



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Curso de Graduação em Biomedicina

SUELLEN CASADO DOS SANTOS

**EFEITO PROTETOR DA FERTILIDADE DO EXTRATO METANÓLICO DAS
FOLHAS DE *Cenostigma microphyllum* FRENTE AO BICLORETO DE
MERCÚRIO ($HgCl_2$) EM MODELO EXPERIMENTAL *in vitro* E *in vivo***

Recife
2024

SUELLEN CASADO DOS SANTOS

**EFEITO PROTETOR DA FERTILIDADE DO EXTRATO METANÓLICO DAS
FOLHAS DE *Cenostigma microphyllum* FRENTE AO BICLORETO DE
MERCÚRIO ($HgCl_2$) EM MODELO EXPERIMENTAL *in vitro* E *in vivo***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia
de Menezes Lima

Coorientadora: Profa. Dra. Rebeca
Xavier da Cunha.

Recife

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Dos Santos, Suellen Casado.

Efeito protetor da fertilidade do extrato metanólico das folhas de *Cenostigma microphyllum* frente ao bicloreto de mercúrio ($HgCl_2$) em modelo experimental *in vitro* e *in vivo* / Suellen Casado Dos Santos. - Recife, 2024.

147 p. : il., tab.

Orientador(a): Profa. Dra. Vera Lúcia De Menezes Lima

Coorientador(a): Profa. Dra. Rebeca Xavier Da Cunha

(Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências, anexos.

1. Plantas Medicinais. 2. *Cenostigma microphyllum*. 3. Fertilidade . 4. Intoxicação por Mercúrio . I. De Menezes Lima, Profa. Dra. Vera Lúcia . (Orientação). II. Da Cunha, Profa. Dra. Rebeca Xavier . (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

SUELLEN CASADO DOS SANTOS

**EFEITO PROTETOR DA FERTILIDADE DO EXTRATO METANÓLICO DAS
FOLHAS DE *Cenostigma microphyllum* FRENTE AO BICLORETO DE
MERCÚRIO ($HgCl_2$) EM MODELO EXPERIMENTAL *in vitro* E *in vivo***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: 02/ 08 /2024

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima
Departamento de Bioquímica- Centro de Biociências (CB)- UFPE

Prof. Dr. João Ricardhis Saturnino de Oliveira
Centro Universitário do
Rio São Francisco – UNIRIOS

Prof. Dr. M.C. Mateus Domingues de Barros
Universidade Federal De Pernambuco – UFPE

Dedico este trabalho aos meus familiares, amigos e a Deus que nunca desistiram de acreditar nos meus sonhos mais profundos e sempre me apoiaram para que eu conseguisse conquistar o que sempre almejei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho.

A Rebeca Xavier da Cunha por confiar e acreditar nos meus sonhos e ideias, me ensinar e por não me desamparar nos momentos em que mais precisei, além de sempre me auxiliar no mundo científico como ninguém, sendo assim, uma coorientadora excepcional, a qual sou extremamente grata, e uma das pessoas que proporcionou a dar á luz esse projeto, principalmente por auxiliar na elucidação de cada ponto, desde cada hipótese até a prática, além de me ensinar a ter confiança em todo processo.

Aos integrantes do laboratório de lipídeos e doenças prevalentes e negligenciadas (LAB-DPN) por toda ajuda e por me ensinarem sobre uma pesquisa de qualidade, pelas discussões a fim de esclarecer e contribuir com esse projeto

Aos meus amigos, Yasmin Vilella, Caique Tavares, Emmanuelly Pereira, Wallace, Jana Rebeca, Eduarda Gomes, Thainá Maria, Karine Souza, Stefany Azevedo, Raissa Arruda, Tereza Moraes, Jhennifer Gabriela, Ailton Junior, Caroline Mayume, Helém Souza, por sempre estarem ao meu lado, mesmo em alguns momentos eu estando distante, por também me incentivarem a continuar e por fazerem parte da minha trajetória e da minha vida, sem dúvidas vocês foram essenciais.

Aos meus pais, Rosangela Casado e Osvaldo Silvestre dos Santos, por me ensinarem a sempre seguir em frente, por me auxiliarem em tudo que sempre almejei, por me proporcionarem a realização desse sonho, mas também por sempre me mostrarem o real sentido de todas coisas, por me ensinarem a ter Fé e confiança, e principalmente por serem os meus maiores exemplos de dedicação e amor, por auxiliarem a me tornar a pessoa que sou hoje, por me apoiarem nos momentos que mais precisei, mesmo quando eu sentia que tudo daria errado, sem vocês nada disso seria possível, não existem palavras que possam descrever a imensa gratidão e amor que sinto por vocês.

A TODOS meus familiares e em especial a minha vó paterna e minha tia avo, Maria Olinda Caires e tia “deide”, por serem grandes exemplos de mulheres e por sempre me ensinarem que com estudo, trabalho, fé, gentileza e respeito conseguimos mover montanhas.

Aos meus avós que já se foram, Dalvino Silvestre, José Augusto, Wagulla Werneck, que carrego em memória em meu coração, cada ensinamento e palavra de conforto que foi me fornecida, por ensinarem que tudo é possível, por iluminarem meus caminhos desde a infância até aos dias atuais, uma vez que mesmo não presentes em vida, ainda carrego comigo tudo que me foi ensinado em minha personalidade e meu viver, queria muito poder dizer ao vivo e a cores a vocês: “a menina maluquinha que quando criança gostava de fingir que era uma profissional da saúde, hoje realmente me tornei, graças a vocês”, no entanto, agradeço *im memoriam*.

A equipe do laboratório de análises clínicas do Hospital Barão de Lucena, em especial, a técnica Rose e Raquel do setor de bacteriologia e coleta, respectivamente, a Nilda, a Hugo do setor de imunologia, a dupla de biomédicos do setor de hematologia, Dimitrius e Erick, por auxiliarem em minha formação, pelos conselhos profissionais e por ensinarem a ter segurança no âmbito trabalhista.

A CNPq, que fomentou este trabalho e contribuiu em todo desenvolvimento.

As auxiliares de enfermagem do Hospital Ipiranga – SP, que têm acompanhado minha trajetória de vida desde o nascimento, agradeço por todo apoio e por também serem exemplos de profissionais.

Ao Dr. Daniel Vidal, agradeço por sempre me apoiar e me aconselhar sobre a área de reprodução.

A Murilo Racy Soares e Larissa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP, agradeço por também aconselharem e mediarem troca de conhecimentos científicos a favor deste projeto.

Por fim, agradeço a Deus e a Nossa Senhora de Aparecida, por sempre promoverem milagres em minha vida e por iluminarem meus passos, tanto academicamente, profissionalmente tanto como “ser” que me tornei e estou me tornando, cheio de fé, bondade, ingenuidade e sabedoria que me é fornecido por eles.

Epígrafes

“Nós nunca descobriremos o que vem depois da escolha, se não tomarmos uma decisão. Por isso, entenda os seus medos, mas jamais deixe que eles sufoquem os seus sonhos” – Alice no País das Maravilhas (1862)

“Alice: isso é impossível!
Chapeleiro: só se você acreditar que é!”
– Chapeleiro Maluco, personagem de Alice no País das Maravilhas (1862).

RESUMO

A intoxicação por mercúrio (Hg) é um problema de saúde global, difícil de diagnosticar devido à ausência de sintomatologia clara e métodos de análise acessíveis. A contaminação pode ocorrer de forma natural ou antropogênica, como no caso do garimpo ilegal, especialmente na região Yanomami, no Brasil. O Hg é um disruptor endocrínico que afeta o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, desregulando o sistema de oxido-redução e causando estresse oxidativo, o que prejudica os gametas e pode ser um fator etiológico da infertilidade, especialmente masculina, que representa 50% dos casos. A população Yanomami, está vivenciando uma situação sanitária crítica e essa também possui uma renda *per capita* equivalente a 1 ou meio salário mínimo e enfrenta dificuldades de acesso a tratamentos de saúde básicos. Como alternativa, tem-se considerado o uso de fitoterápicos, como a *Aloe vera*, que já é utilizada pelas populações locais para tratar infecções genitais, como a prostatite bacteriana. No entanto, ainda não há estudos que comprovem os efeitos protetores dessas e de outras plantas pouco investigadas, no que diz respeito à fertilidade em casos de intoxicação por mercúrio. Com isso, o trabalho tem como objetivo avaliar esse efeito, além das atividades antioxidantes, anti-ferroptótica e anti-inflamatória do extrato metanólico das folhas de *Cenostigma microphyllum* (EMCm), pela exposição exógena ao bicloreto de mercúrio ($HgCl_2$) em camundongos machos (*Mus musculus*). Para isto, utilizou-se métodos para quantificação de antioxidantes, metabólitos secundários e sequestro de radicais, como a capacidade antioxidant total (CAT), polifenóis, captura de H_2O_2 , $OH\bullet$, DPPH e inibição do ABTS+, além das técnicas da antiproteinase, anti-hemolítica *in vitro* e *in vivo* realizou-se a dosagem férrica testicular, o espermograma básico, com contagem total, motilidade, viabilidade e reação acrossomal e no avançado foram realizados testes de DNA, com anilina e toluidina azuis. O EMCm apresentou na concentração de 1 mg/mL valores significativos de flavonoides ($66,44 \pm 0,06$ mgEqQ/g) e de CAT com $56,22 \pm 0,00$ %, os quais tem a capacidade de interagir com a membrana fosfolipídica e protegê-la contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs). Isso foi evidenciado também pela inibição de $86,4 \pm 0,05$ % da lise de eritrócitos em uma concentração de 0,25 mg/mL, indicando um caráter protetor para a bicamada e atóxico. Além disso, o EMCm se mostrou eficiente no sequestro do radical $OH\bullet$, um agente central na peroxidação lipídica, com inibições de $33,8 \pm 0,03$ % e $27,41 \pm 0,03$ % nas concentrações de 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL, respectivamente. O extrato também contribuiu para a redução dos níveis de ferro total nas concentrações administradas (50-200 mg/kg), com valores de 64,64, 135,32 e 170,27 μ g/dl, respectivamente. O EMCm ajudou a preservar a integridade da reação acrossomal ($109,33 \pm 16,51$) e contribuiu para a manutenção das histonas em $5,08 \pm 0,61$ % na concentração de 100 mg/kg, protegendo o material genético espermático. Portanto, o EMCm pode atenuar os danos causados pela intoxicação por $HgCl_2$ e preservar a integridade espermática, sendo um aliado eficaz no combate à peroxidação lipídica, ferroptose e processos inflamatórios, auxiliando no combate aos fatores que desencadeiam a infertilidade masculina.

Palavras-chave: *Cenostigma microphyllum*. Fertilidade. Mercúrio. Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Mercury (Hg) poisoning is a global health issue that is difficult to diagnose due to the absence of clear symptoms and accessible analytical methods. Contamination can occur naturally or anthropogenically, as in the case of illegal mining, especially in the Yanomami region of Brazil. Hg is an endocrine disruptor that affects the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, disrupting the redox system and causing oxidative stress, which harms gametes and can be an etiological factor for infertility, especially male infertility, which accounts for 50% of cases. Yanomami population is experiencing a critical health situation, with a per capita income equivalent to 1 or half of the minimum wage and faces difficulties in accessing basic healthcare treatments. As an alternative, use of phytotherapeutics, such as *Aloe vera*, has been considered, as it is already used by local populations to treat genital infections, such as bacterial prostatitis. However, there are still no studies proving the protective effects of these and other little-investigated plants regarding fertility in cases of mercury poisoning. Thus, this study aims to evaluate these effects, as well as the antioxidant, anti-ferroptotic, and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of *Cenostigma microphyllum* (EMCm) following exogenous exposure to mercuric chloride ($HgCl_2$) in male mice (*Mus musculus*). Methods were used to quantify antioxidants, secondary metabolites, and radical sequestration, such as total antioxidant capacity (CAT), polyphenols, capture H_2O_2 , $OH\bullet$, DPPH, and ABTS+ inhibition. Additionally, in vitro antiproteinase and anti-hemolytic techniques were used, and in vivo tests included testicular ferric dosages, basic sperm analysis (total count, motility, viability, and acrosomal reaction), and advanced DNA tests using aniline and toluidine blue. EMCm at a concentration of 1 mg/mL showed significant levels of flavonoids (66.44 ± 0.06 mgEqQ/g) and CAT ($56.22 \pm 0.00\%$), which can interact with the phospholipid membrane and protect it against damage caused by reactive oxygen species (ROS). This was also evidenced by the inhibition of $86.4 \pm 0.05\%$ of erythrocyte lysis at a concentration of 0.25 mg/mL, indicating a protective and non-toxic effect on the bilayer. Furthermore, EMCm was effective in sequestering the $OH\bullet$ radical, a central agent in lipid peroxidation, with inhibitions of $33.8 \pm 0.03\%$ and $27.41 \pm 0.03\%$ at concentrations of 0.5 mg/mL and 0.25 mg/mL, respectively. Extract also contributed to reducing total iron levels in the administered concentrations (50-200 mg/kg), with values of 64.64, 135.32, and 170.27 μ g/dL, respectively. EMCm helped preserve the integrity of the acrosomal reaction ($109.33 \pm 16.51\%$) and contributed to the maintenance of histones at $5.08 \pm 0.61\%$ at a concentration of 100 mg/kg, protecting sperm genetic material. Therefore, EMCm can attenuate the damage caused by $HgCl_2$ poisoning and preserve sperm integrity, making it an effective ally in combating lipid peroxidation, ferroptosis, and inflammatory processes, helping to counter the factors that trigger male infertility.

Keywords: *Cenostigma microphyllum*. Fertility. Mercury. Oxidative Stress.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Intoxicação por metais pesados.....	14
2.2 Intoxicação por Mercúrio (Hg).....	17
2.2.1 Breve Histórico da utilização do Mercúrio no Brasil e no Mundo	17
2.2.2 Epidemiologia de intoxicação por Hg	21
2.2.3 Especiações do Hg, Biotransformação e Metilação	37
2.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e Nitrogênio (ERNS) e Estresse Oxidativo (EO).....	45
2.3.1 Funções fisiológicas, patológicas e mecanismo transcricionais das EROs e ERNs	48
2.3.1 Influência das EROs e ERNs no desencadeamento inflamatório	52
2.3.2 Radicais lipídicos e a peroxidação lipídica: são agentes finalizadores benéficos ou maléficos das espécies reativas?.....	55
2.3.3 Ferroptose: um novo modo de levar a estrutura celular a morte	58
2.4 Infertilidade masculina: aspectos epidemiológicos e a interferência do Hg e seus desdobramentos	66
2.5 Fitoterápicos e plantas medicinais: grandes auxiliadores terapêuticos.....	76
2.5.1 <i>Cenostigma microphyllum</i>	81
3 OBJETIVOS.....	84
3.1 Objetivo geral.....	84
3.2 Objetivos Específicos.....	84
4 METODOLOGIA.....	85
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
6 CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS	109
ANEXO A.....	146

1. INTRODUÇÃO

Metais pesados, podem ser classificados como agentes toxicantes, quando apresentam densidade $> 5 \text{ g/cm}^3$, dentre eles estão alguns metais de transição, como o Cadmio (Cd), Chumbo (Pb), Arsênico (As) e seus metaloides (Pourret *et al.*, 2019), sendo que todos esses podem levar a infertilidade ou serem teratogênicos, contudo, especialistas ainda destacam o mercúrio (Hg) e suas especiações como o principal gerador desses danos (Manouchehri *et al.*, 2022; Mukherjee *et al.*, 2023).

A intoxicação por Hg ainda é considerada um dos problemas de saúde global pela OMS, principalmente devido as atividades de mineração artesanal e de pequena escala (ASGM) e as indústrias, apesar de existirem estratégias para que haja a redução desse de acordo com a convenção de Minamata (Minamata Convention on Mercury, 2023). Recentemente, no Brasil, a população da ribeirinha e indígena, principalmente o povo originário Yanomami, na região Norte, têm sofrido com a contaminação dos peixes e com a exposição de seus habitantes por Hg, frutos do garimpo ilegal ou de ASGM, sendo que a maioria dos trabalhadores das ASGM, são do sexo masculino e possuem contato direto com Hg, devido ao processo extractivo do ouro, por amálgama (Basta *et al.*, 2016; Vega *et al.*, 2018).

Entretanto, existem divergências epidemiológicas que dificultam a quantificação e a qualidade dos estudos que avaliam esses parâmetros, principalmente por não haver um consenso sobre a utilização dos valores referenciais recomendados pela UNEP (2018), considerada uma das agências fiscalizações ambientais, e os autores dos estudos de epidemiologia do Hg (Abbas *et al.*, 2020; Basu *et al.*, 2023).

Além disso, existem inúmeras técnicas que determinam a quantidade de Hg nos indivíduos que foram expostos, no entanto, todas elas, incluindo a espectrofotometria de absorção atômica, a qual é a mais utilizada para o diagnóstico do metal em questão (Chanihoon *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2021; Rabiu *et al.*, 2020), são consideradas de alto custo e de difícil acesso, pois necessitam de um grande investimento para manutenção dos equipamentos, além de uma mão de obra especializada (Júnior *et al.*, 2019).

Ainda existem outras implicações que podem dificultar esse processo, como o acesso a áreas de comunidades ribeirinhas e as manifestações clínicas inespecíficas da intoxicação por Hg e outras patologias (Vianna *et al.*, 2019), principalmente pela presença de formigamentos nos membros superiores e inferiores, diarreias (WHO,

2024), perda de coordenação e sintomas neurológicos (cefaleia, tontura e insônia) (Khoury *et al.*, 2013), fraqueza muscular e erupções cutâneas (Podgórska *et al.*, 2020), o que torna ainda mais difícil a semiologia médica e a apuração da real gravidade do problema.

A exposição por metais de transição tóxicos ao organismo, como o Hg, pode inicialmente provocar o desequilíbrio nas espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), levando ao aumento da formação de ácidos graxos poli-insaturados e de seus subprodutos secundários, que podem interagir com a membrana composta por uma bicamada de fosfolipídicos promovendo sua quebra, além de levar a outros efeitos, como a fragmentação de DNA, modificando suas proteínas e lisando o arcabouço espermático, mas também diminuindo a capacidade antioxidante total, levando ao aumento de produtos proteicos avançados de oxidação, de mediadores inflamatórios e de uma atividade proteolítica incontrolável (Haidar *et al.*, 2023; Shit *et al.*, 2023).

A utilização de compostos naturais está crescendo, principalmente pela sua biodisponibilidade, além do custo-benefício e pelas suas atividades biológicas, já bem descritas na literatura, como a atividade antioxidante, porém ainda existem espécies ainda pouco exploradas e que são comumente utilizadas pela população como a *Cenostigma microphyllum*, considerada pelos locais uma planta, pertencente ao bioma da caatinga, capaz de auxiliar no combate de enfermidades no trato gástrico (Gagnon *et al.*, 2016), no entanto, ainda há a necessidade de investigar demais potenciais que esta pode ter. Avaliar parâmetros, como exemplo, os reprodutivos, se faz importante, tanto em relação a infertilidade gerada por metais quanto pela toxicidade dos compostos medicinais, uma vez que esses muitas vezes são utilizados sem comprovação científica, podendo prejudicar o organismo, a exemplo da *Cenostigma pyramidalis* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis (Fabaceae), pertencente ao mesmo gênero e família, cujo é descrita como teratogênica para ruminantes, gerando má formações e perda embrionária precoce (Bezerra *et al.*, 2024). Por estes motivos e por haver poucas pesquisas, no Brasil, relacionadas com a contaminação por metais pesados (Rumiato *et al.*, 2017) se dá a importância do presente projeto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Intoxicação por metais pesados

Os metais pesados são caracterizados de duas diferentes formas:

- Aqueles considerados essenciais para a nutrição e homeostase do corpo, como sódio (Na^{2+}), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e ferro (Fe^{2+}) (Alghamdi *et al.*, 2022), sendo este último também utilizado atualmente como agente quelante em pacientes talassêmicos (Locke *et al.*, 2022);
- Aqueles classificados como tóxicos (como Mercúrio (Hg), Chumbo (Pb), Cádmio (Cd), Arsênico (As) e metaloides), devido à alta densidade (mais de 5 g/cm^3), mas também por possuírem propriedades capazes de interagirem com funções biológicas, prejudicando-as, como o poder de ligação com selenoproteínas, além da facilidade de se bioacumularem em tecidos, bem como o acúmulo desses em cadeias tróficas, processo denominado de biomagnificação, e por serem de difícil decomposição decorrente da sua estrutura química concentrando-se no ambiente e em ecossistema (Pourret *et al.*, 2019).

