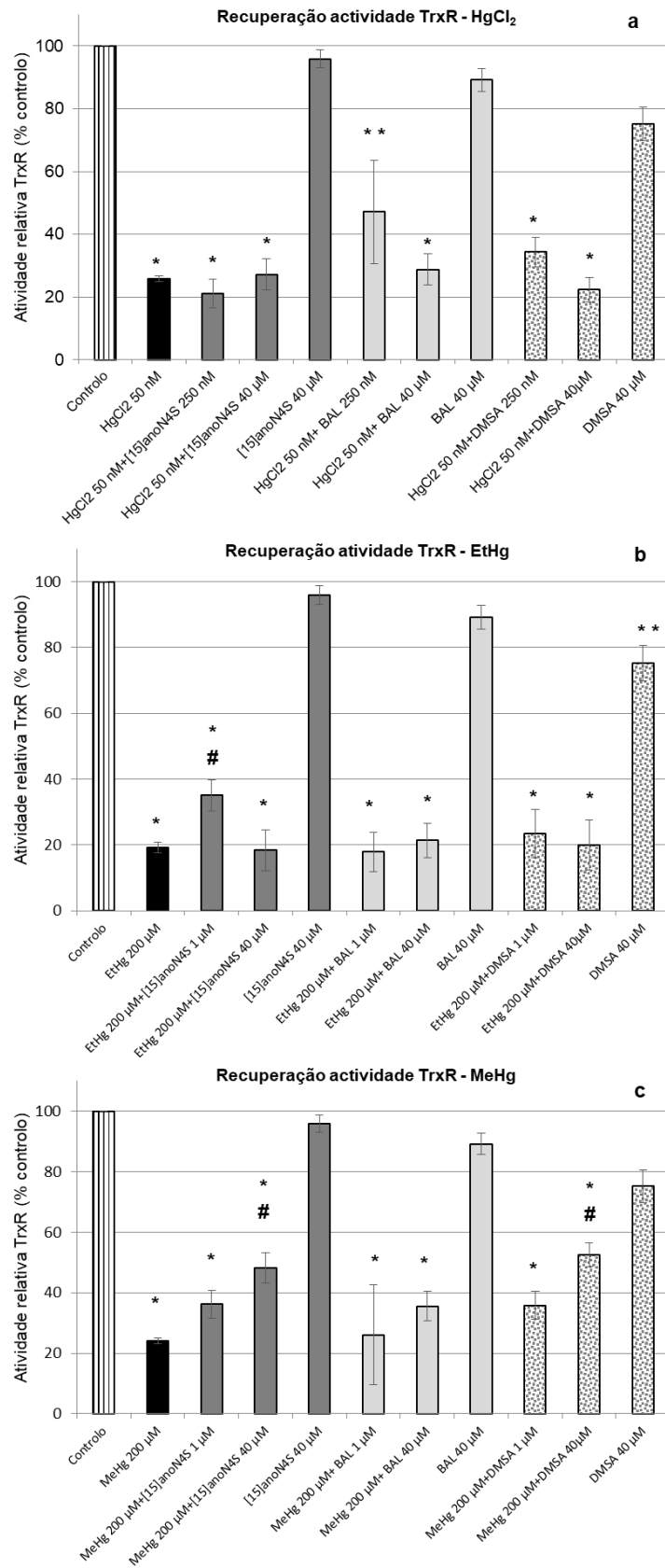


Figura 4.2 – Recuperação da atividade TrxR exposta a Hg²⁺ (a), EtHg (b) e MeHg (c), em função dos quelantes em estudo. * Diferença estatisticamente significativa para o grupo controlo (p<0,05); ** diferença

estatisticamente muito significativa para o grupo controlo ($p < 0,01$); # diferença estatisticamente significativa para o grupo EtHg/MeHg ($p < 0,05$)

4.2 Determinação da Atividade do Sistema da tiorredoxina pelo ensaio de redução da Insulina

Face aos resultados obtidos para a atividade da TrxR com o ensaio do DTNB, realizou-se um outro teste de determinação da atividade do sistema da tiorredoxina. Este ensaio, o ensaio de redução da insulina, conjuga-se na mesma experiência TrxR, Trx e NADPH, sendo mais próximo da realidade celular, onde o sistema funciona como um todo.

Neste ensaio, cujos resultados estão expressos na Figura 4.3, a incubação das enzimas do sistema tiorredoxina com MeHg (200 nM) resultou numa perda de atividade para cerca de 48% do nível dos controlos. À semelhança do observado com o ensaio do DTNB, os agentes quelantes per si não alteraram os níveis de redução de insulina significativamente. Nas concentrações de teste, os agentes quelantes recuperaram a atividade do sistema Trx para níveis entre 70% e 90% da atividade de controle com uma maior eficácia para BAL > DMSA > [15] anoN₄S.