Em junho de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS), alertou cerca de dez compostos químicos, sendo quatro metais pesados (como Cd, Pb, Hg, As e seus metaloides) capazes de ocasionar danos à saúde pública global (OMS, 2020). São atribuídas diversas maneiras de exposição a estes, sendo as mais comuns: acidental (como a contaminação do solo, ar e água) e/ou ocupacional (Witkowska *et al.*, 2021). Ainda que sejam considerados elementos tóxicos, existem limites aceitáveis desses metais nos alimentos e na água, de acordo com agências reguladoras, como a U.S EPA-IRIS (do inglês, “*United States Envoriment Protection Agency - Integrated Risk Information System*”), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Organização da Agricultura e Alimentos da Organização Mundial da Saúde (do inglês, “*Food and Agricultural Organization/World Health Organization*” (FAO/WHO)), sendo demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Níveis aceitáveis de metais pesados de ingestão em alimentos e água

Metal Pesado/ Metaloide	Valor Limite
As Inorgânico	0,3 µg/kg/ dia ^a 200 µg/kg para adultos ^b 100 µg/kg para crianças ^b
Cd	1 µg/kg/ dia ^a 5- 10 µg/L para crianças ^b 2,5 µg/kg/ semana para adultos ^d
Pb	0,26 µg/kg/ dia ^a Adultos (80 kg) 0,16 µg/kg/ dia ^a Crianças (11 kg 1 ano) 0,26 µg/kg/ dia ^a
Hg	0,1 µg/kg/ dia ^a 2 µg/L para crianças ^b 1,3 µg/kg/ semana para adultos ^c

Fonte: Adaptado de Wong *et al.* (2022)^a; Bair (2022)^b; EFSA (2012)^c; EFSA (2009)^d.

A investigação epidemiológica da exposição a esses químicos e seus respectivos efeitos adversos ainda é muito incerta, muitas vezes devido a qualidade dos dados quantitativos e vieses potenciais (como a identificação do evento e a forma de exposição ao agente químico ou a avaliação de dose-resposta), sendo assim raramente possível obter avaliações de risco e tomadas de decisões (Déglis *et al.*, 2021). Embora haja propostas de estudos e/ou instrumentos a fim de contribuir com este objetivo, como o Instrumento de Biomonitoramento, Epidemiologia Ambiental e Produtos Químicos de Curta Duração (do inglês, “*Biomonitoring, Environmental Epidemiology, and Short-lived Chemicals*” (BEES-C)) (Lakind *et al.*, 2014) ou a Rede Nacional de Rastreamento de Saúde Pública Ambiental (do inglês, “*National Environmental Public Health Tracking Network*” do Centro de Controle de Doenças (CDC)) (Aylward *et al.*, 2013).

A exposição aos metais pesados apresenta alguns sintomas e sinais inespecíficos (como fadiga, cefaleia, tremores, insônia, dores abdominais, rash cutâneo, entre outros), sendo assim há uma dificuldade de se obter clareza quanto a semiologia bem como o diagnóstico (Martin *et al.*, 2009). Além disso, suas consequências para o organismo são divididas de acordo com a periodicidade com o qual ocorrem, podendo ser a longo prazo (crônicos), ou a curta prazo, ou imediatos (agudos ou subagudos)

(Bharti *et al.*, 2022), além de conter variações devido ao modo de exposição a depender do sítio afetado (Chakraborti *et al.*, 2016).

Quando relacionados ao âmbito laboratorial, são facilmente confundíveis com as síndromes mielodisplásicas (SMD) e a intoxicação por arsênico, por cursarem, em sua maioria, com alterações hematológicas comuns: anemia, plaquetopenia, leucopenia (citopenias) e dismielopoiese (Natelson *et al.*, 2013).

Também pode ter aspectos trocados laboratorialmente com a anemia hemolítica ocasionada pela deficiência metabólica de 5' pirimidina nucleotidase (P5N) e a contaminação por Cd e Pb, por induzirem a eritrofagocitose, externalizarem a fosfaditilserina nas hemácias e pelo aparecimento de inclusões como o pontilhado basófilo (Souza *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2020). Em uma revisão sistemática realizada no ano de 2019, considerando indivíduos que foram expostos tanto pelas vias de contaminação antropogênicas (ocupacionais) quanto pelas naturais ao Hg, 2.376 desses estudos relataram os seguintes distúrbios hematológicos: anemia (876 estudos), linfocitose (361) e linfopenia (306) e na análise medular 13 identificaram a presença do metal, sendo que em 6, a linfocitose correlacionou-se com o toxicante, nas especiações do mercúrio inorgânico ou metálico (Vianna *et al.*, 2019).

Por outro lado, todas essas espécies químicas tóxicas citadas acima, podem afetar vias de sinalizações bioquímicas específicas, por exemplo, o NK-k β (do inglês, “*factor nuclear kappa β* ”), WNT/ β -catenina (do inglês, “*Wingless-related integration site / β -catenin*”) e PI3K/AKT (do inglês, “*phosphoinositide 3-kinase/A serine/threonine protein kinase*”), que auxiliam no surgimento do processo neoangiogênico e posteriormente na transformação de células malignas (Haidar *et al.*, 2023). A partir disso, ao interagirem com sistemas biológicos causam inúmeras alterações podendo ser de caráter irreversível (como a apoptose, danos ao DNA e as membranas) e/ou reversíveis (a exemplo, a diminuição dos níveis de antioxidantes) (Shit *et al.*, 2023).

Além disso, já é bem relatado na literatura a perturbação no equilíbrio REDOX promovido pelos toxicantes ao organismo, originando espécies reativas de oxigênios (EROs) e por fim o estresse oxidativo (EO), o qual pode levar a formação de ácidos graxos de polinsaturados (do inglês, “*polyunsaturated fatty acids*” - PUFAs) prejudicando a estrutura da membrana celular e destruindo-a (Paithankar *et al.*, 2021). Com isso, o objetivo principal do trabalho é correlacionar os efeitos ocasionados por

metais pesados, em especial o Hg, no sistema reprodutivo e nos danos promovidos à fertilidade, principalmente no aparelho masculino, mas também de encontrar alternativas terapêuticas financeiramente viáveis e acessíveis a fim de auxiliar a comunidade, portanto sendo de extrema importância, uma vez que no Brasil, há poucas pesquisas relacionadas com a contaminação por metais pesados (Rumiato *et al.*, 2017).

2.2 Intoxicação por Mercúrio (Hg)

2.2.1 Breve Histórico da utilização do Mercúrio no Brasil e no Mundo

O primeiro registro realizado do mercúrio foi feito pelo filósofo Aristóteles em 4.000 a.C., na Grécia Antiga, o qual descreve o metal como “prata rápida ou fluida”, justamente por apresentar um “aspecto metálico brilhoso e viscosidade característica”, sendo este utilizado, na época para curar doenças de pele (Johnson *et al.*, 2020).

Além do uso terapêutico, há relatos que indicam seu uso como pigmento (cinábrio, substância de cor vermelha presente no sulfeto de mercúrio (HgS), mais conhecida como “vermelhão”), utilizado de diversas maneiras desde a conservação de ossos humanos, no período Neolítico (> 4.000 a.C.) ou até em cosméticos pela medicina tradicional chinesa (Goldwalter, 1972). Tal coloração, chamava bastante atenção e por este motivo tornou-se objeto raro sendo utilizado somente pela realeza e considerada como “elixir da imortalidade” por Nicolas Flamel (1330-1418), por acreditar que tal metal era capaz de se transmutar em ouro (Farrar *et al.*, 1997). Mais adiante, entre os anos de 1600- 1720, o metal serviu como substância fundamental para fabricação de aparelhos hospitalares e meteorológicos, como o termômetro e o barômetro, criado respectivamente por Fahrenheit e Torricelli (Fleming *et al.*, 1996).

Embora haja registros do uso de Hg para realizar a mineração do Au por amálgama (processo extrativo), em 1.000 d.C., justamente pela sua afinidade ao Au, por encobri-lo e purificá-lo após a evaporação (Okamoto *et al.*, 1989). A intoxicação exógena por mercúrio teve seu aumento concomitante com a exploração do ouro (Au) e com processo de industrialização e modernização das cidades em 1799, na Revolução Industrial (Parsons *et al.*, 2005).

Além disso, nessa mesma época, as fábricas produziam feltro para chapéus e a substância utilizada para colorir era o nitrato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$), que possuía

uma tonalidade alaranjada (processo pelo qual recebeu o nome de “carrotting”, do inglês), este marco ficou conhecido em um clássico infanto- juvenil de Lewis Carol, através de um de seus personagens, o “chapeleiro maluco” de “Alice no País das Maravilhas” (1820), o qual intoxicou-se e adquiriu uma síndrome neurológica característica, composta principalmente por alucinações e irritabilidade constante, denominada eretismo (Silva *et al.*, 2017).

Tendo em vista isso, a atividade explorativa tornou-se tão rentável que passou a ser conhecida, em determinados continentes (por exemplo, Ásia, África e América do Sul), como a mineração de ouro artesanal e em pequena escala baseada em mercúrio (do inglês, “*Mercury-dependent artisanal and small-scale gold mining*” (ASGM)), expondo cerca de 10-19 milhões de mineradores, estando dentre eles 5-6 milhões de mulheres e crianças, além da contaminação ambiental com 1.000 toneladas de emissão de Hg por ano (Esdaile *et al.*, 2018).

No Brasil, a atividade explorativa por ouro ficou marcada nos primeiros 60 anos do século XVII, durante o período colonial e também no ciclo do ouro, se perdurando até os dias atuais, entretanto, a prática do garimpo é considerada ilegal e informal em determinadas localidades, como em reservas indígenas e punível pela lei de nº 7.802, de julho de 1989 (Silva *et al.*, 2022; Brasil, 1989).

Além disso, alguns autores consideram que o avanço do processo industrial e da mineração de forma artesanal, no Brasil, promoveram o aumento de modo significativo das emissões de mercúrio antrópicas, apesar de existir o metal de forma natural na crosta terrestre (Poulin; Gibb, 2008). Contudo, essas emissões e as explorações auríferas podem trazer riscos ao planeta e a população, como a exposição a agentes potencialmente tóxicos, devido ao método de extração (Figura 1).

Figura 1 – Fotografia de destilador e queimador a gás para realizar amalgama, na comunidade de Tapajós- AM



Fonte: Fritz *et al.* (2024)

Esse modo de extração produz rejeitos de mercúrio ou a emissão de gás poluente, como o gás carbônico (CO_2) em grandes quantidades, como foi visto em um estudo realizado na comunidade de Tapajós, na Região Amazônica, em que o autor revela que o Hg utilizado muitas das vezes é fruto de reprocesso, conhecido como retorta ou rejeito, o qual é armazenado em poços (dragas), por ser economicamente mais viável e também por acreditarem que facilitaria obter um maior teor de ouro (Fritz *et al.*, 2024). Além disso, outros autores revelam que este tipo de economia contribui com cerca de 12% da emissão de Hg na atmosfera e 0,63% da concentração total de Hg no solo, além de ocasionar cerca de 1.430 mortes da população global a cada ano, o que corresponde a um gasto na saúde no mundo de cerca de US\$ 319 milhões (Pang *et al.*, 2022).

Mediante a esses problemas, pesquisadores consideram a exposição ocupacional crônica ao mercúrio, como hidrargirismo ou mercuralismo metálico crônico ocupacional (MMCO) (Faria, 2003), que atualmente é enquadrado na Classificação Internacional de Doenças (CID) (T56.1- Efeitos Tóxico do Mercúrio e seus Compostos).

No Brasil, o Hg e a amalgama eram também bastante utilizados em aparelhos de aferição de pressão, de temperatura e em produtos odontológicos, respectivamente, no entanto, foi criado a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) de nº 145/2017; nº 173/2017 e nº 222/2018 que passaram a entrar em rigor em 1º de

janeiro de 2019, estas incluem a proibição pela Anvisa (Agência Nacional Vigilância Sanitária) do uso e comércio de aparelhos para aferição de pressão e de temperatura, que utilizam como base o Hg em atendimentos relacionados a área da saúde. Além da proibição de produtos odontológicos com amalgama, sendo liberado apenas o uso residencial deste, isto é, para que aqueles que já o possuem (Brasil, 2017).

Atualmente, o mercúrio é bastante utilizado globalmente nas vacinas de vias parentais (intramusculares) (por exemplo, Difetria-tetáno-pertusio (DTP), Hepatite B, *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib), Bacilo Calmette- Guérin (BCG) e Sarampo, caxumba e rubéola (SCR)) o qual tem a função de ser um conservante contra fungos e agentes bacterianos, sendo metabolizado em uma das suas formas orgânicas: o etilmercúrio e o tiosalicilato, mais conhecido como timerosal, sendo estas aplicadas logo na primeira infância (desde o nascimento até 14 semanas), em dois esquemas diferentes (Clements *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2022). Esse tópico já foi associado ao autismo em um estudo publicado em 1998 por Andrew Wakefield, com diversos casos epidemiológicos e clínicos, entretanto a Organização Pan-americana da Saúde (OPAS/OMS) considerou este como falho e a revista fez sua respectiva remoção (Godlee *et al.*, 2011).

Grandes organizações consideram diferentes níveis de tiomersal nas vacinas, como OMS e EPA, atribuindo valores de 3,3 µg/kg/semana e 0,7 µg/kg/semana, respectivamente, além de não relatarem sua utilização como potencialmente tóxica, uma vez que a meia vida biológica da espécie química é expressivamente ínfima comparado ao MetHg, ou ocasionar qualquer neurotoxicidade ou o desenvolvimento do transtorno do espectro autista (Dorea, 2007; EPA U.S, 2018; Pires, 2018; WHO, 2006).

Mundialmente, um acontecimento histórico que ficou marcado até os dias atuais, ocorreu no Japão, em meados de 1950, na comunidade de Minamata, por ingestão de peixes e água contaminados com uma das especiações mais tóxicas do Hg, o metil mercúrio (MetHg), que era produzido por uma fábrica de produção de acetileno, o ocorrido ficou conhecido como desastre de Minamata (D'Itri *et al.*, 1978). Além disso, até março de 2011, cerca de 2.771 pessoas foram oficialmente reconhecidas com a doença de Minamata (por cursar, principalmente com sintomas neurológicos devido a intoxicação) (Yoyrifuji *et al.*, 2023).

Por conta deste incidente, em 2013, 10 anos após, Suíça e Noruega indicaram um instrumento jurídico que pudesse informar sobre os efeitos adversos e consequências sobre o Hg, foi criado pela UNEP (do inglês, *United Nations Environment Programme*), a Convenção de Minamata, que tem como objetivo reduzir, atualizar, educar e informar sobre o metal pesado e suas especiações em todos os âmbitos (como o industrial - queima de carvão, refinamento de óleo, resíduos e produções de cimento -, o cosmético, o odontológico, pelas ASGM e pelo descarte inadequado de produtos, como lâmpadas e baterias) (UNEP, 2013; Kessler *et al.*, 2013). A última convenção (Quinta reunião da Conferência das Partes na Convenção de Minamata sobre o Mercúrio (COP-5)), ocorreu em Geneve- Suiça, em 30 de outubro de 2023 e contou com 140 países participantes, incluindo o Brasil, onde foram atualizados os 35 artigos que compõem o documento informativo de mesmo nome (Minamata Convention on Mercury, 2023).

2.2.2 Sintomatologia e epidemiologia de intoxicação por Hg

A epidemiologia de exposição ao mercúrio no humano é baseada na biomonitorização, através de fluidos biológicos, como urina e sangue, estes revelam de forma direta a gravidade da exposição, bem como a diversidade dos danos ocasionados no metabolismo e na excreção desses pacientes (WHO, 2018; WHO, 2018). Além disso, segundo a *European Food Safety Authority*, atualmente o cabelo pode ser utilizado para obter uma correlação entre o metil mercúrio (MetHg) e a bioacumulação nas comunidades (EFSA, 2015), já o sangue total é considerado um excelente marcador para os períodos agudos para ambas as especiações de Hg (orgânica e inorgânica) (Mccomb *et al.*, 2014; Ye *et al.*, 2016).

A forma indireta de diagnóstico é baseada na sintomatologia, que costuma ser confundidas com outras condições, o que resulta em atrasos no diagnóstico e no início do tratamento adequado (Johnson-Arbor *et al.*, 2021). Apesar disso, existem alguns padrões sintomatológicos que são característicos da exposição independentemente da via de contaminação, no entanto, a maioria dos indivíduos não os apresenta, conforme Tabela 2, a qual demonstra os sinais e sintomas específicos e inespecíficos.

Tabela 2- Sintomatologia da intoxicação por especiações de Hg (Elementar (Hg⁰), Inorgânico (Hg²⁺), Orgânico (MetHg))

Sintomas	Inespecíficos	Específicos
----------	---------------	-------------

Neurológicos	Ansiedade, insônia, pesadelos, síncope, perda de memória, cefaleia, depressão, anorexia, irritabilidade, sudorese noturna, tremores, esquizofrenia, hiperatividade, convulsão, alucinações, Parksionismo	Doença de Minamata (degeneração cerebelar seguida de atrofia da camada granular e dano córtex central e temporal)
Urológicos	Impotência urinária, fluxo de micção diminuído, sentido de urina residual, anuria, síndromes autoimunes renais (nefrótica, glomerulonefrite, necrose tubular),	NR
Dermatológicos e Circulatórios	Isquemia, lesões eritematosas, cianose, erupções cutâneas, pruído, dermatite urticariforme, edema em membros inferiores, hipertensão e eventos tromboembólicos (CIVD, trombose, aterosclerose), lesões cutâneas semelhantes a cloracne,	Acroderma ("pink disease", pacientes pediátricos)
Oftalmológicos	Acuidade visual diminuída, turvação da visão, neuropatia ótica	Síndrome de Hunter Russel (tríade: ataxia cerebelar, disartria e constrição do campo)

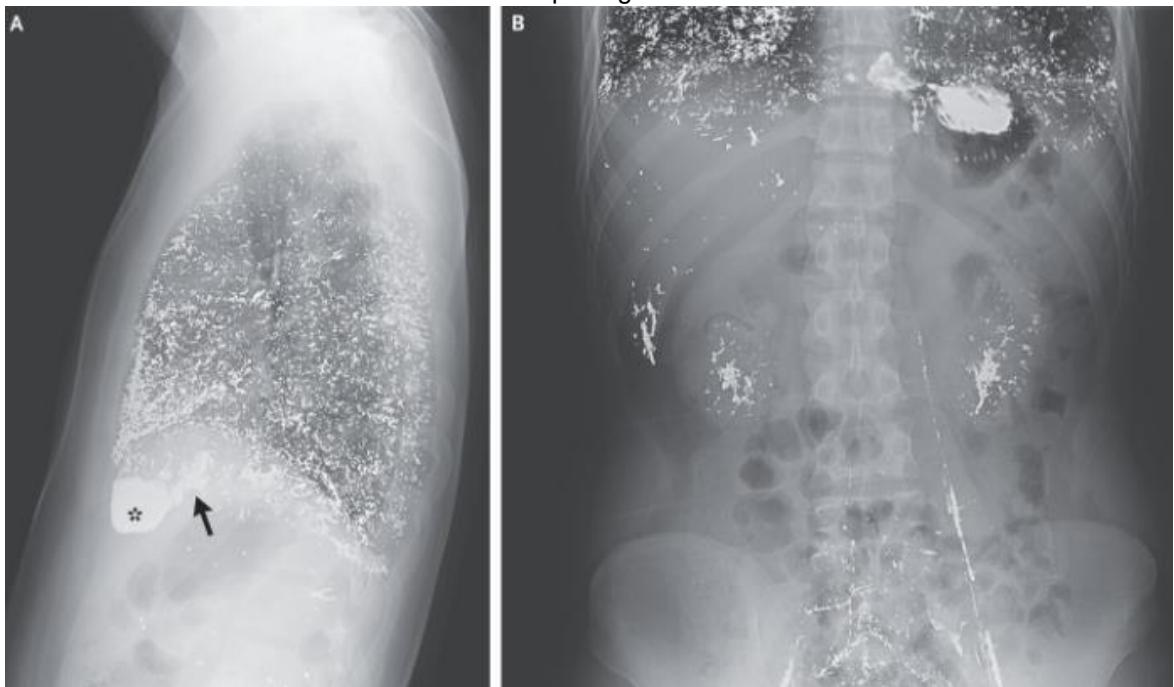
		visual)
Neuromusculares	Artromialgias e mialgias, Síndrome autoimune de Morvan (autoanticorpos contra canais de potássio)	Tremor mercurial (tremor postural espasmódico), Espasmos mioclônicos grosseiros (“ <i>Danbury shakes</i> ”)
Outros	Dor torácica (densidade metálica pontuadas nas radiográficas) e abdominal, febre, calafrios, diarreia, fadiga, dispneia, perda de peso	NR

NR= não relatado

Fonte: Adaptado de Houston *et al.* (2011); Vahabzadeh *et al.* (2016); Do *et al.* (2017); Johnson-Arbor *et al.* (2021); Ganguly *et al.* (2022).

Diante disso, em novembro de 2022, foi publicado no periódico NEJM (*The New England Journal of Medicine*), um caso clínico em que o paciente apresentava sintomatologia incerta, como fadiga, náusea com presença de calafrios, contudo ao solicitar uma radiografia foi localizado nas regiões pulmonares e no abdômen uma opacidade difusa ocasionado por Hg (Figura 2) (Feng *et al.*, 2022).

Figura 2– Exames de imagem realizadas por meio de Raio-x (A e B) em paciente contaminado por Hg



Legenda: *região pulmonar e abdômen com opacidade difusa; (→) inclusões metálicas devido ao Hg.

Fonte: Feng *et al.* (2022)

De acordo com Johnson-Arbor *et al.* (2021), é necessário que haja uma compreensão mais aprofundada das manifestações clínicas da intoxicação por Hg, uma vez que essa poderá auxiliar os profissionais de saúde a identificar melhor essa condição, e portanto, reduzir os diagnósticos incorretos devido a vieses implícitos e aumentar a conscientização sobre o potencial de intoxicação por este metal, especialmente em pacientes que apresentam sinais e sintomas inespecíficos que não se enquadram em outro diagnóstico provável.

Os valores de referência, podem ter variações entre diversos estudos (Abbas *et al.*, 2020; Basu *et al.*, 2023; Weldon *et al.*, 2000), entretanto é recomendado que sigam de acordo com a UNEP, a qual determina que os níveis do metal no sangue, cabelo e urina permaneçam menores que 5 µg/L, 2 µg/g e 3 µg/L, respectivamente (UNEP, 2018). Tais valores possuem inúmeras variações, pois a maioria dos autores preferem seguir referenciais estabelecidos pelos próprios departamentos de saúde, e em decorrência disso há uma certa dificuldade para realizar comparações ou até informar o real estado, tanto em relação ao biomonitoramento do Hg quanto a contaminação, sendo considerado um contratempo para avanços em estudos de caráter epidemiológicos do metal (Bastiansz *et al.*, 2022; Ewers *et al.*, 1999).

Entretanto, alguns autores ainda consideram que estes marcadores biológicos e seus respectivos resultados somente devem ser considerados quando estiverem elevados (em relação ao coeficiente basal naquela população estudada) da exposição ambiental e dos metais pesados (incluindo o Hg) (Xavier *et al.*, 2013). Por outro lado, a utilização de valores limites pode auxiliar a correlacionar os dados encontrados, que por vezes podem sofrer discrepâncias entre si, devido principalmente aos hábitos alimentares e individuais (Schulz *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2012).

O perfil da análise de dados pode ser afetado também pela dificuldade de quantificação do Hg e suas espécies em analitos biológicos, principalmente pela pouca disponibilidade amostral do metal no analito, por sua volatilidade, por combinar-se a outros compostos, pelo custo de alguns métodos utilizados (Tabela 3) e por problemáticas relacionadas a retirada do conteúdo amostral (Junior *et al.*, 2019; UNEP Global Mercury Partnership, 2023).

Tabela 3- Métodos utilizados para detecção dos níveis de mercúrio em amostras biológicas e seus respectivos níveis de detecção.

Metodologias	Níveis de detecção
Espectrometria de Absorção Atômica	
Forno Grafite (GFAAS*)	1 ng.g ⁻¹
Vapor Frio (CVAAS*)	0,01-1 ng.g ⁻¹
Espectrometria de Fluorescência Atômica (excitação de nêutrons)	
Radioquímica	0,01-1 ng.g ⁻¹
Cromatografias: Gasosa e Líquida de Alta Eficiência	
Ultravioleta	1 ng.g ⁻¹
Eletroquímico	0,1-1 µg.mL ⁻¹
Plasma Acoplado	
Analizador de filme de ouro	0,05 µg.g ⁻¹
Espectrometria de massa	0,01 ng.mL ⁻¹
Fluorescência por Raio-X	0,005-1 µg.g ⁻¹

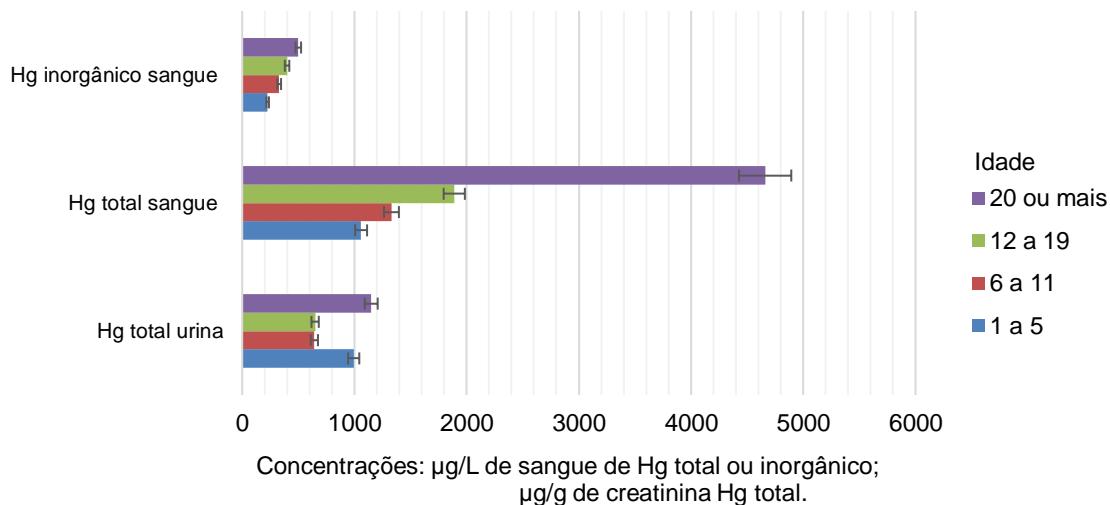
*CVAAS: do inglês, “Acid digestion, aeration Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry”, GFAAS: do inglês, “Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry”.

Fonte: Adaptado de Micaroni *et al.* (2000); Júnior *et al.* (2019); UNEP Global Mercury Partnership (2023)

Diante disso, o último levantamento realizado pelo CDC com o programa intitulado “*National Environmental Public Health Tracking Network*”, nos anos de 2015 e 2016, na população americana, evidenciaram que as concentrações em µg/L do Hg total no sangue foi significativamente maior nos homens (4.670 µg/L de sangue de Hg total) do que nas mulheres (3.950 µg/L de sangue de Hg total), afetando indivíduos com idade de 20 anos ou mais (4.660 µg/L de sangue de Hg total), já os índices urinários indicam o inverso quando comparado ao sexo, sendo as mulheres as que apresentam uma maior concentração de Hg total na urina (1.300 µg/g de creatinina de Hg total) (Figura 3 e 4) (CDC, 2024).

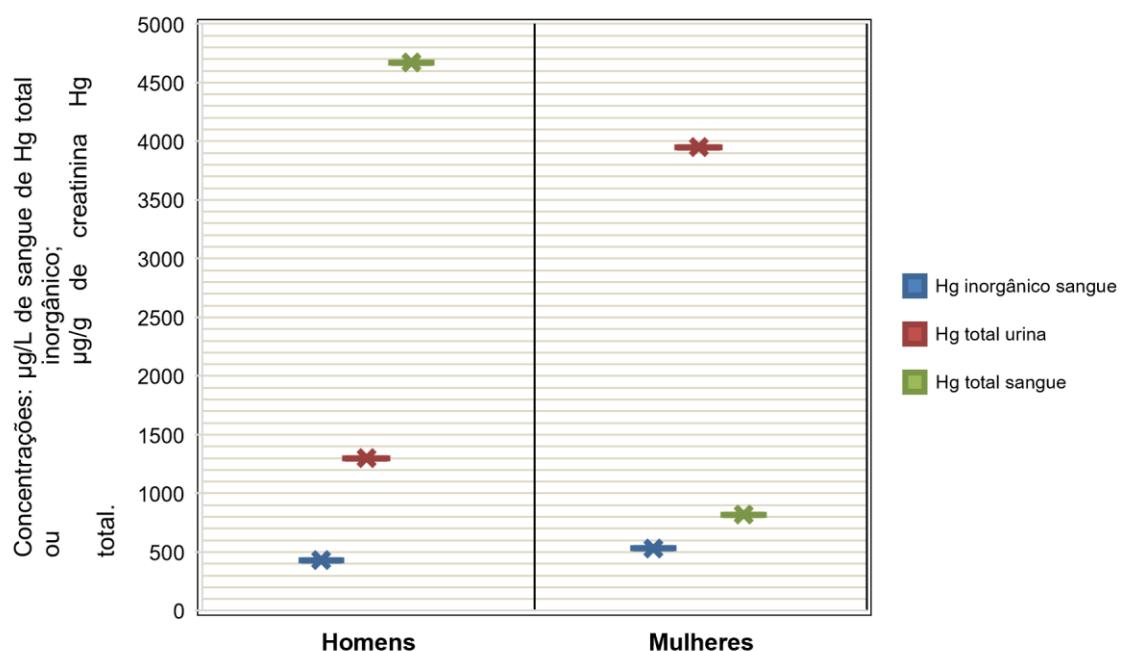
Além disso, o mesmo órgão governamental estimou apenas os níveis sanguíneos das especiações de Hg, mais precisamente das inorgânicas, sendo relativamente maiores nas mulheres (0.530 µg/L de sangue de Hg inorgânico) do que nos homens (0.430 µg/L de sangue de Hg inorgânico) e entre as idades de 20 anos ou mais (0,500 µg/L de sangue de Hg inorgânico) (Figura 5a e 5b) (CDC, 2024).

Figura 3- Níveis urinários e no sangue (2015-2016) de Hg total ou inorgânico, na população americana, em diferentes idades, em $\mu\text{g/L}$ (g) (95º percentis)



Fonte: Adaptado de National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals | Metals in Blood.

Figura 4 -Níveis urinários e no sangue* de Hg total ou inorgânico, na população americana entre homens e mulheres



*Dados referentes aos anos de 2015-2016; expressos em $\mu\text{g/L}$ (g) (95º percentis)

Fonte: Adaptado de National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals | Metals in Blood.

A intoxicação por Hg, é considerado um grave problema de saúde pública, por diversos fatores, entre eles, por afetar o desenvolvimento fetal e neonatal (Miranda et al., 2020; WHO, 2021). Uma revisão sistemática, em 2018, revelou os quatro grupos populacionais mais afetados com mercúrio e suas especiações (Tabela 4), cerca de

335.991 indivíduos em 312 estudos longitudinais e transversais em 75 países foram analisados, através de 424.858 amostras de biomarcadores específicos (cabelo, cordão umbilical, sangue periférico e urina) (Basu *et al.*, 2018).

Tabela 4– Grupos populacionais e relevância para a exposição ao Hg e seus componentes

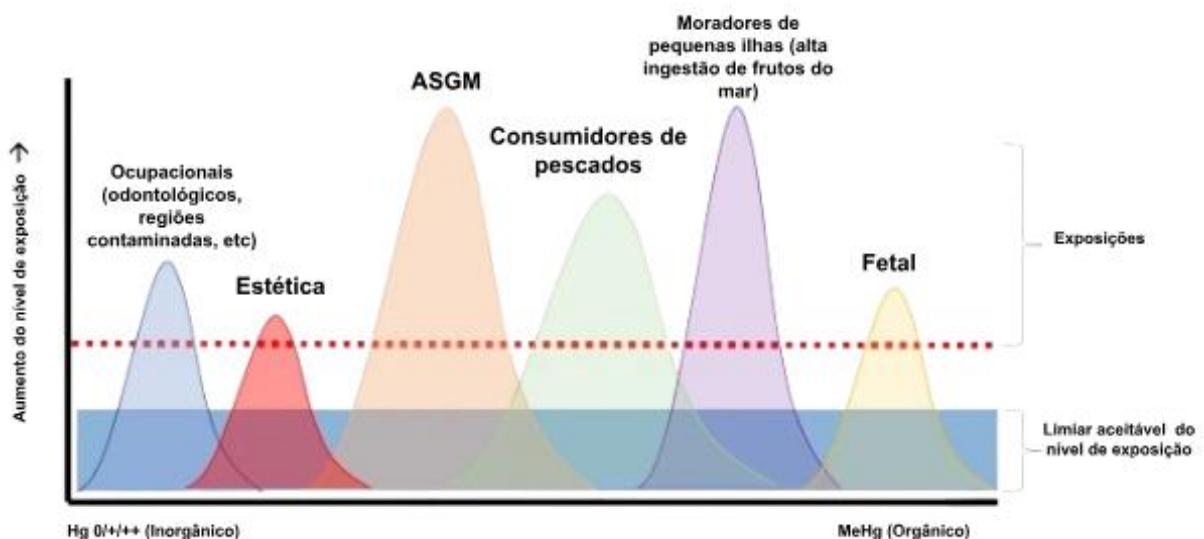
Grupo Populacional	Relevância
1. Populações árticas	Alto consumo de peixes e frutos do mar
2. Regiões tropicais	Alta ingestão de pescados e exposição as ASGM (particularmente a Amazônica)
3. Costeira ou moradores de pequenas ilhas/ arquipélagos	Comunidades dependentes de espécies marinhas para sobrevivência
4. Trabalhadores de ASGM ou moradores próximos a regiões de mineração	NR

NR= Não relatado

Fonte: Adaptado de Basu *et al.* (2018)

O mesmo grupo de pesquisadores, também afirma a importância de se correlacionar a estes grupos, aqueles que trabalham e utilizam produtos para fins estéticos, conhecidos como “skin-lightening” (cujo valor de referência atual para estes cosméticos devem ser < 1 µg/g Hg) e também a população infantil (fetal e neonatal), uma vez que a especiação mais letal do mercúrio, o metil mercúrio, pode atravessar a placenta (transmissão transplacentária) (Miranda *et al.*, 2020) (Figura 5).

Figura 5- Demais grupos afetados por Hg e suas especiações (Hg0/+/++ (inorgânicos) e MetHg (orgânicos)



Fonte: Basu *et al.* (2023)

Outra pesquisa recente, informa que de 787 clareadores analisados cerca de 196 (24,9%) continham o Hg ativo (concentração $> 1 \mu\text{g/g Hg}$ (UNEP, 2019b)) em seus ingredientes, além de considerar as regiões do Mediterrâneo Oriental e do Sudeste Asiático, aquelas que fabricariam produtos com dez vezes mais mercúrio do que o recomendado (Bastiansz *et al.*, 2022).

Sabe-se que os efeitos agudos ou a longo prazo a esse metal pode levar a uma série de desordens sistêmicas, como doenças isquêmicas cardíacas, pulmonares renais e até mesmo o desenvolvimento de neoplasias, sendo assim, um estudo desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), considerou que as mortes causadas por químicos dessas desordens em uma população com 1000 habitantes, possui uma ocorrência três vezes mais frequente em homens (0,26) do que em mulheres (0,10) (WHO, 2018). Isso pode ser devido ao meio laboral, devido a presença majoritária dos homens nas indústrias e/ou atividades mineradas (Bridges *et al.*, 2020) ou com relação ao maior nível de expressão de OAT 1 e 3 (transportadores de captação de Hg nos rins) no sexo masculino (Hazelhoff *et al.*, 2012), entre outros.

No Brasil, o Ministério do Trabalho e Economia estabeleceu na Norma Regulamentadora nº7 (NR-7) e no Anexo I, os Indicadores Biológicos de Exposição Excessiva (IBE/EE), o qual estipula valor máximo para exposições ocupacionais a agentes químicos, para o Hg metálico considerando-se a urina, como biomarcador e

referência < 20 µg/g de creatinina (Brasil, 2021). Diante disso, o órgão responsável (Vigilância Epidemiológica) pelo abastecimento de dados epidemiológicos sobre intoxicação exógena no Brasil, sendo ela laboral, acidental ou ambiental, utiliza o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) via DATASUS para informar a população sobre os casos, porém uma das principais dificuldades encontradas é a subnotificação dos casos, o que contribui para irrealidade da quantificação dos registros e também para informar a real gravidade do problema, principalmente em casos crônicos por serem extremamente escassos, dificultando até mesmo o diagnóstico (Freitas *et al.*, 2020). Sendo assim, as últimas notificações registradas pelo SINAN NET foram no período de 2023, não especificando a espécie do metal pesado, consideraram 573 casos totais, sendo 160 deles crônicos, 283 aguda- única e 77 aguda-repetida (Tabela 5).

Tabela 5- Notificações registradas no SINAN NET por intoxicação exógena ocasionada por Agente Tóxico (Metal)** segundo Região/ Unidade Federativa (UF), no período de 2022-2023.

Região/ UF de notificação	Casos notificados por Agente Tóxico (metal)		Circunstância (2022/2023)	
	2022	2023	Acidental	Ambiental
	Nordeste	67	126	34/80
Norte	7	22	1/6	1/3
Sul	63	78	4/43	4/1
Sudeste	101	305	17/74	17/131
Centro- Oeste	36	42	10/9	*/*

*Não foram relatados casos nestas regiões. **Não especificado qual metal.

Fonte: Ministério da Saúde/SVSA - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net (2023)

Outro ponto a se considerar é em relação aos dados isolados por Região, em especial a Região Sudeste, a qual é considerada a mais populosa do país, com cerca de 11.451.999 pessoas residentes (IBGE, 2022), consta com 305 casos notificados por metais, sendo que 131 desses foram por circunstâncias ambientais, somente no ano de 2023, conforme demonstrado na Tabela 5. Essa região, segundo o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), conta com o maior polo petroquímico do país, além da forte presença das unidades produtoras de fertilizantes

fosfatados, das industriais metalúrgicas e a extractiva mineral (Bacellar *et al.*, 2015), os quais segundo o Centro de Tecnologia Mineral (CETEM/MCTI), podem acabar promovendo contaminação por deposição no meio ambiente de substâncias perigosas, incluindo os metais pesados (Alamino *et al.*, 2014).