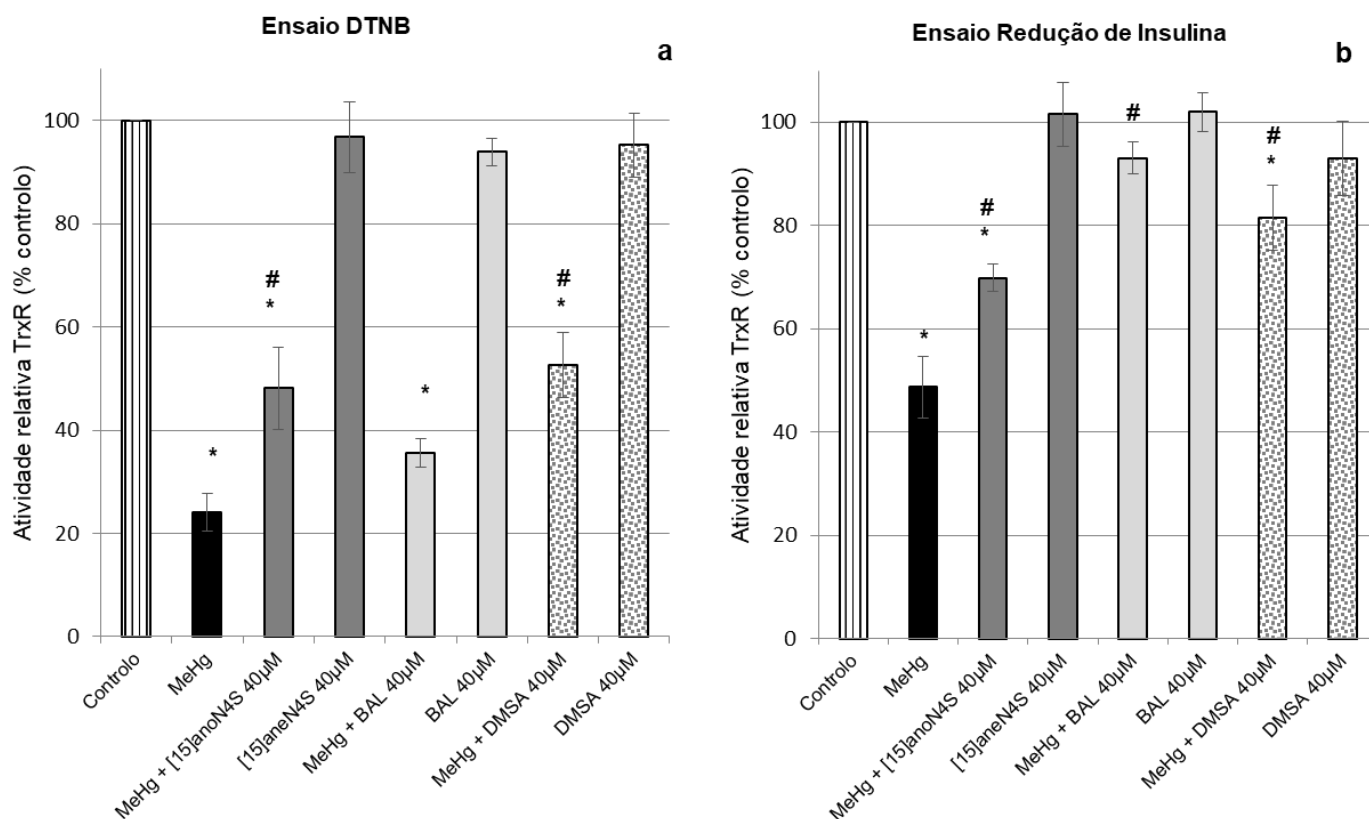


Figura 4.3 – Recuperação da atividade da TrxR pelo método do DTNB (a) e do sistema da tiorredoxina pelo método da insulina (b) quando expostas a MeHg. * Diferença estatisticamente significativa para o controlo ($p < 0,05$); # diferença estatisticamente significativa para o MeHg ($p < 0,05$).

4.3 Ensaios de viabilidade celular

O efeito dos quelantes na viabilidade das células SH-SY5Y foi avaliado pelo ensaio do MTT e os resultados estão expressos na Figura 4.4.

Ambos os quelantes [15]anoN₄S e DMSA não afetaram negativamente a viabilidade celular. Porém, o BAL causou uma redução de cerca de 20% na capacidade das células SH-SY5Y de reduzirem o MTT após a exposição a 120 µM por 3h e 24 h.