A Região Norte, embora apresente números significativamente menores em comparação com a Região Sudeste, com 6 e 74 casos de circunstâncias accidentais em 2023, respectivamente (Tabela 5), enfrenta desafios específicos. Isso pode ser atribuído tanto à dificuldade em notificar casos em comunidades remotas, como as ribeirinhas, quanto ao aumento do garimpo ilegal (Almeida, 2023). Este último fator tem se intensificado devido à diminuição da rigidez nas políticas e na fiscalização ambiental, além da escassez de produções científicas relacionadas aos riscos à saúde dessa população (Fujita, 2024).

Diante disso, o Ministério da Saúde lançou um guia intitulado “Orientações para a notificação de intoxicações por mercúrio” com o intuito de informar a população sobre os riscos, sintomas, principais fontes de contaminação entre outros fatores da exposição ao metal, considerando nele as populações vulneráveis, principalmente comunidades ribeirinhas e indígenas, além das intoxicações relacionadas ao âmbito trabalhista (Figura 6) (Brasil, 2021).

Figura 6 – Cartilha informativa para população de livre acesso sobre a intoxicação de Mercúrio disponibilizada pelo Ministério da Saúde.



Fonte: Brasil (2021)

No ano de 2023, com avanço do garimpo ilegal na Região Norte do país, o Ministério da Saúde constatou uma crise nutricional e sanitária, no Território

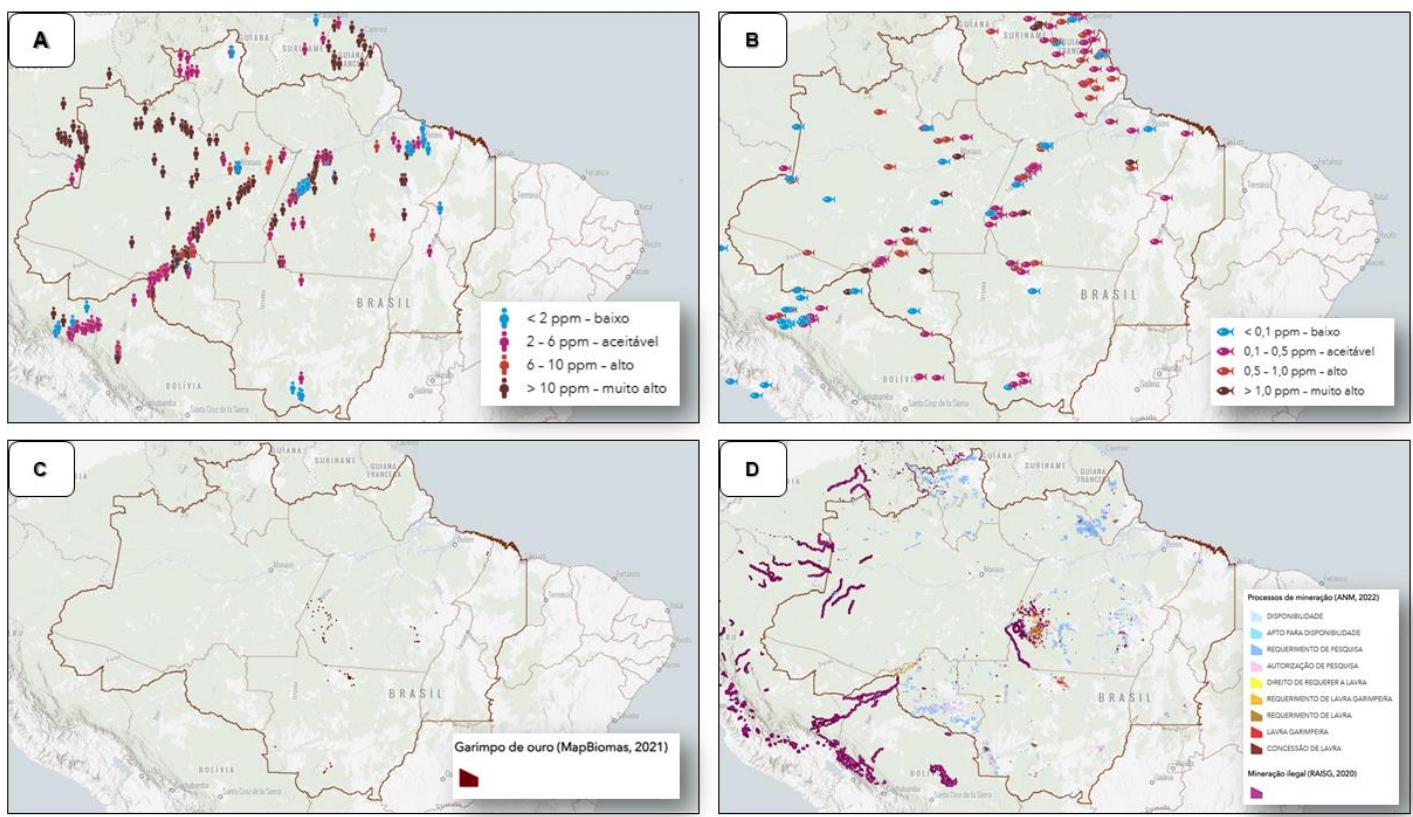
Yanomami, por meio da Portaria GM/MS N°2 8, Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN), entretanto a Secretaria de Saúde Indígena (SESAI) afirma que a ordem deixou levar a este cenário, como é demonstrado no trecho a seguir:

“A ausência do Estado brasileiro no território levou a um cenário de crise humanitária e desassistência sanitária, com o aumento da violência, fome, contaminação das águas e intoxicações por mercúrio, surtos de doenças imunopreveníveis e parasitárias, alcoolismo, tráfico de armas e drogas.” (Sesai, 2023)

Para que se tivesse um melhor parâmetro na região Norte, principalmente a contaminação ocasionada por Hg, sendo elas em peixes ou humanos, considerando também os impactos causados, dentre eles: a ilegalidade (garimpos ilegais), degradação ou ausência de políticas públicas, fiscalizações e punições, foi criado o Observatório do Mercúrio em parceria com Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e outras instituições, onde é possível acessar dados dos anos de 1980 e julho/2022 (última atualização) (FIOCRUZ, 2024).

Mediante a isso, é notório a percepção de que até julho de 2022, considerando os limites da Amazônia Legal, as comunidades que possuem níveis mais elevados de Hg (> 10 ppm, partes por milhão) pelo corpo são os povos originários e os ribeirinhos, principalmente em Tapajós -PA e aquelas localizadas próximas a hidrografias importantes como o alto do rio Madeira- RO e rio Negro-AM (Figura 7 A), além da contaminação de peixes (Figura 7 B), os quais são expostos ao Hg devido ao garimpo (Figura 7 C), mineração ilegal (Figura 7 D) ou efluentes gerados por processos antropológicos próximo a região (FIOCRUZ, 2024).

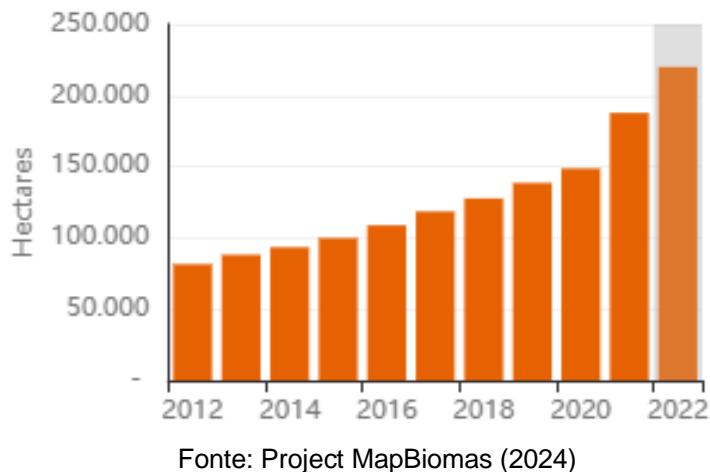
Figura 7 – Áreas de contaminação humana e peixes por Hg (A e B), garimpo de Ouro (C), processos de mineração e mineração ilegal (D)



Fonte: ANM (2022); FIOCRUZ (2024); MapBiomas (2021); RAISG (2020)

Além disso, um grupo de pesquisadores já havia relatado um aumento alarmante em área explorada, quando comparado o ano de 1985 ($7,45 \text{ km}^2$) e 2020 (102.16 km^2), em consequência da atividade mineradora, principalmente nas comunidades de Kayapó, Mundurukú e Yanomani com cerca de 95% de tal processo, sendo que 99,5% estão relacionado a exploração do ouro como principal minério, considerando somente o ano de 2020 (Mataveli *et al.*, 2022). Atualmente, segundo a Organização MapBiomas, a área explorada por hectares de atividade garimpeira em busca do ouro está crescendo, quando comparado os últimos dez anos, principalmente entre os anos de 2012 (81.545 hectares) e 2022 (220.007 hectares), como exemplificado na Figura 8 (Project MapBiomas, 2024).

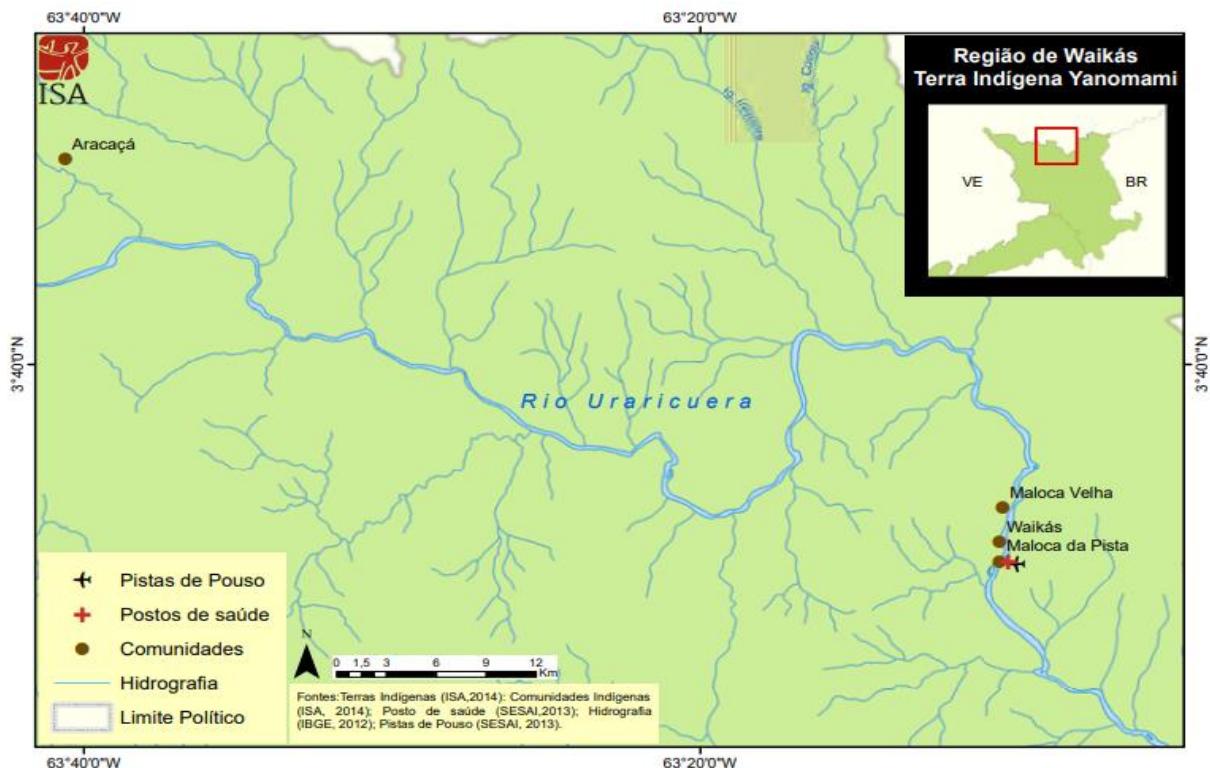
Figura 8 – Área explorada, por hectares, pela atividade garimpeira por Ouro, nos anos de 2012 a 2022.



Fonte: Project MapBiomas (2024)

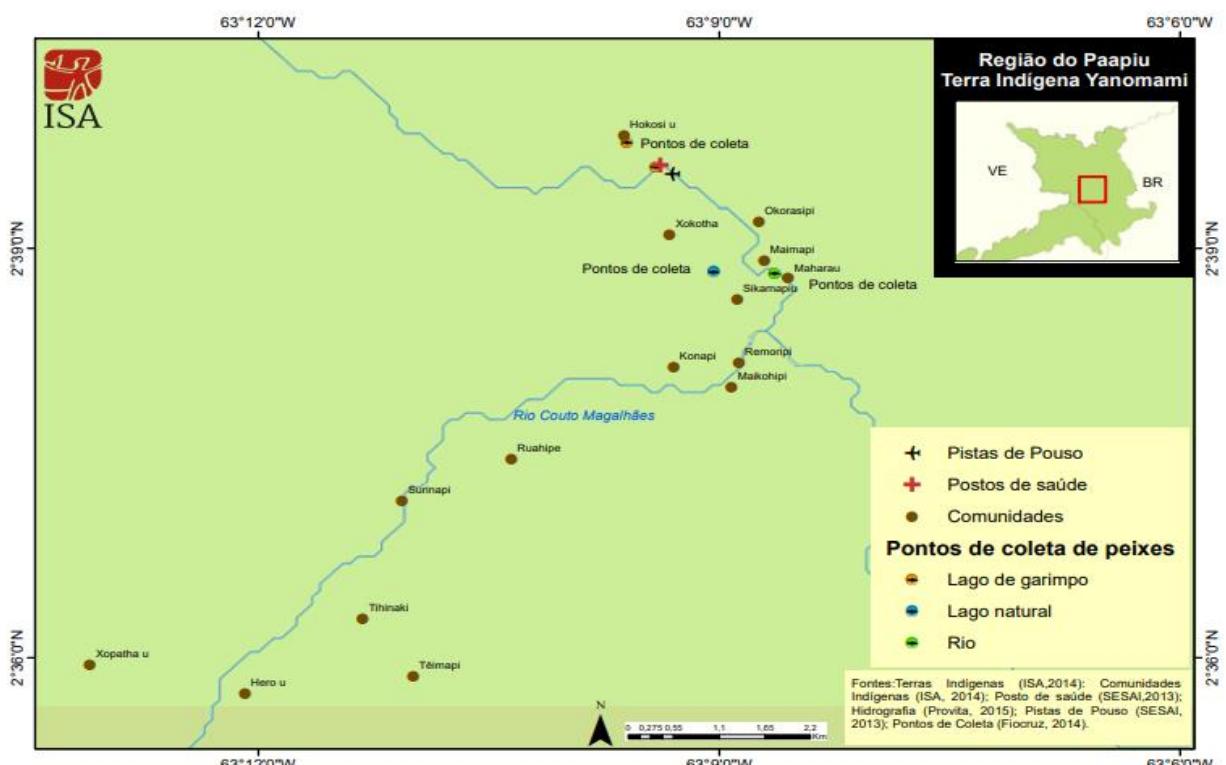
Um estudo de campo realizado pelo grupo de pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-PA), em 2014, em 19 comunidades pertencentes aos Yanomami, sendo 15 em Paapiú e 4 em Waikás (de etnias Ye'kuana e Aracaça) (Figura 9A e 9B), sendo 179 amostras provindas de Paapiú e outras 60 foram do polo base Waikás (Figura 9 C), destes 73,5% e 82,6% eram mulheres e apenas 42% eram homens, considerando 21 eram trabalhadores de ASGM (Figura 10) (Basta *et al.*, 2016). Os valores de referência atribuídos para essa pesquisa, utilizando o cabelo como biomarcador, seguiram de acordo com a WHO (1972) e a U.S EPA (1999) (1 µg/g) e (6 µg/g), respectivamente. Os resultados demonstraram que o grupo Ye'kuana apresentou cerca de 4,5 µg/g (variação de 0,4 a 22,1 µg/g) e o grupo que obteve maior índice de intoxicação foi Yanomami (aracaça) com 15,5 µg/g (variação 4,5 a 20,4 µg/g), sendo que ambos os dados foram fornecidos sem a avaliação clínico-neurológica, além de expressarem que 100% da população Yanomami (aracaça) maior de 12 anos corria alto risco de intoxicação por Hg (Basta *et al.*, 2016; Vega *et al.*, 2018).

Figura 9a- Localização geográfica do povo originário Yanomami de etnias Waikás e Aracaça



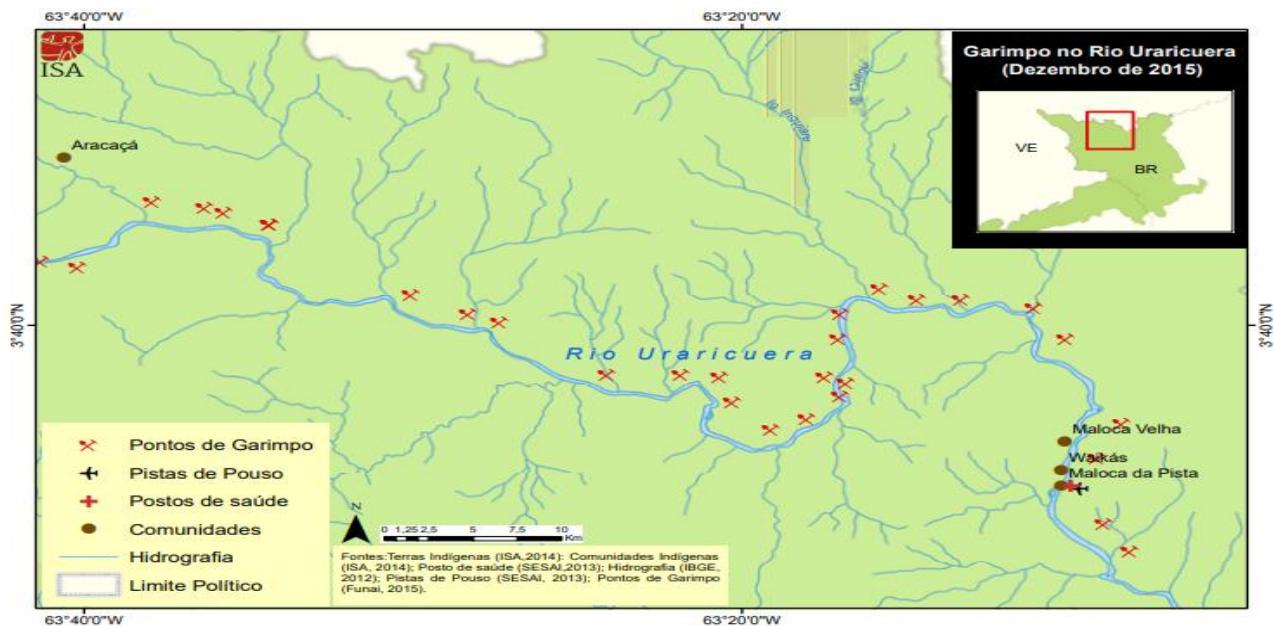
Fonte: Basta et al. (2016)

Figura 9b – Demarcação das comunidades Indígenas Yanomami (Paapiú)



Fonte: Basta et al. (2016)

Figura 9c – Pontos de atividade de exploração de Ouro nas proximidades do Rio Uracicuera (Roraima- RR)

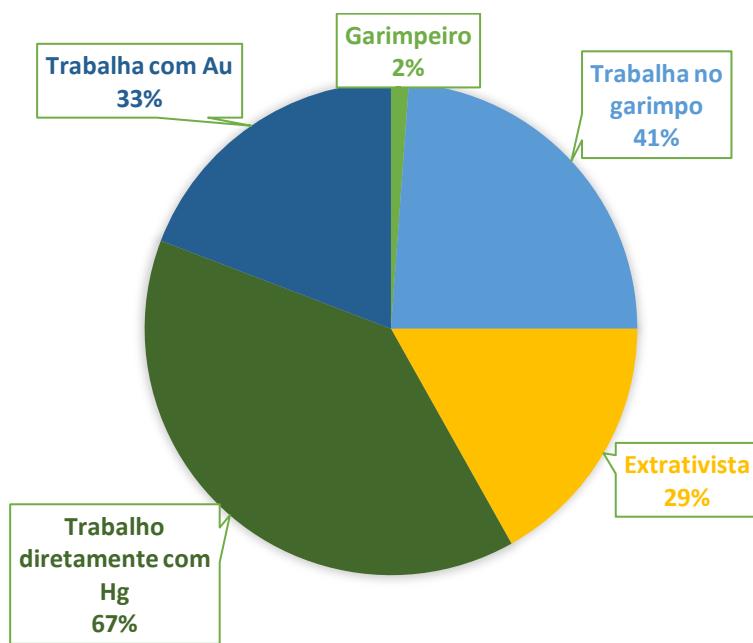


Fonte: Basta *et al.* (2016)

Em 2022, o mesmo grupo de pesquisadores, analisou 9 aldeias localizadas no alto do rio Mucajaí (Caju, Castanha, Ilha, Illihimakok, Lasaki, Milikowaxi, Porapi, Pewau e Uxiú) pertencentes ao Território Yanomami, dentre os aspectos analisados foram considerados: aspectos antropométricos, neurológicos, atividade laboral (Figura 10), avaliações de saúde (como infecções infecto parasitárias (malária), imunopreviníveis e sexualmente transmissíveis), a existência da frequência polimórfica do gene *GSTP1 rs1695* correlacionado a intoxicações exógenas por Hg (Figura 11), níveis de Hg no cabelo e peixes, além de aspectos relacionados a saúde básica (como dosagem de Hb, glicemia capilar, pressão arterial e o índice de massa corpórea (IMC)) (Silva *et al.*, 2023; Basta *et al.*, 2024; Perini *et al.* 2024).

Em relação as condições clínicas básicas e avaliações de saúde, apenas a pressão arterial sofreu alteração, considerando a existência da doença crônica (hipertensão arterial sistêmica) e os níveis $> 2 \mu\text{g/g}$ Hg no corpo (tomando como parâmetro de referência a menor dose do grupo) cerca de 14,3% mais prevalentes do que aqueles que tinham pressão dentro dos valores considerados fisiológicos (Basta *et al.*, 2024).

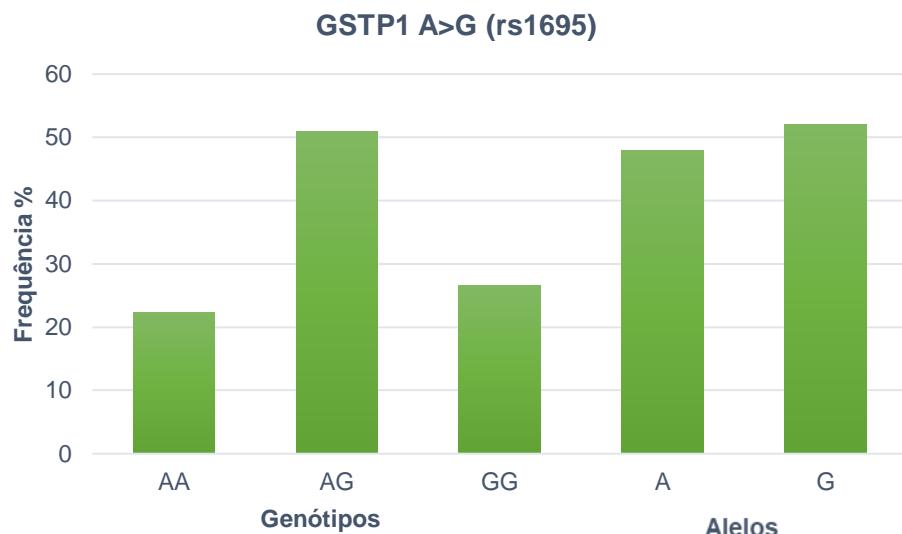
Figura 10- Perfil laboral (n=59) exercido por residentes das 9 aldeias no Território Yanomami



Fonte: Basta *et al.* (2024)

A existência de níveis elevados de Hg no corpo tem uma correlação importante com essa determinada frequência polimórfica e a presença da sintomatologia característica da exposição, principalmente os aspectos neuromotores e neurocognitivos (Perini *et al.* 2024). Considerando este mesmo estudo de campo, os autores encontraram em todo balanço amostral (n=290) a presença do polimorfismo GSTP1 rs 1695, predominando o padrão heterozigoto para o genótipo AG (51%) com a frequência do alelo G maior que A (47,9% vs. 52,1%), entretanto a questão da prevalência da exposição exógena ao metal (n=241) são considerados maiores os níveis > 2 µg Hg/g (84% afetados) do que os níveis > 6 µg Hg/g (10,8% afetados), afetando em totalidade (100%) com níveis > 2 µg/g, principalmente as aldeias Yanomani: Ilhimakok, Ilha, Uxiú e com > 6 µg/g e as aldeias Caju (23,5%) e Ilha (36,4%) com níveis > 2 µg/g ($p<0,001$), além de considerar a faixa etária de maiores de 12 anos a mais afetada (87,7%, $p=0,047$), está última pesquisa já considerou avaliações clínicos- neurológicos (Basta *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2023).

Figura 11- Frequência (%) polimórfica do gene GSTP1 rs1695 associado a intoxicação por Hg



Fonte: Basta *et al.* (2024)

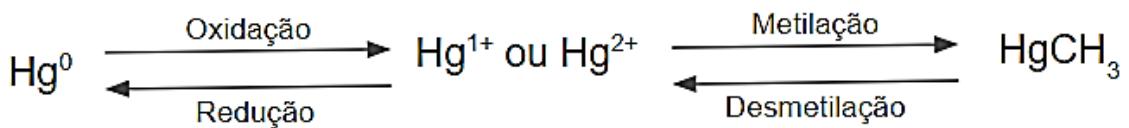
Apesar da existência de alto risco e maior susceptibilidade com a população materno-fetal e pertencente aos povos originários, devido ao MeHg e localidade, uma revisão sistemática analisou cerca de 1283 artigos com 11.827 indivíduos e considerou a população masculina ($11.25 \mu\text{g Hg/g}^{-1}$ cabelo, variação de 11.00 para $11.50 \mu\text{g Hg/g}^{-1}$ Cabelo) a mais exposta quando comparado com os dois últimos citados (Santos *et al.*, 2018). Entretanto, ainda que hajam poucos estudos que avaliem as questões epidemiológicas ainda são de suma importância que haja a comunicação das notificações desses casos ao SINAN, além da aderência dos pesquisadores a esta, principalmente com pesquisas realizadas a região amazônica e relacionadas a exposição a este tipo específico de metal para que o combate a subnotificação e consequentemente a desinformação, mas também considere a real gravidade e impacto da intoxicação exógena por Hg, como um problema de saúde global (Castro *et al.*, 2021).

2.2.3 Especiações do Hg, Biotransformação e Metilação

O Hg é um metal pesado que pode sofrer mudanças conformacionais, principalmente quimicamente, com a ocorrência da reação de oxido-redução ou em alguns casos passar por uma adição de um grupamento metil ($-\text{CH}_3$) ou perda deste, mediante tais fatores ele pode dar origem a três grandes formas inorgânicas e uma

orgânica (Tabela 6 e Figura 12), podem causar diversos efeitos cinéticos, nas etapas de absorção, distribuição, metabolização e excreção, sendo que cada uma das especiações de Hg promovem diferentes situações no corpo humano e no ambiente marinho, em especial, os peixes (processo de biometilação) (O'connor *et al.*, 2019).

Figura 12- Transformações químicas comuns das especiações de Hg



Fonte: O autor (2024)

O Hg, passa por um ciclo que é conhecido como “ciclo global ou ciclo biogeoquímico” devido a ações antropogênicas e ambientais, este ciclo incorpora todas as transformações que o metal pode apresentar. Sumariamente, o Hg em forma de vapor ou elementar (Hg^0), sua forma gasosa monoatômica e insolúvel, é liberado pelos vulcões, transformando-se em uma forma mais solúvel, o mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) por oxidação, que retornará para terra via reação de condensação pelas águas da chuva podendo ser reduzido (Hg^0) promovendo sua recirculação por diversos anos, entretanto parte desse Hg^{2+} encontrasse em forma substancial e poderá ser convertido por moléculas específicas a MetHg (processo de biometilação) através de processos abióticos (como radiação UV) ou micro-organismo, sendo bioacumulado na cadeia alimentar marinha (Figura 16) (Rodriguez, 2023). As reações de biometilação aquática, ocorrem de duas diferentes maneiras:

1. Conversão do Difenil-Hg até MetHg (adição de $-\text{CH}_3$): Difenil-Hg é oxidado a fenil-Hg $^+$ transformando-se em Hg^0 , reduzido a Hg^{2+} e por fim a MetHg;
2. Conversão direta de dimetil-Hg a MetHg (Clarkson *et al.*, 2003).

Efeitos Cinéticos				
Especiações	Fórmula Química	Absorção	Distribuição	Excreção
Inorgânicas				
Mercúrio Elementar	Hg^0	<p>Por Inalação:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Absorvido pela membrana alveolar; 2. Sofrer oxidação nos eritrócitos (pela influência da catalase) tornando-se mercúrio metálico; <p>Ingestão:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Absorvido via TGI (baixa), sofre conversão via enterogástrica de Hg^0 a Hg^{2+} com ligações sulfídricas (-SH); <p>Dérmica:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Passagem transdérmica (pode levar síndrome nefrótica); 2. Subcutânea. 	<p>Considerando somente a sua forma metálica, possui natureza lipofílica e atravessa a barreira hematoencefálica e transplacentária.</p> <p>Sofre acúmulo em todos os tecidos, persistindo mais nos testículos, rins e cérebro;</p> <p>Nos rins, promove a estimulação da metaloteína, sendo assim aumento os níveis mercúrios locais;</p> <p>Hg^0 possui meia vida biológica: 40 a 90 dias.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Em sua maioria renal, podendo ser biliar (até 40%); • Pode ser excretado pelo leite materno de forma inorgânica pela albumina; <p>Dois períodos:</p> <ol style="list-style-type: none"> a. Latente: excreção gradual; b. Platô: aumento da excreção entre 10 até a eliminação completa em 6 meses <ul style="list-style-type: none"> • Quando em contato com SNC pode perdurar por anos.
Mercuroso (instável)	Hg^+			
Mercúrio Mercúrico (estável)	Hg^{2+} $HgCl^+$ $HgCl^{-4}$ $HgCl^{-3}$ $HgCl_2$	<ol style="list-style-type: none"> 1. TGI; 2. Pulmões (baixa), presença do clearance promovido 	<p>Acúmulo principalmente no fígado e rins (túbulos proximais);</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Através de fluidos corporais: urina e fezes;

	Sais de Hg (HgS, HgBr ₂ , Hg(NO ₃) ₂ , etc)	pelas células mucociliares; 3. Pele.		<ul style="list-style-type: none"> Glândulas: sudoríparas, salivares e lacrimais; Meia vida de 42 dias.
Orgânicos				
Metil Mercúrio, Dimetil mercúrio	MetHg	<ul style="list-style-type: none"> TGI; Pele (somente o dimetilmercúrio) (baixa). 	<p>Em todos os tecidos, sendo 10% direcionado até o sistema nervoso;</p> <p>É convertido em espécies inorgânicas bivalentes sofrendo redox.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Excretado pelo fígado a través da bile, pelos rins e urina; Meia vida de 45 a 70 dias; Quando não metilado é eliminado pelas fezes.

SNC:Sistema Nervoso Central; TGI: Trato Gastrointestinal.

Fonte: Adaptado de Bensefa *et al.* (2011) e Berlin *et al.* (2007)

As demais espécies de Hg inorgânico (sais de Hg, como HgCl₂, HgS, HgBr₂, etc), que são produzidos pelas indústrias ou provindas de outras atividades antropogênicas também passam pelo mesmo ciclo biogeoquímico, com as mesmas reações de metilação e redução-oxidação (Pavithra *et al.*, 2023). Este ciclo, representa uma das principais via de contaminação por Hg, mais precisamente MetHg, pelo consumo de pescados (Mussy *et al.*, 2023).

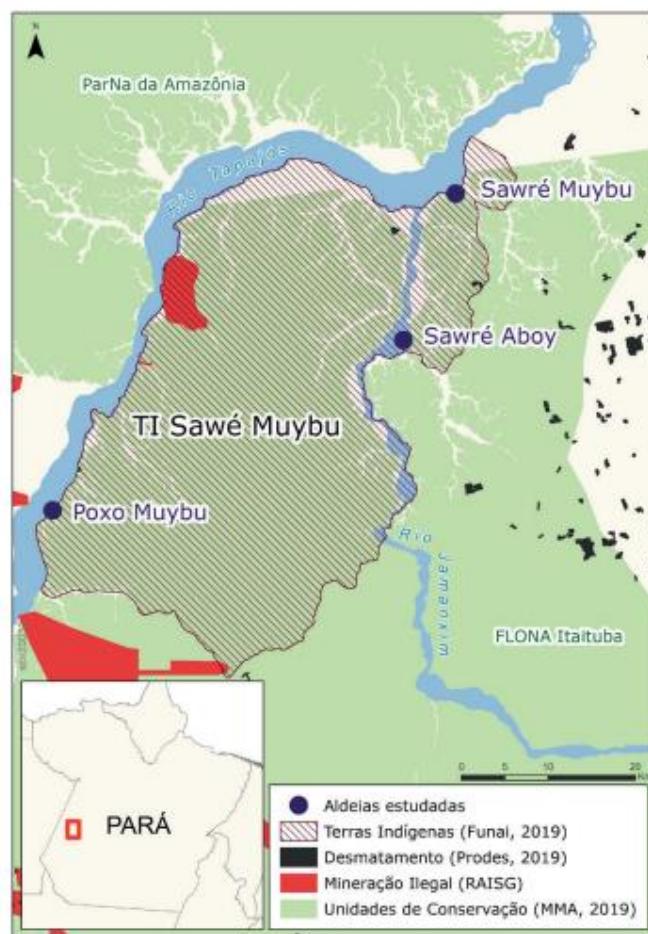
Além de fazerem as reações clássicas anteriormente já reportadas, também seguem a reação de Pearson para metais de transição (Pearson, 1963), onde o mercúrio, em sua forma catiônica, é considerado um ácido macio/ eletrofílico que possui afinidade pelas bases macias/nucleofílicas, isto é, quimicamente possuem alta capacidade de polarização orbital, tamanho grande, baixas cargas de densidade negativa (base) e de estado de oxidação (ácido) (Lopachin *et al.*, 2012; Pearson, 1990).

No Brasil, um estudo analisou peixes carnívoros e não carnívoros consumidos pela população da Região Norte, entre os anos de 2021-2022, demonstra cerca de 21,3% dos peixes tinham níveis de Hg acima do recomendado pelas agências reguladoras, como ANVISA e FAO/WHO (VR > 0,5 µg/g em peixes), sendo os estados

Roraima (40%) e Acre (35,9%) apresentavam maior prevalência de contaminação da população, considerando os valores de ingestão diária atribuídos pela US EPA (0,1 mg/kg pc/dia), além do último estado ultrapassar 6,9 a 31,5 vezes da dose preconizada por essa agência, por fim o estudo considerou mulheres em idade fértil e crianças de 2 a 4 anos, aquelas que consumiam uma dose Hg muito maior do que o recomendado (Basta *et al.*, 2023; FAO/WHO, 2016; WHO, 2008).

Além disso, este mesmo grupo de pesquisa já havia publicado outros estudos sobre o impacto do metal na região da Bacia de Tapajós, no estado do Pará, em específico para a população originária Munduruku (Figura 12), que contou com avaliações neurológicas, pediátricas e gênicas (Tabela 7), além de análises dos níveis médios de Hg na população e nos peixes, os quais foram de 7,7 µg/g Hg no cabelo e 1,95 µg/g, respectivamente, sendo maiores do que os valores atribuídos pela FAO/OMS (Basta *et al.*, 2021; FAO/WHO 2016).

Figura 12 - Mapa geográfico da localização da população de Munduruku e respectivas aldeias (Sawré Muybu e Aboy, Poxo Muybu).



Fonte: Basta *et al.* (2021)

Tabela 7– Principais achados nos estudos da população Munduruku nas aldeias de Sawré Aboy e Muybu, Poxo Muybu na região da Bacia de Tapajós- PA

	Povo Originário Munduruku		
	Sawré Aboy	Sawré Muybu	Poxo Muybu
Índice de contaminação da população	87,50%	42,90%	60,60%
Principais danos neurológicos	a. 17,9% alteração do reflexo (tendão de Aquiles); b. 17,4 % Polineuropatia distal (somente em Sawré Aboy); c. 12,7% déficits na percepção nociceptiva (SNC); d. 4,5% amiotrofia de artelhos		
Avaliação hematológica	21% foram diagnosticados com quadro anêmico		
Polimorfismo encontrado	gene ALAD (rs1800435) (δ ácido aminolevulinato desidratase) Heterozigoto para alelos CG (associado a maior susceptibilidade da entrada de Hg no corpo)		

Fonte: Basta *et al.* (2021); Perini *et al.* (2021); Perinini *et al.* (2024)

A população originária de Munduruku, em específico, a aldeia pertencente a etnia Sawré Aboy, que vivem próximos do Rio Jamaxim, apresentou índices de contaminação do ambiente marinho por Hg maiores do que os encontrados na aldeia Poxo Muybu, além dos primeiros sofrerem com a mineração ilegal (Basta, 2023).

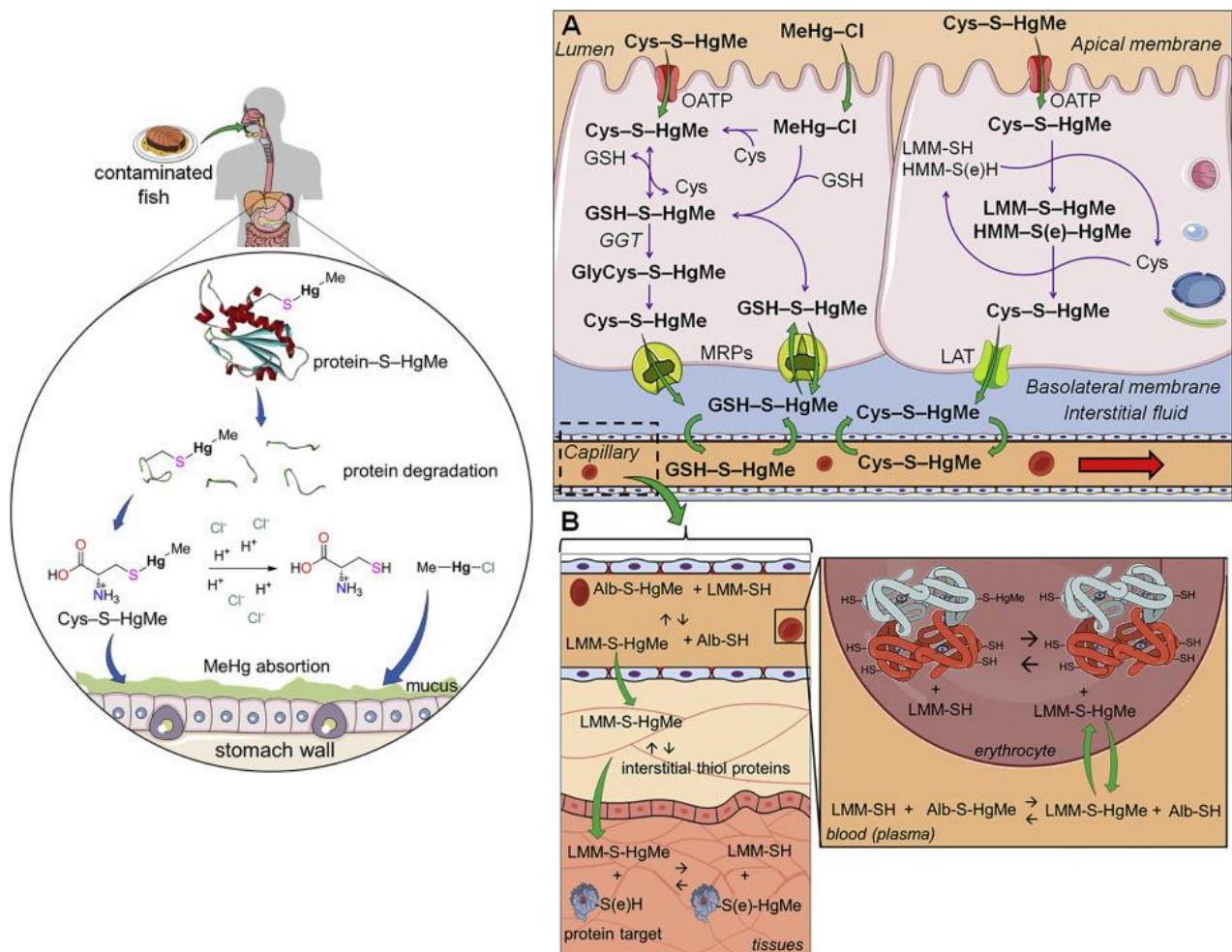
Outros estudos, também já haviam abordado a contaminação de peixes na população de Munduruku (Santos *et al.*, 2002) e em outras comunidades ribeirinhas localizadas na Região Norte, como aquelas próximas aos rios Teles Pires, Cassiporé-PA, Neotropical, Roosevelt entre os anos de 2015-2021 (Anjos *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2015; Montanã *et al.*, 2021).