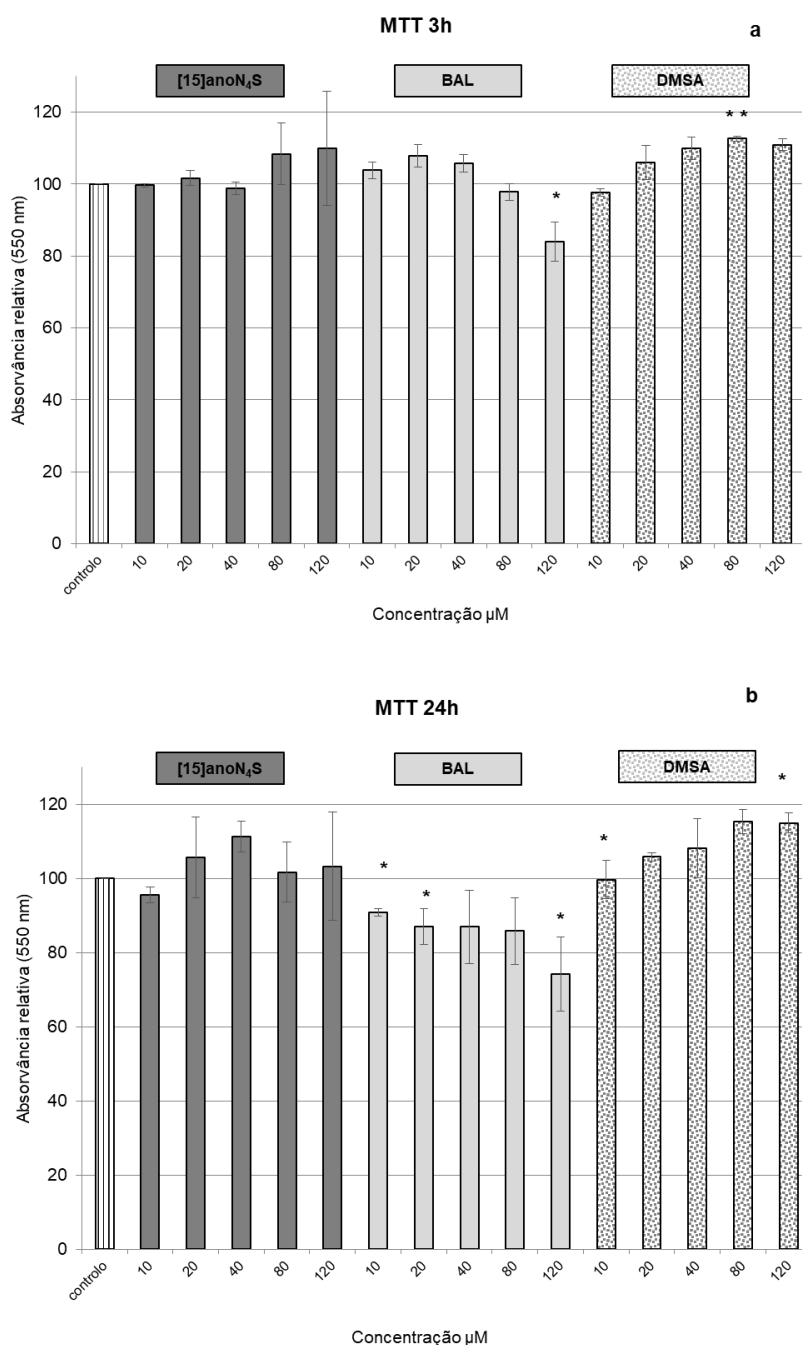


Figura 4.4 - Alterações na capacidade de redução do MTT por células SH-SY5Y após exposição por 3h (a) e 24 horas (b) a diferentes concentrações de agentes quelantes. * Diferença estatisticamente significativa para o controle ($p < 0,05$); ** diferença estatisticamente muito significativa para o controle ($p < 0,01$).

4.4 Determinação da actividade da TrxR e Trx em lisados celulares

Dada a relevância em termos de exposição humana do MeHg e o facto de o [15]anoN4S ter mostrado maior eficácia de recuperação relativamente a este composto nos ensaios com enzimas recombinantes, os ensaios com células centraram-se na análise dos efeitos dos quelantes sobre a toxicidade deste composto mercurial.

A exposição de células SH-SY5Y a 2,5 μ M de MeHg por 24 h resultou numa diminuição da atividade de TrxR para cerca de 33% do nível do controlo. A exposição das células a 40 μ M de [15]anoN4S e BAL não diminuiu a atividade de TrxR, enquanto o DMSA causou uma diminuição de cerca de 20% (Figura 4.5a). O mais relevante contudo, é o facto dos três agentes quelantes não terem sido capazes de prevenir a inibição de TrxR por MeHg.

A atividade da tioredoxina foi menos afetada pela exposição de SH-SY5Y a MeHg com uma queda para 47% do controlo ($p < 0,05$; Figura 4.5b). Como observado com a TrxR, os agentes quelantes não afetaram significativamente a atividade de Trx. No entanto, tanto [15]anoN4S como o BAL foram capazes de prevenir completamente a da inibição de Trx por MeHg ($p < 0,05$), enquanto o DMSA não mostrou qualquer capacidade protetora ($p > 0,05$) (Figura 4.5b).

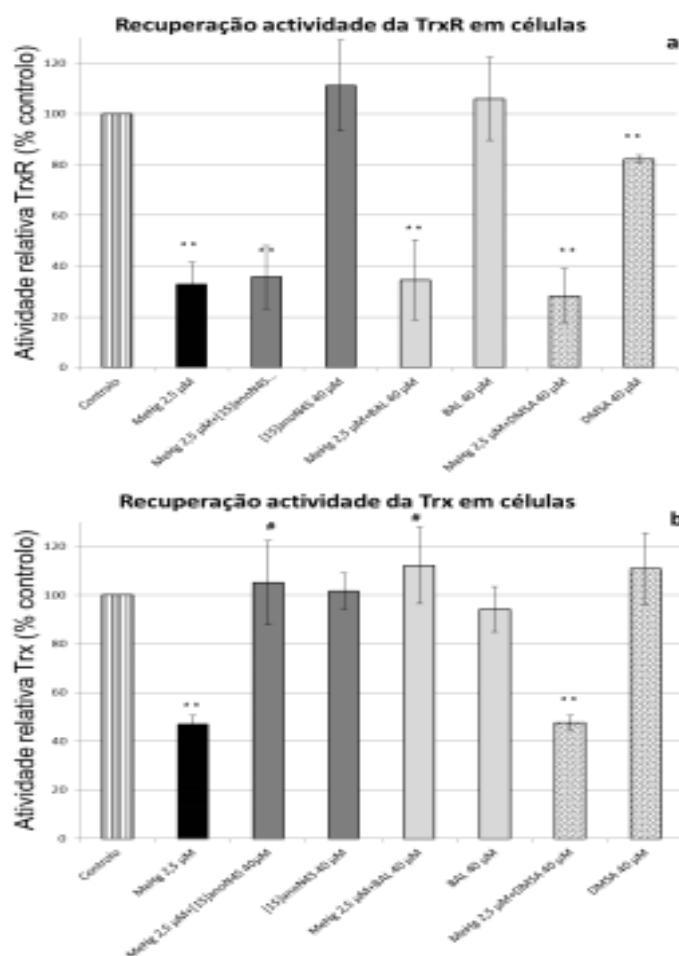


Figura 4.5 – Recuperação da atividade da TrxR (a) e da Trx (b) em células SH-SY5Y, após 24h de exposição ao MeHg. * * Diferença estatisticamente significativa para o controlo ($p < 0,01$); # diferença estatisticamente significativa para a exposição ao MeHg ($p < 0,05$).

4.5. Avaliação da expressão proteica da TrxR e Trx

Em relação ao efeito de cada tratamento na expressão de TrxR e Trx (Figura 4.6), é de notar que nenhum dos agentes quelantes alterou a expressão de TrxR. Por outro lado, a expressão de Trx foi regulada negativamente pelo DMSA, o que está de acordo com os resultados relativos à atividade de Trx.

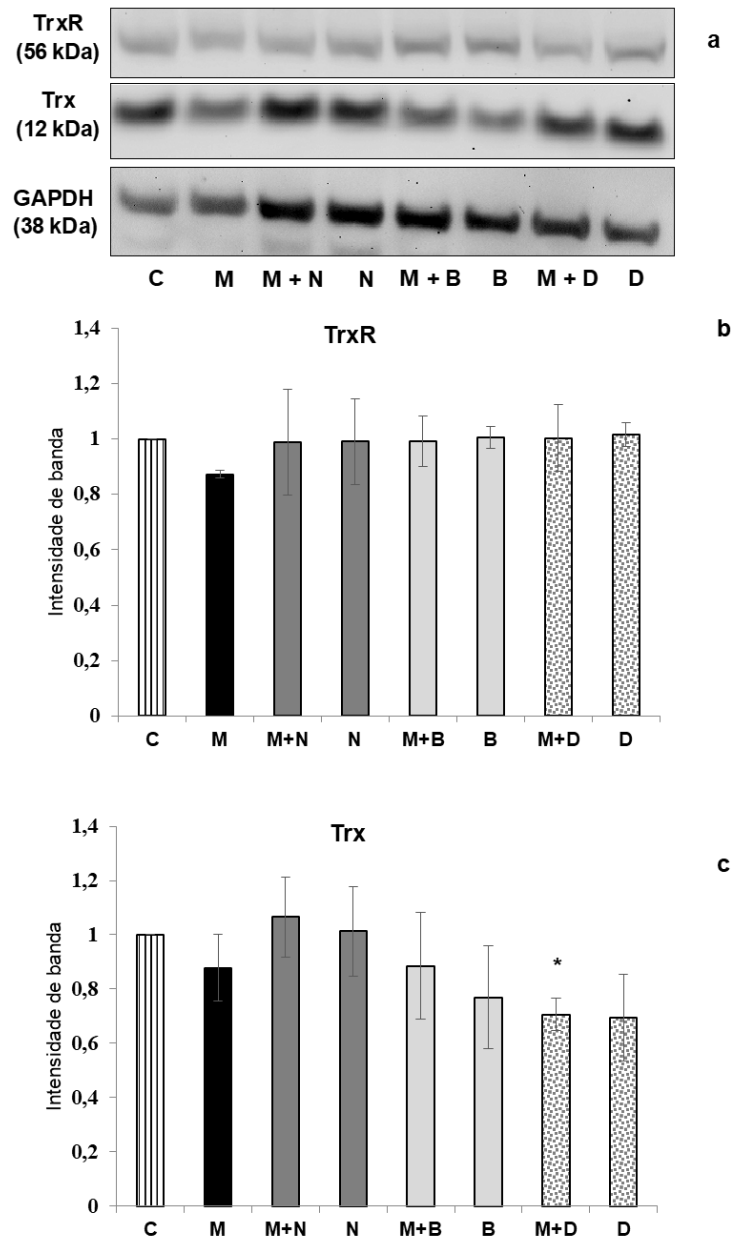


Figura 4.6 - Expressão de TrxR e Trx em células SH-SY5Y expostas a MeHg e/ ou agentes quelantes por 24 h. As imagens de Western blot são representativas de três experiências independentes (a). A intensidade da banda para TrxR (b) e Trx (c) foi quantificada em todas as repetições, normalizada para a expressão de GAPDH. * Diferença estatisticamente significativa para o controle ($p < 0,05$). [C - Controle; M - MeHg; M+N - MeHg com coexposição a [15]anoN₄S; N - [15]anoN₄S; M+B - MeHg com coexposição ao BAL; B - BAL; M+D - MeHg com coexposição a DMSA; D - DMSA.

5. DISCUSSÃO

Os compostos de mercúrio são eletrófilos *soft* que reagem ativamente com grupos tióis e selenóis presentes em resíduos de aminoácidos como a Cys e Sec, respectivamente (62) (94). Os selenóis, por apresentarem um pKa baixo (5,4) a pH fisiológico, encontram-se desprotonados e por isso são alvos preferenciais para compostos de Hg. Na realidade, a TrxR está estabelecida como um alvo celular do MeHg, sendo a sua inibição um evento precoce no desenvolvimento dos processos de morte celular, o qual envolve a oxidação da Trx e iniciação da cascata apoptótica (69). Estes alvos moleculares são por isso extremamente relevantes para a avaliação da eficácia dos agentes quelantes utilizados na prevenção da toxicidade dos compostos de Hg. Trabalhos anteriores realizados com este sistema enzimático que avaliaram a eficiência de agentes quelantes (BAL, DMSA e DMPS) em TrxR inibido por compostos de mercúrio, confirmaram as observações clínicas, ou seja, que os agentes quelantes são mais eficazes no tratamento da exposição ao Hg²⁺ em relação ao MeHg (84).

Neste trabalho pretendemos avaliar se um promissor agente quelante, o macrocíclico [15]anoN₄S, apresenta um melhor desempenho do que os antídotos clínicos tradicionais na mitigação da toxicidade dos compostos de mercúrio com ênfase no MeHg, uma vez que é o composto com maior significado em termos de exposição humana. (20)

À semelhança do observado em trabalhos anteriores (63,84), os resultados com TrxR recombinante de rato revelaram que todos os compostos de Hg (Hg²⁺; EtHg; MeHg) produziram uma forte inibição da atividade de TrxR, diminuindo significativamente a sua capacidade de reduzir o DTNB (Figura.4.2). De igual modo, no ensaio de redução de insulina verificou-se que a inibição da atividade do sistema tioredoxina (Figura.4.3b) por compostos de Hg foi menos significativa do que a observada com o ensaio DTNB (Figura. 4.3a) (63).