Levando em consideração, o polimorfismo descrito na Tabela 7, na enzima delta ácido aminolevulinato desidratase (ALAD) que está relacionada a síntese do heme, cujo grupamento é de extrema importância para o desenvolvimento da molécula de Hb (hemoglobina), sendo assim existem estudos que indicam a influência dos metais pesados (principalmente, Hg e Pb) estarem associados a redução ou inibição desta, ocasionando protoporfirias e/ ou a diminuição da atividade da ferroquelatase (Schauder *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2013), também esclarecendo o principal sintoma hematológico, correspondente ao quadro anêmico apresentado por determinados pacientes intoxicados por Hg (Oliveira *et al.*, 2015; Perottoni *et al.*, 2004; Živančević *et al.*, 2024).

Além disso, o Hg e suas especiações possuem a capacidade de se ligarem a seleno-proteínas (-SeH/-S) ou grupamento tióis (-SH), sendo este último dividido em dois diferentes grupos:

- a. Grupamentos tióis de baixo peso molecular (do inglês, *Low Molecular mass - LMM-SH*): cisteina (Cys), redução da molécula de glutationa (GSH) e seus derivados, homocisteína e acetil-CoA;
- b. Grupamentos tióis de alto peso molecular (do inglês, *High Molecular mass - HMM-SH ou HMM-SeH*): albumina e hemoglobina para -SH (Figura 13) ou seleno proteína P, GPxs, TrxR1-3 para -SeH (Nam *et al.*, 2003; Rooney *et al.*, 2007; Nogara *et al.*, 2019)

Figura 13- Processo de absorção do MetHg e sua respectiva interação com as moléculas de albumina e hemoglobina



Fonte: Nogara *et al.* (2019)

Tais alterações promovidas por essas interações entre estes grupos e suas respectivas ligações entre proteínas e aminoácidos nas células causam um desgaste oxidativo (Ulrich *et al.*, 2019). Deste modo, estes podem ocasionar efeitos colaterais, como modificações e mudanças de regulação nos ciclos metabólicos através da junção pela cisteína, sendo assim quanto menor a formação desses grupos menor será a formação de proteínas oxidadas (Mulzolf-Panek *et al.*, 2020).

A metilação, seja ela hiper ou hipometilação, promovida pelo mercúrio não altera somente o metabolismo dos peixes, mas também pode alterar o ciclo de metilação e transulfuração do ser humano, o qual associa-se às moléculas de homocisteína (a qual pode servir para síntese de glutatona através de reação de transulfuração), tetra hidrofolato (THF) e a vitamina B12 (cobalamina), sendo estes dois últimos utilizados como cofatores para transformação da homocisteína em metionina pela metionina sintase (Kaur *et al.*, 2006). A metionina, por sua vez, tem a capacidade de sintetizar a

S-adenosilmetionina (SAM), a qual doará grupamentos metil para as reações de metilação celular, como exemplo, a síntese dos ácidos nucleicos (DNA – ácido desoxirribonucleico e RNA- ácido ribonucleico), proteínas e lipídios, considerando assim processo fundamental para a expressão gênica e heterogeneidade do sistema imune (Gallagher, 2012; Zhang *et al*, 2022). Além das espécies reativas citadas, pesquisas recentes associam também este mecanismo de transulfuração as espécies reativas de enxofre, como H₂S (ácido sulfênico/ sulfeto de hidrogênio) e aos sais STNa (tiosulfatos de sódio) e NaHS (hidrosulfeto de sódio) (Bourgonje *et al.*, 2020).

Diante disso, os metais pesados, como Hg, por possuírem essa capacidade de ligação a esses grupamentos, podem afetar tais vias de três maneiras específicas:

1. Inibem a funcionalidade enzimática da metionina sintase;
2. Altera a via glutationa, conhecida como rota dos xenobióticos e de antioxidantes (REDOX), até ocasionar sua depleção;
3. Modificam citocinas pro-inflamatórias, como interferon gama (IFN- γ), cujo é depende de processos metilativos, consequentemente levando a imunossupressão (Agrawal *et al.*, 2007).

2.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e Nitrogênio (ERNS) e Estresse Oxidativo (EO).

O estresse oxidativo (EO) é definido, da seguinte forma:

“um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante-antioxidante a favor dos primeiros” (Sies, 1985).

Em outras palavras trata-se de uma condição em que o sistema de antioxidantes do organismo sofre uma superprodução de espécies reativas (radicais livres ou pró-oxidantes), por exemplo as do oxigênio e/ ou as de nitrogênio, onde haverá um desequilíbrio na balança REDOX, pela entrada desses radicais na célula (Valko *et al.*, 2007; Aschbacher *et al.*, 2020). Entretanto, Sies (2020) atribuiu duas novas correlações a esse tema, caracterizando em duas classes distintas:

1. Estresse Oxidativo fisiológico (“eustress” ou estresse positivo): conceitua-se em apresentar baixos níveis de EO, os quais são fundamentais para que haja uma sinalização homeostática REDOX considerada saudável.
2. Estresse oxidativo patológico (“distress” ou estresse negativo): aquele que se baseia na super expressão dos pro-oxidantes, podendo ocasionar danos

irreversíveis as biomoléculas e assim, promover enfermidades.

As EROs são classificadas pela presença de terem em sua composição apenas um átomo de oxigênio em cada molécula, cursando com aumento da atividade aumentada em comparação ao oxigênio molecular, dentre elas estão: as espécies radicais (radical hidroxil (OH^\bullet), superóxido (O_2^\bullet) e oxigênio *singlet*), sendo a primeira a mais reativa em comparação as demais, e as não radicais (peróxido de hidrogênio), este último recebendo auxilio da reação de Fenton, este tendo o menor poderio reativo (Pélaz *et al.*, 2024; Rauf *et al.*, 2024). Também existem, as ERNs que são constituídas pelas espécies contendo um átomo de nitrogênio, incluindo o óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO^\bullet), nitrito (NO_2^-), trióxido de nitrogênio (NO_2O_3) e dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet), essas são sintetizadas por três diferentes sistemas: eNOS/NOS 3 (“*endotelial Nitric Oxide synthase*”, do inglês), iNOS/ NOS 2 (“*inducible Nitric Oxide Synthase*”, do inglês) e nNOS/ NOS 1 (“*neuronal Nitric Oxide Synthase*”, do inglês) perante ação de cofatores, como a arginina que gerará NO e citrulina ou de modo mais simples, pela dieta e com ação da via nitrato-nitrito-NO (Prior *et al.*, 2016).

Existem inúmeras reações capazes de originar as EROs, dentre elas descantam-se duas não-enzimáticas: a primeira delas chamada de reação de Haber-Weiss, cujo processo é extremamente lento, contudo, pode se tornar acelerado quando sofre catalise por metais de transição, como o ferro, e assim gerando a segunda reação denominada reação de Fenton (Vitale *et al.*, 2024). Essa foi descoberta 1894 por Henry J. Fenton, por se tratar de um processo extremamente complexo, central e exercida de modo acelerado, sendo a mais efetiva para originar produtos avançados oxidativos (do inglês, *advanced oxidative process*, AOPs), além de possuir quatro vias principais:

1. Clássica: originando o radical hidroxil;
2. Férrica: exclusiva para os íons ferro, sendo que ambas são capazes de gerar EROs;
3. Peróxido de Hidrogênio: dando origem a H_2O_2 , a partir de Fe^{2+} (íon ferro ferroso);
4. Quando as concentrações de íons Fe^{3+} (férrico) e Fe^{2+} (ferroso) estão em igualdade (Zhang *et al.*, 2024).

Apesar da maioria das reações das espécies reativas de oxigênio, terem como ponto central estas reações, as ERNs também possuem um parâmetro chave, a geração do radical hidroxil e desta forma se integrando também as EROs, contudo ambas, quando desbalanceadas, têm como objetivo finalizador dar origem a radicais lipídicos, que posteriormente formaram ácidos graxos poli-insaturados (do inglês, “*poly-unsaturated fatty acid- PUFA*”), que são submetidos a uma série de reações em cadeia, ou seja, interações moleculares de forma constante, podendo ser: no início (do inglês, “*initiation*”), na propagação (do inglês, “*propagation*”) ou no término (do inglês, “*termination*”) da cadeia, podendo promover o fenômeno da peroxidação lipídica (Zhang *et al.*, 2024). Diante disso, a fim de sumarizar o mecanismo exercido pelas vias integradoras desses radicais e suas respectivas depurações, Zhang (2019) estabeleceu uma subdivisão dessas da seguinte forma:

Tabela 8- Vias integrativas de geração e depuração das espécies reativas de nitrogênio e das espécies reativas de oxigênio

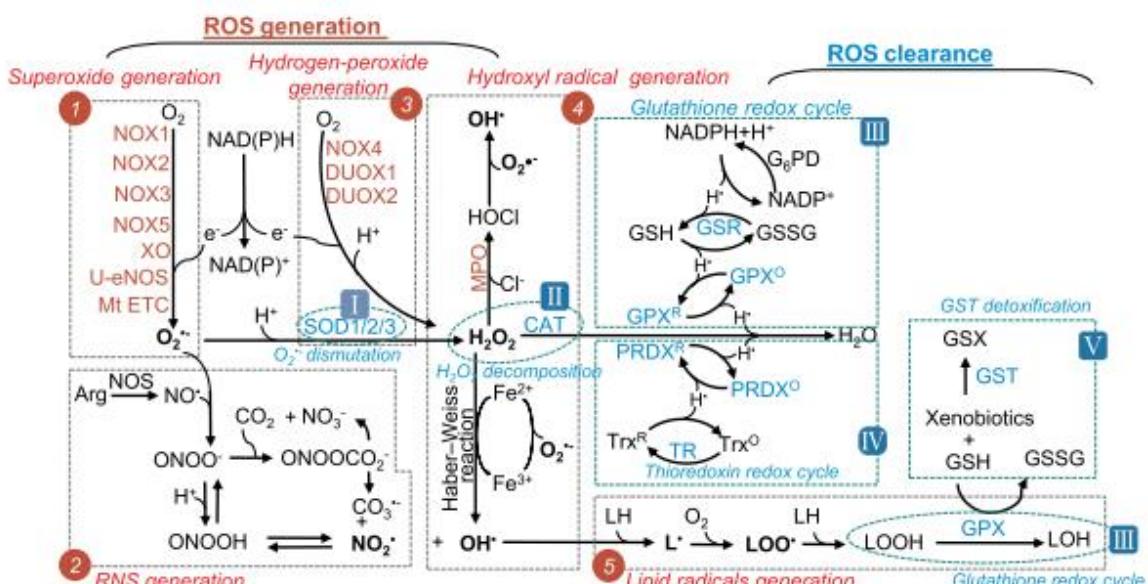
Geradoras	Depurativas
1. Origem do radical superóxido: este sendo derivado do oxigênio tanto por reações oxidativas promovidas pelas oxidases como pela cadeia transportadora de elétrons localizada na mitocôndria	1. Desmutação do superóxido pela superóxido dismutase 1/2/3 (SOD)
2. ERNs propriamente ditas: possuindo duas fases distintas: fase aquosa (obtendo como produto final carbonato e dióxido de nitrogênio) e hidrofóbica (cujo derivados são radical hidroxil e NO_2^-)	2. Desagregando o peróxido de hidrogênio: pela ação da catalase formando H_2O e O_2
3. Geração de H_2O_2	3. Ciclo REDOX da glutationa: pela redução de peróxido de hidrogênio pela GPX (onde este também agir reduzindo radicais lipídicos) e PRDX 1/4/6 em H_2O usando o GSH como doador de elétron. Além da oxidação de GSSG e volta para GSH pela ação enzimática de GSR.

4. Origem de radicais hidroxil pela reação de Fenton ou Haber- Weiss 4. ciclo REDOX tiorredoxina reduzida (TrxR): reações específicas de óxido-redução

5. Radicais lipídicos: originadas iniciadas pelo radical hidroxil sequestrando um hidrogênio alélico de um lipídico insaturado, podendo ser conjugados e com várias reações subsequentes de posteriormente entrar da via da glutationa radicais lipídicos insaturados até a formação de hidroperóxido lipídico (LOOH).

Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* (2019)

Figura 14 -Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, vias de geração e depuração.



Fonte: Zhang *et al.* (2019)

2.3.1 Funções fisiológicas, patológicas e mecanismo transcricionais das EROs e ERNs

Em condições fisiológicas as EROs podem ser geradas inicialmente nos peroxissomos, no retículo endoplasmático (pela ação dos citocromo P450 e b5), no citoplasma (por atuação enzimática da xantina oxidase e pela via das tiorredoxina) e nas mitocôndrias a partir das NOXs (NADPH oxidases), um conjunto de enzimas de grande valor energético para maioria das vias metabólicas (como a glicólise, o ciclo de Krebs, via das pentoses fosfatos, etc), a partir delas é possível fazer uma

comunicação entre as organelas e a sinalização REDOX (Brand, 2020; Sies *et al.*, 2022). Além de atuar no metabolismo, tais espécies, como o H₂O₂, podem atuar ciclo celular, no reparo e replicação do DNA, principalmente no alongamento dos telômeros pela ação da telomerase, mas também podem colaborar na produção de anticorpos, insulina e hormônios como as prostaglandinas e leucotrienos, sendo esses últimos gerados através da oxidação do ácido araquidônico pela via ciclooxigenase ou lipoxigenases (Cenci *et al.*, 2007; Hanna *et al.*, 2018; Srinivas *et al.*, 2019; Laporte *et al.*, 2020; Sies *et al.*, 2024).

Na matriz mitocondrial ocorre o processo de fosforilação oxidativa, conhecida também como cadeia transportadora de elétrons (CTE), a qual é mediada por cinco complexos e o citocromo C, que são dependentes de H₂O₂ e O²⁻ para que possam realizar as reações subsequentes e interdependentes, principalmente as do ciclo de Krebs (Mailloux, 2021). No processo isquêmico ou no acidente vascular encefálico (AVE), por exemplo, há o processo reverso da CTE, onde o ocorre o acúmulo de succinato nos tecidos e a mudança da atividade do NADH, o qual pode ser encontrado no complexo I (ubiquinona oxidoredutase) e por conta disso ocorrerá a transferência reversa de elétrons, este processo é mediado por uma forma derivada do succinato capaz de redirecionar o ubiquinol para o complexo I modulado pela NADH dehidrogenase, cujo modulação têm a finalidade de produzir EROs de forma desordenada (Chavda *et al.*, 2023). O sistema REDOX e as EROs estão envolvidos também na regulação e proliferação celular, agindo como segundo mensageiros, como exemplo, na diferenciação celular de células tronco embrionárias nos estágios iniciais devido a ação de baixas concentrações de H₂O₂, estimulando o surgimento dos cardiomiócitos ou atuando no complexo excitação – concentração na eletrofisiologia cardíaca (D'oria *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2006).

Já as ERNs, principalmente o radical óxido nítrico, são responsáveis pelo relaxamento e pela proliferação vascular das células musculares lisas, além de auxiliarem na agregação plaquetária, na adesão dos leucócitos no mecanismo de diapedese, na angiogênese, na formação e regulação do tônus vascular e dos trombos e na hemodinâmica (Kruk *et al.*, 2019). Além disso, há estudos que indicam estas espécies possam contribuir tanto para a retroalimentação túbulo-glomerular quanto para o funcionamento da angiotensina II, no sistema renina-angiotensina-angiotensinogênio (SRAA), para que haja a regulação do fluxo sanguíneo e da

integridade endotelial (Carlstrom, 2021). Além deste radical, o nitrito também pode atuar nestes contextos, sendo este mediado pela via clássica NO-sGC (guanilato ciclase solúvel)-cGMP (guanosina 3',5' monofosfato cíclico) ou pelos mecanismos de nitratação (adição de íon *nitronium* (NO²⁺) para grupos nucleofílicos) ou nitrosilação (formação de espécies de nitrosil, espécies/ radicais ligados a metais centralmente) de maneira conjunta com as demais espécies bioativas de nitrogênio (NO^{2•}, ONOO⁻, N₂O₃ e Heme-NO) independentes de cGMP, as quais podem modificar proteínas, lipídios, nucleotídeos, metais através do processo de transnitrosação (transferência de NO de uma molécula para outra), resultando em alterações da função gênica, enzimática, sinalizadora e/ou receptora, além de proporcionar efeitos benéficos como anti-inflamatório, inotrópicos e antimicrobiano (Blood *et al.*, 2017; Lunderg *et al.*, 2013). Contudo, em condições patológicas, exerce funcionalidade reversa, corroborando para evolução do quadro sintomatológico, por exemplo, em pacientes com osteoartrite, o aumento exorbitante de óxido nítrico pode levar a inúmeras manifestações dentre elas estão: degradação da cartilagem, modificação da matriz metaloproteinases (MMP), maiores números de osteoclastos, senescência dos condrócitos e hiperplasia sinovial (Jiang *et al.*, 2023).

Existem inúmeros estudos recentes que afirmam diversas aplicabilidades para ambas as espécies, em quantidades capazes de manter o pleno patamar homeostático, destacando-se o sistema nervoso, associados ao crescimento axonal e dendrítico, além do desenvolvimento cognitivo, o sistema imunológico, a esteroidogênese e a termogênese (Chouchami *et al.*, 2016; Kil *et al.*, 2012; Mills *et al.*, 2016; Muri *et al.*, 2021; Sies *et al.*, 2022; Vicente-Gutierrez *et al.* 2019). Contudo, a atividade catalítica exercida pelo óxido nítrico nas granulações, em específico a mieloperoxidase (MPO), presentes nos polimorfonucleares (PMN) ainda é a atribuição mais reportada, essa é capaz de influenciar a regulação do mecanismo inflamatório e dos eventos infecciosos (Senderovic *et al.*, 2024).