Deve assinalar-se que o ensaio de redução de insulina envolve uma organização mais complexa do que o ensaio do DTNB e mimetiza mais proximamente os processos que ocorrem a nível celular onde Trx está em excesso em relação a TrxR. Por isso, uma redistribuição dos compostos de Hg da TrxR para a Trx ou mesmo insulina pode justificar as diferenças observadas entre os dois ensaios.

No entanto, em ambos os ensaios todos os agentes quelantes tiveram capacidade para regenerar a atividade da TrxR (ensaio DTNB) e/ ou do sistema Trx (ensaio de redução de insulina) em extensão semelhante, o que é concordante com estudos anteriores usando BAL, DMSA e DMPS (84).

Nestes ensaios, os agentes quelantes estavam em excesso molar significativo relativamente aos compostos de mercúrio (>200 vezes) e às enzimas do sistema Trx (13 vezes sobre a Trx), refletindo o que é expectável após uma dosagem terapêutica.

Uma vez que a eficiência de um agente quelante está diretamente relacionada com a sua capacidade de formar complexos estáveis com os catiões metálicos (76), o facto da capacidade de recuperação não ser tão eficiente no teste do DTNB, onde apenas TrxR está presente, provavelmente significa que a ligação de todos os três agentes quelantes aos compostos de

mercúrio é mais lábil quando comparada à ligação destes com o selenol no centro ativo do TrxR. Tal pode estar relacionado com o facto de a pH fisiológico (7,4) o selenol estar sob a forma desprotonada, isto é, na forma de selenolato (Se^-) sendo portanto muito mais reativo com eletrófilos (61).

Esta hipótese foi reforçada pelos resultados obtidos nos ensaios em linhas celulares onde se procedeu à coexposição a agentes quelantes e a uma concentração mais elevada e fisiologicamente relevante de MeHg (2,5 μM). Nestas condições nenhum efeito protetor foi observado sobre a atividade do TrxR para qualquer dos agentes quelantes (Figura. 4.5a). Uma vez que nenhuma alteração significativa foi observada na expressão do TrxR (Figura. 4.6), a inibição observada está provavelmente associada com a interação do MeHg com o centro ativo da enzima.

Contudo a atividade da Trx foi totalmente preservada da inibição pelo MeHg durante a coexposição aos quelantes [15]anoN₄S e BAL (Figura.4.5b). Este efeito protetor é toxicologicamente relevante, pois permite que o sistema Trx assegure funções essenciais para a sobrevivência celular, como a regulação antiapoptótica da ASK-1 e a redução da ribonucleotídeo redutase, uma enzima essencial para a síntese de DNA. De facto, embora a TrxR tenha sido inibida pelo MeHg, mesmo no co-tratamento com os agentes quelantes, sabe-se que a atividade da Trx é assegurada por outros mecanismos de *backup* que mantêm o seu *turnover* do estado oxidado para o reduzido (69).

No entanto, o BAL embora apresente capacidade de proteção eficaz da Trx celular relativamente ao MeHg, apresentou efeitos negativos sobre a viabilidade celular ao fim de 24h de exposição (Figura.4.4b). Tal está de acordo com o anteriormente descrito sobre a toxicidade e índice terapêutico limitado deste composto (76). *In vivo* o BAL aumenta a deposição cerebral de MeHg o que limita o seu uso a longo prazo. Pelo contrário o agente quelante [15]anoN₄S não apresentou citotoxicidade significativa na gama de concentração testada (Figura.4.4b).

De realçar ainda o facto de o DMSA, um agente quelante usado como padrão no envenenamento por compostos orgânicos de mercúrio (77), não ter conseguido prevenir a inibição de Trx em células expostas ao MeHg. Na realidade constatou-se que este composto levou a uma diminuição na expressão de Trx (Figura 4.6). Este é um resultado interessante, pois o DMSA normalmente apresenta uma capacidade limitada de atravessar as membranas celulares (90). Tal facto, associado ao efeito inibitório sobre a atividade do TrxR celular (Figura 4.5a), indica que o DMSA, além de ser ineficaz na ligação do MeHg pode mesmo ter efeitos prejudiciais sobre o sistema de tiorredoxina (92).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi avaliada a eficácia de um quelante macrocíclico na prevenção da toxicidade de MeHg, EtHg e Hg²⁺, por comparação com agentes quelantes clínicos padrão, BAL e DMSA.

O quelante [15]anoN₄S apresentou capacidade comparável à do BAL e do DMSA na proteção da atividade de suspensões purificadas do sistema tiorredoxina, excepto para o Hg²⁺.

Nas células, o [15]anoN₄S provou ser menos tóxico do que o BAL e muito mais eficaz do que o DMSA na reversão dos efeitos do MeHg sobre o sistema de tiorredoxina. De fato, embora as experiências com células tenham revelado que nenhum dos agentes quelantes foi capaz de proteger a atividade da TrxR do MeHg, tanto o [15]anoN₄S e o BAL protegeram a atividade da Trx. Uma vez que o sistema tiorredoxina é um alvo altamente relevante no desenvolvimento da toxicidade do MeHg, este resultado é promissor e abre a porta a outros ensaios sobre a capacidade antídoto do [15]anoN₄S, nomeadamente estudos *in vivo*. Isto é especialmente relevante uma vez que o agente quelante [15]anoN₄S apresentou *in vitro* um melhor compromisso entre eficácia e toxicidade quando comparado com dois outros antídotos clinicamente relevantes.

Numa perspectiva futura de prossecução deste trabalho, seria interessante realizar ensaios *in vivo*, nomeadamente em pequenos roedores, para avaliar eficácia e segurança do novo quelante comparativamente aos outros; avaliar a capacidade de alterar a toxicocinética do MeHg, i.e aumentar a excreção e diminuir a acumulação nos órgãos-alvo, e a alteração da interação com alvos-moleculares relevantes (sistema da Trx e glutatona) avaliando também alterações a nível histopatológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Park J-D, Zheng Wei. Human Exposure and Health Effects of Inorganic and Elemental Mercury. *J Prev Med Public Heal*. 2012;45:344–52.
2. UN Environment. Global Mercury Assessment 2018. Geneva; 2018. 1–60 p.
3. Hailemariam K, Bolger PM. Toxic Metals: Mercury. *Encycl Food Saf*. 2013;2:352–5.
4. United Nations Environment Programme. Minamata Convention on Mercury: Text and Annexes. United Nations; 2013. 1–59 p.
5. Guzzi G, La Porta C. Molecular mechanisms triggered by mercury. *Toxicology*. 2008;244:1–12.
6. WHO. Mercury and health [Internet]. factsheets 361. 2017. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>
7. Morel F, Krappiel A, Amyot M. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. *Annu Rev Ecol Syst*. 1998;29:543–66.
8. Branco V. In vivo Mercury Interaction with the thioredoxin system. Universidade de Lisboa; 2012.
9. World Health Organization. Mercury. In: *Air Quality Guidelines*. Second Edi. Copenhagen; 2000. p. 1–15.
10. SCOEL. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for elemental mercury and inorganic divalent mercury compounds. Comissão Europeia; 2007. p. 1–13.
11. Ha E, Basu N, Reilly SB, Dórea JG, Mccorley E, Sakamoto M, et al. Current progress on understanding the impact of mercury on human health. *Environ Res*. 2017;152:419–33.
12. Spiegel SJ. Occupational Health , Mercury Exposure , and Environmental Justice : Learning From Experiences in Tanzania. *Am J Public Health*. 2009;99(S3):550–8.
13. Veiga MM, Maxson PA, Hylander LD. Origin and consumption of mercury in small-scale gold mining. *J Clean Prod*. 2006;14:436–47.
14. WHO FAO. Report of the Joint FAO/WHO expert consultation on the risks and benefits of fish consumption. Vol. 978. 2010.
15. European Commission. Facts and Figures on the Common Fisheries Policy. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2020. 1–49 p.
16. Caetano T, Branco V, Cavaco A, Carvalho C. Risk assessment of methylmercury in pregnant women and newborns in the island of Madeira (Portugal) using exposure biomarkers and food- frequency questionnaires. *J Toxicol Environ Health*. 2019;82(14):833–44.
17. Carvalho CML, Matos AINM, Mateus ML, Santos APM. High-Fish Consumption and Risk Prevention : Assessment of Exposure to Methylmercury in Portugal. *J Toxicol Environ Heal Part A*. 2008;71:1279–88.
18. Nunes E, Cavaco A, Carvalho C. Children’s Health Risk and Benefits of Fish Consumption : Risk Indices Based on a Diet Diary Follow-Up of Two Weeks. *J Toxicol Environ Heal Part A*.

- 2014;77:103–14.
19. Nunes E, Cavaco A, Carvalho C. Exposure Assessment of Pregnant Portuguese Women to Methylmercury Through the Ingestion of Fish: Cross- Sectional Survey and Biomarker Validation. *J Toxicol Environ Heal Part A*. 2014;77:133–42.
 20. Clarkson TW, Laszlo M. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Crit Rev Toxicol*. 2006;36:609–62.
 21. Clements CJ, Ball LK, Ball R, Pratt D. Thiomersal in vaccines. *Lancet*. 2000;355:1279–80.
 22. Burbacher TM, Shen DD, Liberato N, Grant KS, Cernichiari E, Clarkson T. Comparison of Blood and Brain Mercury Levels in Infant Monkeys Exposed to Methylmercury or Vaccines Containing Thimerosal. *Environ Health Perspect*. 2005;113(8):1015–21.
 23. Dórea JG. Exposure to Mercury during the First Six Months via Human Milk and Vaccines : Modifying Risk Factors. *Am J Perinatol*. 2007;24(7):387–400.
 24. Gerstner HB, Huff JE. Clinical toxicology of mercury. *J Toxicol Environ Health*. 1977;2(3):491–526.
 25. Langford NJ, Ferner RE. Toxicity of mercury. *J Hum Hypertens*. 1999;13(March):651–6.
 26. Roels HA, Boeckx M, Ceulemans E, Lauwerys RR. Urinary excretion of mercury after occupational exposure to mercury vapour and influence of the chelating agent meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA). *Br J Ind Med*. 1991;48:247–53.
 27. Bernhoft RA. Mercury Toxicity and Treatment : A Review of the Literature. *J Environ Public Heal*. 2012;2012.
 28. Nordberg GF, Fowle BA, Monica N, editors. Handbook on the Toxicology of Metals [Internet]. 4th ed. Vols. I; II, Handbook on the Toxicology of Metals. Elsevier; 2015. 1027–1089 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044459453200055X>
 29. Warfvinge K. Mercury distribution in the mouse brain after mercury vapour exposure. *Int J Exp Path*. 1995;76:29–35.
 30. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO J*. 2012;(January):9–19.
 31. Rooney JPK. The retention time of inorganic mercury in the brain — A systematic review of the evidence. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2014;274(3):425–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.12.011>
 32. Tao K, Marques GF, Ludvig GC, Antunes SA, T RJ, Marcelo F, et al. Post-translational modifications in MeHg-induced neurotoxicity. *BBA - Mol Basis Dis* [Internet]. 2019;1865(8):2068–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.10.024>
 33. Harris HH, Pickering IJ, George GN. The Chemical Form of Mercury in Fish. *Science*. 2003;301(August 2003):1203–1203.
 34. Nogara PA, Oliveira CS, Schmitz GL, Piquini PC, Farina M. Methylmercury 's chemistry : From the environment to the mammalian brain. *BBA - Gen Subj* [Internet]. 2019;129284. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.01.006>
 35. Farina M, Rocha JBT, Aschner M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity : Evidence from experimental studies. *Life Sci* [Internet]. 2011;89(15–16):555–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.019>