Esses efeitos são oriundos de importantes moléculas transpcionais, dentre elas se destacam, o fator nuclear kappa beta (do inglês, “*nuclear factor kappa beta- NF-kb*”), Nrf2 (do inglês, “*nuclear factor (erythroid-derived-like 2)*”), FOXOs (do inglês, “*forkhead box protein O*”), HIF (do inglês, “*hypoxia inducible factor*”), keap1 (do inglês, “*kelch-like ECH- associated protein*”), MAP quinases, mTOR (do inglês, “*mammalian target of rapamycin*”) e PTPs (do inglês, “*phosphatase tyrosine proteins*”) (Meo *et al.*, 2016;

Sies *et al.*, 2024). Em sua maioria, tais moléculas transcritoras são compostas por 20% de grupamentos tiolatos, os quais possuem em sua conformação aminoácidos de cisteína, os quais são extremamente sensíveis a resposta REDOX e desta maneira favorecem a resposta sinalizadora nas células (Fourquet *et al.*, 2010).

O Nrf2-keap1 trata-se de um dos maiores sistemas transpcionais capazes de manter o mecanismo REDOX homeostático (Trombetti *et al.*, 2021), seu funcionamento é sumariamente descrito em três etapas:

1. Keap 1 liga-se ao Nrf2 no citoplasma, executando uma atividade reacional de ubiquitinação e posteriormente sua degradação;
2. Já em condições em que haja mudanças dessa condição, sofre a ação das EROs e ERNs, cujo possuem habilidade de oxidar domínios de cisteína modulando a conformação de keap 1;
3. Por fim, Nrf2 expressará a defesa antioxidante quando associada a outra proteína denominada ARE (do inglês, “*antioxidant response element*”) (Itoh *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2022).

Pesquisas recentes associam este fator a mecanismos pro-inflamatórios e anti-inflamatórios, ou seja, correlaciona-se com a ativação do sistema imunológico e suas células (como PMN, células dendríticas entre outras) desencadeando a inflamação (Fagiani *et al.*, 2020; Mills *et al.*, 2018), além de ter associação direta a intoxicação promovida por Hg (Kang *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024). Essa correlação ao estímulo inflamatório ainda não é clara, mas acredita-se que a proteína ARE pode ser codependente do NF-κB e de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β e IL-6 (interleucinas) quando o balanço REDOX está abaixo do estimado (Kobayashi *et al.*, 2016).

Uma expressão exacerbada dessa molécula pode ativar inconscientemente o NF-κB, isso sensibiliza o mecanismo REDOX e as EROs que são capazes de influenciar a via da MAP (do inglês, “*mitogen-activated protein*”) quinase e PI3K (do inglês, “*phosphatidylinositol 3 kinase*”)/PTEN (do inglês, “*phosphatase with sequence homology to tensin*”)/akt (do inglês, “*protein kinase B*”) importantes para degradação de I-κB (do inglês, “*nuclear factor kappa beta inhibitor*”) (Chen *et al.*, 2017; Forrester *et al.*, 2018). Entretanto, as próprias EROs presentes no meio intercelular já influenciam esse mecanismo sem precisar necessariamente de super- expressão, pois a presença de regiões de cisteínas oxidadas presentes no DNA ligam-se ao NF-

kB, se sensibilizam com as EROs, ativam de forma direta esse inibidor (Olivera-Marques *et al.*, 2009).

Além disso, existe o HIF (*hypoxia-inducible factor*) trata-se de um conjunto de fatores nomeados de 1 a 3, responsáveis por regular a hipoxemia (baixa de O₂), a qual pode surgir mediante a alta expressão das NOXs, em especial a NOX 4, e consequentemente promove ação das EROs de forma desordenada e com isso desestabilizando o HIF-1 (composto por duas subunidades α e β), essa situação pode ser revertida a partir de um mecanismo de hidroxilação específico por conta da HIF prolin hidroxilase, cuja habilidade é controlar as EROs contribuindo para o retorno da oxigenação, isto é, o retorno ao estado de normoxia (Acker *et al.*, 2006; Diebold *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2015). Em casos em que há perturbação dos barorreceptores (células sensoriais de percepção de pressão arterial), por exemplo, além de ocorrer a influência desta molécula transcricional, sofrerá também influência direta da família FOXO (Eijkelenboom *et al.*, 2013). Tal família pode propagar reações pós translacionais não enzimáticas reversíveis oriundas das modulações dos grupamentos tióis pela ação das EROs, chamadas de FOXOs S-peroxirredoxinilado, ou seja, interações de oxidação desses grupamentos com o ácido sulfênico / sulfeto de hidrogênio (H₂S) pelo peróxido de hidrogênio resultando em disulfetos e/ou persulfetos ligados a esse sítio molecular e consecutivamente exercendo sua atividade de adaptação ao estresse (Krafczyk *et al.*, 2022).

2.3.1 Influência das EROs e ERNs no desencadeamento inflamatório

O processo inflamatório é desencadeado a partir da percepção de seus receptores, chamados de Receptores de Reconhecimento Padrão (RRP), como exemplo, os DAMPs e PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno ou ao dano), e auxiliam na sinalização primária ou “sinal 0” contra aos agentes invasores, como bactérias, vírus, toxinas, entre outros na imunidade inata (Tang *et al.*, 2012). Tendo em vista isso, sabe-se que principalmente os DAMPs são associados a resposta ao estresse ou as substâncias desencadeadoras dele, como as EROs e as ERNs (Collet *et al.*, 2018). Além disso, os DAMPs possuem proteínas com domínios de cisteinas livres capazes de promoverem reações oxidativas, que em conjunto com os PMN e essas espécies reativas tornam-se essenciais para a resposta fagocitária, induzindo a aniquilação dos agentes danosos (Carta *et al.*, 2009).

O óxido nítrico é uma das espécies de maior funcionalidade no sistema imunológico, tanto no adaptativo como no inato, existem diversos estudos que atribuem a ele diversas atividades, como ação anti-inflamatória, por auxiliar no processo fagocítico (“respiratory burst”), na quimiotaxia, na migração de citocinas e fatores como NF- κ B, IFN- γ (interferon gamma) e nas ciclooxygenases, esta última pela via do ácido araquidônico, tais ações são induzidas principalmente por iNOS e eNOS (Andrabi *et al.*, 2023). O mecanismo descrito como “respiratory burst”, o qual ocorre devido a presença dos grânulos azurófilos, conhecidos como MPO, é sumariamente descrito por Galijasevic (2013):

- a. A ação da NADPH oxidase inicia o processo pela geração de superóxido;
- b. O superóxido pode ser gerar enzimaticamente via SOD ou de forma espontânea pela ação do H_2O_2 , cujo habilidade é denudar a cromatina do agente invasor ou toxina;
- c. Deste modo, ocorre a liberação da MPO e da elastase pelo fagossomo, onde essa origina HOCl⁻ e outros halogenatos, os quais irão promover desenrolamento da cromatina;
- d. Pela reação de Fenton, ocorrerá a formação do OH[•];
- e. A iNOS é ativada e consequentemente gera NO;
- f. NO e O^{2•} combinam-se e resultam em peroxinitrito e outras ERNs
- g. Por fim, ocorre a fagocitose e posteriormente a lise da membrana da célula invasora entre 30- 60 minutos.

Esse processo recentemente passou-se a ser denominado como NETs (do inglês, “neutrophil extracellular traps”), ocorrendo de modos distintos: o clássico ou lítico (com participação das EROs e ERNs) e o não lítico (Papayannopoulos *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2024).

Há estudos que indicam uma pequena influência desses radicais e não radicais também nos linfócitos B e T em pequenas quantidades quando comparados ao PMNs, porém esse mecanismo ainda não é muito conhecido (Thomas, 2017). Por outro lado, existem pesquisas que indicam que baixos níveis de HOCl⁻ podem promover o desligamento da anti-proteinase inibitória endógena específica da elastase, conhecida como α 1-antitripsina (Montecucco *et al.*, 2009), enquanto altos níveis podem ocasionar a proteólise dessas, resultando na modulação do efeito imune (Lin *et al.*, 2024).

Assim como nos PMNs, tais espécies, quando desbalanceadas, podem levar a uma movimentação contraria da barreira protetiva construída pelas anti proteinases no plasma humano, cuja função é a proteção contra a super expressão das proteases e de seu sistema lítico que funciona de maneira incontrolável que também impulsionará um enfraquecimento do sistema imune, dentre elas estão: α -1 anti-tripsina, α -2 macroglobulina e a α -1 anti quimiotripsina (Siddiqui *et al.*, 2016).

Antes que haja a indução a essa resposta celular, a produção e sinalização ao processo inflamatório é conduzido por meios transpcionais, principalmente pelas vias NF- κ B e JAK/STAT (Canton *et al.*, 2021).

A rota do NF- κ B (do inglês, “*nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells*”) é dividida em duas etapas: a não canônica e a canônica. Na canônica, o processo ocorre inicialmente no citosol, através do complexo IKK (do inglês, “*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor*”) que é um dos grandes auxiliadores para impulsionar a ativação de NF- κ B (Zhang *et al.*, 2016). Esse possui duas subunidades em dois diferentes grupos:

- a. Catalítico: subdividido em IKK β , o qual será o responsável pela etapa fosforilativa ativador de NF- κ B, o qual será degradado pelo proteossoma após cumprir seu objetivo e o IKK α , cuja função é sinalizar NF- κ B com estímulos ocasionados por agentes invasores/ toxinas/ EROS ou ERNs (Nam *et al.*, 2011). A influência das EROS ou ERNs pode depender de sua localização oxidativa, podendo ser nuclear ou citoplasmática, contudo, IKK α pode perceber facilmente a presença de H₂O₂ e assim translocando NF- κ B até o núcleo celular para sofrer transcrição e mediar a resposta final (Huang *et al.*, 2013).
- b. Regulatório: NEMO (do inglês, “*nuclear factor κ B (NF- κ B) essential modulator*”) ou IKK γ , cujo o papel é facilitar a ativação de NF- κ B, modular estímulos exercidos por citocinas pró-inflamatórias em diversas condições, como doenças autoimunes, bem como regular funções da imunidade inata (Karin, 1999).

Caso a resposta ao estímulo seja pró-inflamatório, na parte não-canônica, a qual ocorre a nível nuclear e também recebe auxílio de IKK α , será impulsionada a induzir a secreção de citocinas, como o inflamossoma (NLRP3) e a IL-1 β (interleucina 1 Beta) e o TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) ou ativar o fator de células B (do inglês, “*B-*

cell activating factor"- BAFF), sendo sua inibição conduzida pela super-expressão da SOD (Forrester *et al.*, 2018).

Outra rota que contribui para surgimento da inflamação é a JAK/ STAT (do inglês, “*tyrosine kinases Jak* (‘*Janus kinase*’)/*Signal transducer and activator of transcription*”), cujo papel é essencial também para as citocinas e para os fatores de crescimento, sua ativação e desenvolvimento a favor a resposta inflamatória pode ser enumerada da seguinte forma, segundo a autora Canton *et al.* (2021):

1. Quando esta rota recebe estímulos em seus receptores da ação de invasores ativam a proteína quinase de tirosina JAK (Janus Kinase);
2. Em seguida, essa é redirecionada e fosforilada pela STAT até o núcleo celular e sua atividade dimerizadora pode ser facilmente influenciada pela ação das EROs, por reações de oxidação;
3. Quando está no núcleo, as STAT serão traduzidas em forma de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ (interferon gamma) por macrófagos tipo M1 ou anti-inflamatórias, como a IL-4 (interleucina 4) pelos fagócitos M2;
4. O feedback negativo desta via é controlado pelas SOCS (supressores da sinalização de citocinas).

Diante disso, diversos estudos recentes têm correlacionado estes mecanismos pró- inflamatórios com a exposição exógena ao Hg e os efeitos acometido por ele, como a injuria ao sistema renal (Gao *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2020), ao dano ocasionado ao trato gastrointestinal (Rodriguez-viso *et al.*, 2022), além das disfunções hematológicas na linhagem progenitora mieloide (Tang *et al.*, 2023).

2.3.2 Radicais lipídicos e a peroxidação lipídica: são agentes finalizadores benéficos ou maléficos das espécies reativas?

Os radicais lipídicos desempenham um papel importante e essencial para formação das reações subsequentes do fenômeno da peroxidação lipídica, quando estão em desequilíbrio e em grandes concentrações, tratando-se da sua via de origem, porém quando associado a esse traz efeitos maléficos, como a morte celular, a danos ao arcabouço gênico, além de afigir a integridade da membrana celular causando, como exemplo, a quebra da membrana eritrocitária (Ferreira *et al.*, 2024; Fujii *et al.*, 2024).

A ocorrência de hemólise pode ser justificada pela presença dos grupos tióis (-RSH) que serão convertidos em pontes de dissulfetos (R-SSG) às custas do excesso de GSSH vindo da cascata da glutationa promovido pela sobrecarga de ferro circulante e pelas EROs, levando à desnaturação proteica e resultando em processos lesivos intracelularmente, como a oxidação de hemoglobina (Hb) a meta-Hb e consequentemente dando origem aos corpos de Heinz (Silvilotti *et al.*, 2004). O ferro pode ser considerado um intensificador ou catalisador para iniciar o processo de PL (Peroxidação Lipídica), sendo este de forma agindo de forma rápida ou lenta, a depender de sua valência (Rochette *et al.*, 2022).

Entretanto, possuem uma pequena função secundária, a qual pode ser fisiológica dependendo do contexto a qual for inserido, como moduladores intracelulares indiretos da cascata do ácido araquidônico, um tipo de ácido graxo poli-insaturado derivado da biossíntese do ácido linoleico (ômega-6), que pode ser associado a auto oxidação oriundas desses radicais, afetando o mecanismo inflamatório exercido por suas enzimas, as ciclooxygenases (COX) e as lipooxygenases (LOX) e de seus produtos hormonais, como os eicosanoides, a exemplo das prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e leucotrienos (Perini *et al.*, 2010; Kobercki *et al.*, 2013; Trostchansky *et al.*, 2021), sendo assim colaborando com um efeito benéfico quando em homeostase.

Com isso, também é possível correlacionar uma ação dupla aos ácidos graxos poli-insaturados (do inglês, “*polyunsaturated fatty acids*”), como o ácido linoleico (Omega-6) e o ácido alfa-linoleico, quando esses se encontram em concentrações aceitáveis pelo organismo desenvolvem efeitos fisiológicos, como o transporte de oxigênio para o plasma sanguíneo, além de participarem da biossíntese de hemoglobina e do ciclo celular, sendo, portanto, considerados ácidos graxos essenciais (Martin *et al.*, 2006), contudo, também desempenham papel patológico, quando exacerbados, pela mesmo fenômeno anteriormente citada.

A peroxidação lipídica (PL) é o fenômeno pelo qual os radicais lipídicos e os PUFA's irão ser submetidos, em caso de uma situação patológica, onde há produção excessiva de seus produtos secundários, originados durante a decomposição de hidroperóxidos lipídicos (ácido linoleico, ácido docosaeáenoico e ácido araquidônico), a exemplo do 4-HNE (4-hidroxi-2-nonenal) e o MDA (malonildialdeído), que são compostos carbonílicos considerados altamente reativos, tóxicos e lesivos,

por terem a capacidade de fazerem ligações cruzadas confundindo moléculas vitais, como o DNA ou RNA, promovendo mutações ou induzindo a morte celular (Dyall *et al.*, 2022). Atualmente, estes podem ser utilizados como biomarcadores específicos do EO (Carmo *et al.*, 2022; Morales *et al.*, 2019).

A PL tem uma dinâmica reacional própria, sumariamente, sua iniciação ocorre pela captura do H⁺ presente nas PUFAAs das membranas, isso é decorrente da ação de espécies reativas chaves geradas a partir da reação de Fenton, Haber Weiss ou pela decomposição de hidroperóxidos, como o radical hidroxil (OH[•]), alcoxila (LO[•]) ou hidroperoxil (HOO[•]), resultando em radicais lipídicos (L[•]) (Ferreira *et al.*, 1997). Em seguida, esses são conduzidos a duas reações de propagação, a primeira de rápida ocorrência em conjunto com O₂, gerando LOO[•] (radical peroxila), sendo este o principal incentivador para a segunda reação, reconhecida como uma auto oxidação, consistindo em um novo sequestro de H⁺ do mesmo PUFAAs, formando novamente um radical lipídico (L[•]), podendo ou não levar a formação de subprodutos, como endoperóxidos e epóxidos (Zielinski *et al.*, 2017). Por fim, o término dessa reação em cadeia ocorrerá quando os radicais L[•] e LOO[•] se autodestroem, isto é, se anulam ou produzem não radicais, os quais podem passar pelo mecanismo de Russell, conjunto de reações de decomposições capazes de originar tetra óxidos, consequentemente levando a formação dos produtos finais da PL, como os compostos carbonílicos (MDA e 4-HNE) ou O₂ singlet (Valgimigli *et al.*, 2023).

Levando em consideração isso, o Hg é conhecido por induzir o aumento desproporcional das EROS, ocasionando o esgotamento das fontes antioxidantes do organismo, principalmente a GSH, além de levar a peroxidação lipídica desgovernada resultando na produção de espécies reativas mais tóxicas (Ahmad *et al.*, 2011). Com isso, um estudo publicado recentemente, realizado com pescadores que foram expostos ao Hg na Lagoa de Mundaú, no estado de Alagoas, revelou que existe uma correlação direta do Hg com a PL, por aumentar em 151% o conteúdo de subprodutos carbonílicos, principalmente o MDA, presente no sangue de pescadores expostos ao composto tóxico ($16,48 \pm 4,11$ mmol/ mg de proteína) quando comparado ao controle ($6,70 \pm 2,52$ mmol/ mg de proteína), além de causar depleção do principal sistema antioxidante, quando analisado a razão GSH/GSSG (Controle: $12,1 \pm 2,91$ vs. exposto: $10,1 \pm 4,14$ μ mol/mg de proteína) e do conteúdo de grupamentos tióis

(controle: $1,59 \pm 0,85$ vs. expostos: $1,01 \pm 0,63$ mmol/mg de proteína) (Silva *et al.*, 2021).

2.3.3 Ferroptose: um novo modo de levar a estrutura celular a morte

A morte celular é excepcional para o funcionamento e regulação dos processos fisiológicos, principalmente para manutenção da homeostase para que haja a eliminação das células indesejadas ou aquelas que já cumpriram seu papel (Kaur *et al.*, 2021), como os eritrócitos, com vida útil de 120 dias (Joshi *et al.*, 2024), no entanto, somente em 1965, esse conceito foi introduzido por Lockshin e Williams e denominado morte celular programada (Lockshin *et al.*, 1965), a qual atualmente é referida como “morte celular regulada” (RCD) de acordo com o *Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)* (Galluzzi *et al.*, 2018)

Desde então, pesquisadores ao redor do mundo descobriram inúmeras formas das células entrarem em processo de extinção, sejam essas ocasionadas pela apoptose (Kerr *et al.*, 1972) ou por outras maneiras, como a necrose ou a autofagia (Duve *et al.*, 1966; Nevalainen, 1975), no entanto, até o de ano 2012, nenhum dos seis modelos mais conhecidos de levar a célula a depleção, consideravam mecanismos frutos de um estresse oxidativo desgovernado, conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 – Seis formas mais comuns de levar a célula a morte, até 2012.

Tipo de Morte Celular	Ano da Descoberta/Definição	Mecanismo
Apoptose	1972	Ocorre sem a necessidade do processo inflamatório. Duas vias: <ul style="list-style-type: none"> • Via intrínseca (mitocondrial): atuação de caspases; • Via extrínseca (receptores): ativação de receptores transmembranares, como TNF.
Autofagia (autólise)	1975	Formação de autofagossomo com posterior agregação ao autolisossomo.