36. Farina M, Rocha JBT, Aschner M. Methylmercury and brain development: a review of recent literature. *J Trace Elem Med Biol.* 2016;38:99–107.
37. Clarkson TW. The Three Modern Faces of Mercury Methyl Mercury in Fish History of Human Exposure. *Environ Health Perspect.* 2002;110(February):11–23.
38. Risher JF, Tucker P. Alkyl Mercury-Induced Toxicity : Multiple Mechanisms of Action. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology vol 240.* Springer International Publishing; 2016.
39. Dórea JG, Farina M, Rocha JBT. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *J Applied Toxicology.* 2013;(September 2012).
40. Branco V, Ramos P, Lu J, Holmgren A, Carvalho C. Biomarkers of Adverse Response to Mercury : Histopathology versus Thioredoxin Reductase Activity. *J of Biomedicine Biotechnol.* 2012;2012:1–9.
41. Bjørklund G, Dadar M, Mutter J, Aaseth J. The toxicology of mercury : Current research and emerging trends. *Environ Res [Internet].* 2017;159(September):545–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.051>
42. Nicola B. Metallic and inorganic mercury poisoning. *Emerg nurse.* 2003;11:25–32.
43. Asano S, Eto K, Kurisaki E, Gunji H, Hiraiwa K, Sato M, et al. Acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. *Pathol Int.* 2000;50:169–74.
44. Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The Toxicology of Mercury — Current Exposures and Clinical Manifestations. *N Engl J Med.* 2003;18(349):1731–7.
45. Huang C, Liu S, Hsu C, Lin-shiau S. Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercuric chloride in developing offspring mice. *Toxicol Lett [Internet].* 2011;201(3):196–204. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.016>
46. Charleston JS, Body RL, Mottet NK, Vahter ME, Burbacher TM. Autometallographic determination of Inorganic Mercury Distribution in the Cortex of Calcarina Sulcus of the Monkey *Macaca fascicularis* Following long-term subclinical Exposure to Methylmercury and Mercuric Chloride. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995;132:325–33.
47. Syversen T, Kaur P. The toxicology of mercury and its compounds. *J Trace Elem Med Biol [Internet].* 2012;26(4):215–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.02.004>
48. Hong Y, Kim Y, Lee K. Methylmercury Exposure and Health Effects. *J Prev Med Public Heal.* 2012;45:353–63.
49. Bellanger M, Pichery C, Aerts D, Berglund M, Castaño A, Mája Č, et al. Economic benefits of methylmercury exposure control in Europe : Monetary value of neurotoxicity prevention. *Environ Heal.* 2013;1–10.
50. Dórea JG. Multiple low-level exposures : Hg interactions with co-occurring neurotoxic substances in early life. *BBA - Gen Subj [Internet].* 2019;1863(12):129243. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.10.015>
51. Jan AT, Azam M, Siddiqui K, Ali A, Choi I. Heavy Metals and Human Health : Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *Int J Mol Sci.* 2015;16:29592–630.
52. Gilbert BHF, Mclean M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. In:

- Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biolog. 1990. p. 69–170.
53. Collet J, Messens J. Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(8).
 54. Liebert MA, Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and Related Molecules—From Biology to Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(1):25–47.
 55. Arne ESJ. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. 2000;267:6102–9.
 56. Holmgren A. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *J Biol Chemistry*. 1989;264(24):13963–6.
 57. Smeets A, Evrard C, Landtmeters M, Marchand C, Knoop B, Declercq J. Crystal structures of oxidized and reduced forms of human mitochondrial thioredoxin 2. *Protein Sci*. 2005;14:2610–21.
 58. Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and Related Molecules – From Biology to Health and Disease. *Antioxidants Redox Signal*. 2007;9(1):25–47.
 59. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J*. 2000;346:1–8.
 60. Williams Jr CH, Arscott LD, Mu S, Lennon BW, Ludwig ML, Wang P. Thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. 2000;267:6110–7.
 61. Holmgren A, Zhong L, Arne ESJ. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase : The active site is a redox-active selenolthiol⁻selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *PNAS*. 2000;97(11):5854–9.
 62. Branco V, Carvalho C. The thioredoxin system as a target for mercury compounds. *BBA Gen Subj*. 2019;1863.
 63. Carvalho CML, Chew E, Hashemy SI, Lu J, Holmgren A. Inhibition of the Human Thioredoxin System. *J Biol Chem*. 2008;283(18):11913–23.
 64. Wataha JC, Lewis JB, Mccloud V V, Shaw M, Omata Y, Lockwood PE, et al. Effect of mercury (II) on Nrf2 , thioredoxin reductase-1 and thioredoxin-1 in human monocytes. *Dent Mater*. 2008;24:765–72.
 65. Rodrigues J, Branco V, Lu J, Holmgren A, Carvalho C. Toxicological effects of thiomersal and ethylmercury: Inhibition of the thioredoxin system and NADP⁺-dependent dehydrogenases of the pentose phosphate pathway. *Toxicol Appl Pharmacol [Internet]*. 2015;286(3):216–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2015.05.002>
 66. Branco V, Canário J, Holmgren A, Carvalho C. Inhibition of the thioredoxin system in the brain and liver of zebra-seabreams exposed to waterborne methylmercury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;251:95–103.
 67. Hansen JM, Zhang H, Jones DP. Differential oxidation of thioredoxin-1 , thioredoxin-2 , and glutathione by metal ions B. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:138–45.
 68. Ruskiewicz JA, Bowman AB, Farina M, Aschner M, Santa UF De, Federal U, et al. Sex- and structure-specific differences in antioxidant responses to methylmercury during early development. *Neurotoxicology*. 2016;56:118–26.
 69. Branco V, Coppo L, Solá S, Lu J, Rodrigues CMP, Holmgren A, et al. Redox Biology Impaired cross-talk between the thioredoxin and glutathione systems is related to ASK-1 mediated apoptosis in neuronal cells exposed to mercury. *Redox Biol [Internet]*.

- 2017;13(May):278–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.024>
70. Crisponi G, Nurchi VM. Chelating Agents as Therapeutic Compounds — Basic Principles. In: Chelation Therapy in the Treatment of Metal Intoxication [Internet]. Elsevier Inc.; 2016. p. 35–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803072-1/00002-X>
 71. George GN, Prince RC, Gailer J, Buttigieg GA, Denton MB, Harris HH, et al. Mercury Binding to the Chelation Therapy Agents DMSA and DMPS , and the Rational Design of Custom Chelators for Mercury . *Chem Res Toxicol*. 2004;17(8):999–1006.
 72. Bose-O'Reilly S, McCarty KM, Steckling NBL. Mercury Exposure and Children's Health. *Curr Probl Pediatr Adolesc Heal Care*. 2010;40(8):186–215.
 73. Sears ME. Chelation : Harnessing and Enhancing Heavy Metal Detoxification — A Review. *Sci World J*. 2013;2013:1–13.
 74. Apostoli PR, Cornelis J, Duffus P, Hoet D, Lison DT. Environmental Health Criteria 234: Elemental speciation in human health risk assesement. 2006.
 75. Aaseth J, Ajsuvakova OP, Skalny AV, Skalnaya MG, Tinkov AA. Chelator combination as therapeutic strategy in mercury and lead poisonings. *Coord Chem Rev* [Internet]. 2018;358:1–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.12.011>
 76. Flora SJS, Pachauri V. Chelation in Metal Intoxication. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7:2745–88.
 77. Djordjevic AB, Aaseth J. A Review on Coordination Properties of Thiol-Containing Chelating Agents Towards Mercury, Cadmium, and Lead. *Molecules*. 2019;24(3247):1–32.
 78. Aaseth J, Aralt M, Cao Y, Andersen O. Chelation in metal intoxication — Principles and paradigms. *J Trace Elem Med Biol*. 2015;31:260–6.
 79. Andersen O. Principles and Recent Developments in Chelation Treatment of Metal Intoxication. *Chem Rev*. 1999;99:263–2710.
 80. Andersen O, Aaseth J. Molecular Mechanisms of in Vivo Metal Chelation : Implications for Clinical Treatment of Metal Intoxications. *Environ Health Perspect*. 2002;110(5):887–90.
 81. Rooney JPK. The role of thiols , dithiols , nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology*. 2007;234:145–56.
 82. Aposhian H. DMSA and DMPS-Water soluble antidotes for heavy metal poisoning. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 1983;23:193–215.
 83. Graziano JH. Role of 2,3-Dimercaptosuccinic Acid in the treatment of heavy metals. *Med Toxicol*. 1986;162:155–62.
 84. Carvalho CML, Lu J, Zhang X, Arne ESJ, Effects A. Effects of selenite and chelating agents on mammalian thioredoxin reductase inhibited by mercury : implications for treatment of mercury poisoning. *FASEB J*. 2011;25:370–81.
 85. Mewis RE, Archibald SJ. Biomedical applications of macrocyclic ligand complexes. *Coord Chem Rev* [Internet]. 2010;254(15–16):1686–712. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.02.025>
 86. Torres N, Gonçalves S, Fernandes AS, Machado JF, Brito MJV De, Oliveira NG, et al. [15]aneN4S: Synthesis, Thermodynamic Studies and Potential Applications in Chelation Therapy. *Molecules*. 2014;19:550–67.

87. Nobre P, Cabral MF, Costa J, Castro-Caldas M, Carvalho C, Branco V. In Vitro Assessment of the Efficacy of a Macrocyclic Chelator in Reversing In Vitro Assessment of the Efficacy of a Macrocyclic Chelator in Reversing Methylmercury Toxicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(4817):1–12.
88. Torres NASL. Desenvolvimento de um novo composto macrocíclico do tipo tia-tetraaza com possível aplicação no tratamento de intoxicações por metais pesados. Universidade de Lisboa; 2013.
89. Fernandes AS, Cabral MF, Costa J, Castro M, Delgado R, Drew MGB, et al. Two macrocyclic pentaaza compounds containing pyridine evaluated as novel chelating agents in copper (II) and nickel (II) overload. *J Inorg Biochem*. 2011;105:410–9.
90. Arnér ESJ, Holmgren A. Measurement of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. *Curr Protoc Toxicol*. 2001;(2000):1–14.
91. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. 1983;65:55–63.
92. Branco V, Godinho-Santos A, Gonçalves J, Lu J, Holmgren A, Carvalho C. Free Radical Biology and Medicine Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition , selenium status , and Nrf-2 activation are determinant factors modulating the toxicity of mercury compounds. *Free Radic Biol Med*. 2014;73:95–105.
93. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
94. Farina M, Aschner M, Rocha JBT. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2011;256(3):405–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.05.001>