Necrose	NR	Processo passivo desencadeado pelo trauma
Piroptose	2001	Auxílio de caspases inflamatórias, como a 1 e 11, seguida de ativação gasdermina D e liberação de citocinas IL-1 β e IL-18.
NETose	2004	Ocorrência através dos neutrófilo pelo processo de descondensação do DNA nuclear de si mesma.
Necroptose	2005	Mediada pelo necrosoma (composta por proteínas RIPK 1 e 3) seguido da ativação de MLKL (<i>mixed lineage kinase domain-like protein</i>).

NR= não relatado

Fonte: Adaptado de Park *et al.* (2023).

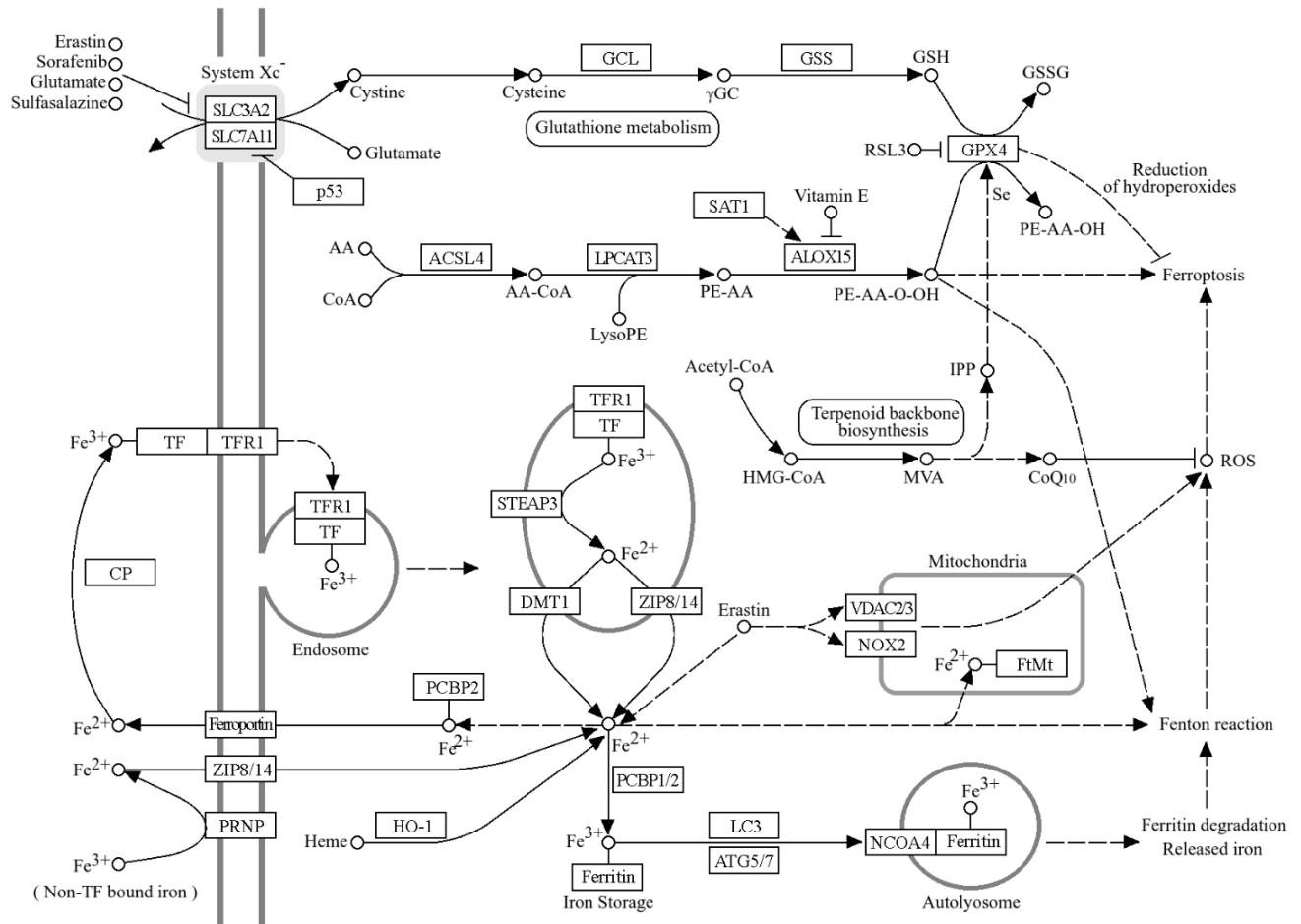
Sendo assim, somente em 2012, Dixon *et al.* (2012) revelaram através do estudo de células neoplásicas mutantes do RAS de camundongos induzidos com dois compostos químicos, a Erastina e o RSL3 (do inglês, “Ras selective lethal 3”), que essas substâncias foram grandes desencadeadoras de um novo tipo de morte celular, reconhecida por ele e seu grupo como “ferroptose”, ocasionada pelo acúmulo de ferro circulante e pela PL, além de levar ao bloqueio do sistema Xc- (transportador de cisteína e glutamato), importante para rota da glutationa.

Esse “novo” mecanismo letal, foi descrito da seguinte forma:

“A ferroptose é dependente do ferro intracelular, mas não de outros metais, e é morfológica, bioquímica e geneticamente distinta da apoptose, necrose e autofagia” (Dixon *et al.*, 2012).

Esse tipo de morte celular, pode sofrer influência de outras vias metabólicas, as quais podem ser inibitórias ou geradoras, conforme é demonstrado pela sinalização completa abaixo (Figura 15) (Chen *et al.*, 2020). Entretanto, baseia-se em três comandos centrais, sendo eles: perda da capacidade da reparação de PUFA-PLs promovida pela GPX4 (glutationa peroxidase 4), disponibilidade do ferro em realizar reações de oxido-redução e por fim, a formação de PUFA-PLs propriamente dita (Dixon *et al.*, 2019).

Figura 15- Rota completa da Ferroptose

Fonte: Kanehisa *et al.* (2023)

Com a finalidade de simplificar os principais controladores e reguladores da via, alguns autores têm associado oito passos fundamentais, sendo eles, o metabolismo do ferro, a influência do estresse oxidativo exagerado (EO), a rota do mevalonato (colesterol), sistema Xc-, a rota da glutatona, a via NRF2, CTE e ciclo de Krebs (CK) e por fim, as lipoxigenase (LOX) e ácido araquidônico (AA-ALOX15) (Figura 15, Tabela 10 e 11) (Chen *et al.*, 2020).

A ferroptose, bem como a PL, EO e os radicais livres, também têm grande importância fisiológica, como sua ação na supressão de tumor (agindo de forma conjunto com o gene p53 e BAP 1 e na vigilância do sistema imune, mas uma vez ressaltando que a quantidade ou a forma como o estímulo é transmitido são necessários para que haja a passagem de um estado considerado homeostático para torna-se patológica (Jiang *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2018).

Tabela 10 – Definições e principais controladores da morte celular por ferro.

Controladoras	Definição
1. Metabolismo do ferro	<ul style="list-style-type: none"> A entrada de ferro férrico (Fe^{3+}) é promovida somente quando este ligado ao transportador de transferrina (Tf), o qual posterior irá se ligar ao receptor de mesmo nome; Este ferro é tóxico para o meio intracelular nesta valência, desta forma acaba sofrendo redução para Fe^{2+}, através da STEAP3 via endocitose, sendo liberado por DMT1; A partir disso, teremos uma porção de Fe^{2+}, chamada de lábil ou circulante, a outra segue para armazenamento via ferritina, que será levada a autofagia pelo NCOA4, podendo também liberar Fe^{2+}; A porção circulante pode sofrer a reação de Fenton.
2. EO	<ul style="list-style-type: none"> Influência o pool de Fe^{2+} circulante do metabolismo de ferro a gerar radicais livres por reação de Fenton; Promovedor da LP, resultando em PUFA e produtos secundários (peróxidos fosfolipídicos tóxicos- PUFA-OOH/PUFA-PLs).
3. CTE e CK	<ul style="list-style-type: none"> Principais geradores acetil-CoA que posteriormente formará PUFA-OOH/PUFA-PLs (ácidos graxos insaturados de fosfolipídios); CK possui dupla atividade nesse mecanismo, podendo gerar NADPH auxiliará na regeneração da GSH.
4. LOX e AA	<ul style="list-style-type: none"> Principais moléculas capazes de originar PUFA; Ao se acoparem com outros cofatores específicos, como ACSLA4 (acetil-CoA sintase de cadeia longa 4), ALOX15 e LPCAT3, com funções de ativarem e catalisarem, respectivamente, as reações para formação de ácidos graxos poli insaturados de fosfolipídios (PUFA-PLs ou AA (ácido araquidônico)-PUFA).

Fonte: Adaptado de Liu *et al.* (2023); Long *et al.* (2022)

Tabela 11 – Principais rotas para depuração da ferroptose e da PL.

Inibitórias	Definição
Sistema Xc- (SLC7A11 e SLC3A2)	<ul style="list-style-type: none"> Auxiliadores no transporte e conversão de cisteína e glutamato, isto é, possibilitam a troca dentro da célula e contribuem para síntese de GSH (glutatona).
Rota da GSH	<ul style="list-style-type: none"> Em especial a GPX4 (Glutatona peroxidase 4), possui capacidade de reduzir os PUFA-OOH (peróxidos fosfolipídicos tóxicos) e PUFA-OH (álcoois lipídicos benignos)/ PUFA-PLs
Rota do Mevalonato (metabolismo lipídico)	<ul style="list-style-type: none"> Ajuda na síntese de Coenzima 10 (CoQ10-ubiquinona), atuando como precursor, além de ter um agente redutor, o FSP1 que colabora para conversão de CoQ10 em CoQ10H2
NRF2-KEAP1-p62	<ul style="list-style-type: none"> Via transcripcional antioxidant em resposta ao EO, ajuda a traduzir genes da GSH e para o Sistema Xc-; Ao transcrever o gene HO-1 (heme oxigenasse), cujo papel é degradar a heme, e assim reduzir os níveis de ferro circulantes.

Fonte: Adaptado de Long *et al.* (2022); Tang *et al.* (2023)

Essa forma não apoptótica de induzir a morte celular, se diferencia das outras mortes existentes, pela sua co-dependência da lipogênese e por sua interação com os fosfolipídios presentes no envoltório da membrana, podendo levar a sua ruptura (Jiang *et al.*, 2021; Liang *et al.*, 2022; Tang *et al.*, 2021). Esse evento pode ocorrer devido ao acúmulo de hidroperóxidos lipídicos tóxicos (PUFA-OOH), principalmente aqueles gerados através da reação enzimática via LOX resultando em 15- HpETE (15-hidroperoxi-araquidonil-fosfatidiletanolamina) (Yamada *et al.*, 2024), que podem acabar reagindo com esses fosfolipídios, levando ao influxo dos principais canais iônicos, como Ca^{2+} e Na/K ATPase, e posteriormente sua quebra (Dixon *et al.*, 2024). Além disso, esse mecanismo pode induzir uma disfunção mitocondrial severa e incontrolável (Yamada *et al.*, 2024).

Tais hidroperóxidos lipídicos (LOOH), podem gerar subprodutos secundários

também maléficos, como descritos anteriormente, como os aldeídos reativos, o 4-HNE e o MDA (Lee *et al.*, 2021), gerados a partir da PL não enzimática (Punziano *et al.*, 2024), podem ter uma interação indireta, que irá colaborar com uma maior susceptibilidade a ferroptose, inativando GPX4, impossibilitando esse de converter PUFA-OOH em PUFA-OH ou até mesmo intensificarem o processo, em especial, o aldeído 4-HNE, ao reagirem com proteínas, através das bases de Schiff (nos domínios de Cisteína/Histidina/Lisina) e adutos proteicos de Michael (Arginina/Lisina) (Milovic *et al.*, 2023; Saraev *et al.*, 2024).

Alguns PUFA, já são descritos na literatura por contribuírem com esse mecanismo, como o ácido araquidônico e o ácido linoleico (Mortensen *et al.*, 2023). No caso do primeiro, é considerado o mais favorável a sofrer esse processo, pois é facilmente oxidado, justamente por possuir átomos de hidrogênio bi-alílicos, isto é, ligados entre os grupos metíleno (-CH²), os quais formarão o araquidonil (C 20:4) e o adrenoil (C22:4), principalmente devido a posição das suas duplas ligações são mais propensos a serem abstraídos pelas EROs de modo não enzimático, sendo esses capazes de reagirem com as fosfadiidiletanolaminas (PE) (Zhang *et al.*, 2020). Também podem participar outros compostos, como os diacil e éteres ligados a fosfolipídeos (PUFA-ePLs), esses últimos associados aos peroxissomos e aos plasminogênios no retículo plasmático (RE) (Aldrovandi *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2023). Uma vez, incorporados nos fosfolipídeos de membrana promovem uma reação de peroxidação em cadeia de modo irreversível, resultando na falha da fluidez e no influxo de transportadores (Dixon *et al.*, 2024).

A incorporação de PUFA aos fosfolipídeos, é diretamente dependente do metabolismo lipídico, na PL enzimática, uma vez que é necessário a participação de acetil coenzima A (acetil-CoA), originados no ciclo de Krebs (CK) e na mitocôndria (Gao *et al.*, 2019), para auxiliar na formação de PUFA-CoA, que possuem domínios acil livres, que irão ser ativados por ACSL4 e posteriormente serão remodelados por enzimas, cuja finalidade é adicionar ou remover PUFA nos fosfolipídeos membranares como exemplo, liso-fosfatidil-colina-aciltransferase 3 (LPCAT3), e 1-acilglicerol-3 – fosfato O- aciltransferase 3 (AGPAT3), através de uma reação de esterificação, onde o PUFA-CoA é esterificado na posição *sn*2 do liso fosfolipídio (Liang *et al.*, 2022), resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos específicos como os PUFA-PLs, a exemplo da fosfatidiletanolamina contendo ácido araquidônico (PE-AA) e ácido

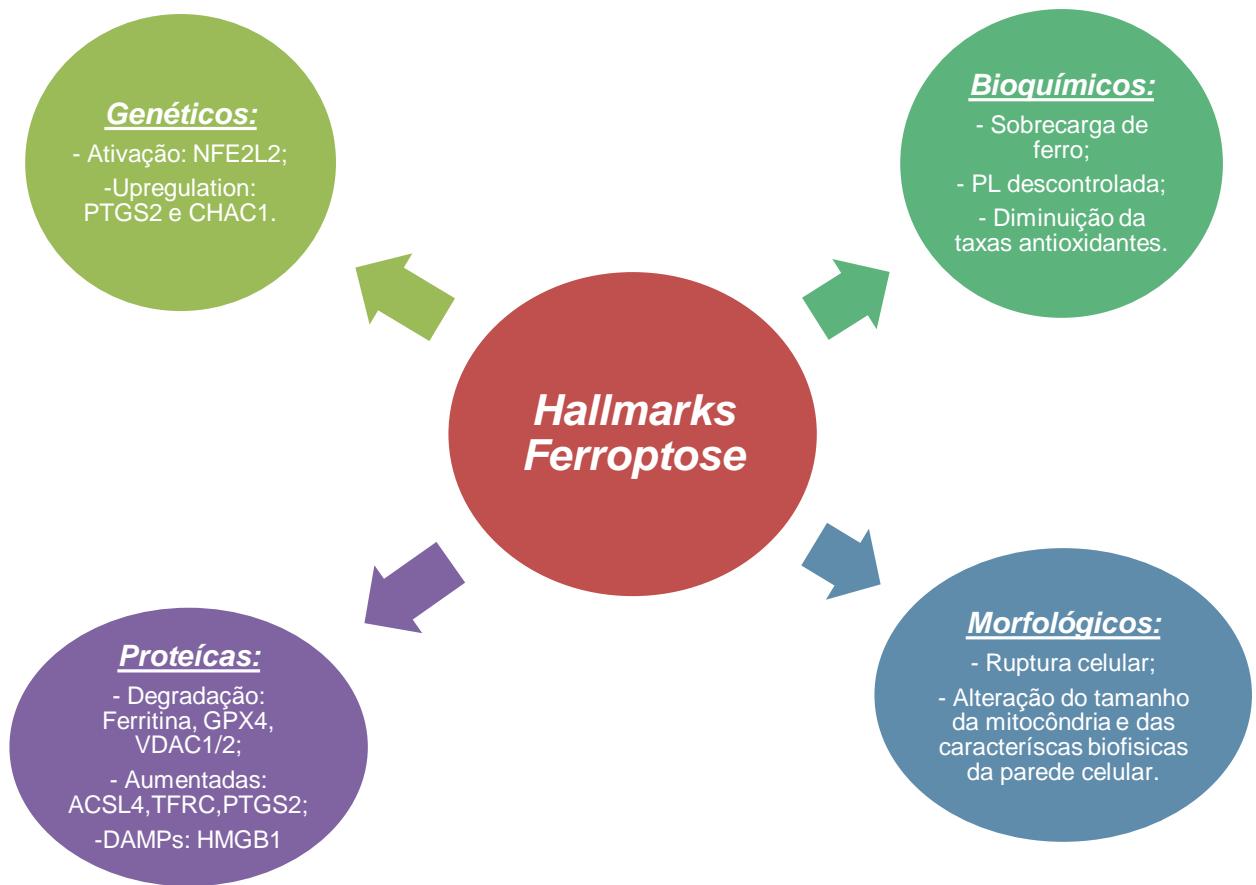
adrenóico (PE-AdA) (Pope *et al.*, 2023). Esse processo pode ser acelerado pela presença do ferro circulante e pela reação de Fenton (Conrad *et al.*, 2018).

Entretanto, a síntese de novo desses ácidos, pode combater tal processo, uma vez que produz ácidos graxos monosaturadorados (MUFA), como o ácido oleico e o ácido palmitoleico (Lin *et al.*, 2021), além deles, são utilizados com esse mesmo intuito os quelantes de ferro, como a DFO (deferoxamina) e os antioxidantes, como a quercetina (Cruz-Gregorio *et al.*, 2023; Du *et al.*, 2022).

Além disso, estudos recentes têm avaliado também a mudança do átomo de H por deutério (D) nos PUFA, promovendo assim uma estabilidade maior das ligações e menor reatividade com a PL, mas também têm relacionado a ação fosforilativa de PKC β II em ACSL4, atuando como mensageiro e marcador da ferroptose, além de uma possível participação do colesterol nesse mecanismo, uma vez que pode sofrer oxidação e posterior ser levado a PL, contudo essa hipótese ainda é desconhecida (Forcina *et al.* 2023; Von Krusenstiern *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2022).

Assim como outros processos letais, a morte celular por ferro, também possui biomarcadores (do inglês, “hallmarks”) importantes e devem ser levados em consideração para que haja uma avaliação direta ou indireta a fim de investigá-la e assim indicar ou demonstrar possibilidades de alternativas terapêuticas, além de servir para compreender hipóteses ainda não esclarecidas (López-Otín *et al.*, 2021), como demonstrado na Figura 16.

Figura 16- Hallmarks da ferroptose



CHAC1: glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1; NFE2L2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PTGS2: prostaglandina-endoperoxide synthase 2; TFRC: transferrin receptor; ACSL4: acyl-coA synthetase long-chain family member 4; VDAC 1/2: voltage dependente anion channel 1/2; GPX4: glutathione peroxidase 4.

Fonte: Adaptado de Chen *et al.* (2019); Dixon *et al.* (2019)

Diante disso, existem estudos que relatam uma correlação entre os metais pesados, também conhecidos como metais não- ferro (do inglês, “*Non-ferrous metal*”), tanto pela geração descontrolada de EROs, como arsênico (Meng *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2024) e câdmio (Guo *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024), quanto pela formação de complexos metal-GSH nos domínios de cisteínas através de grupamentos tióis livres (-SH), como no caso do mercúrio (Chen *et al.*, 2023) e que podem induzir esse tipo de morte (Aschner *et al.*, 2022 ;Sahoo *et al.*, 2023; Sepand *et al.*, 2023).

2.4 Infertilidade masculina: aspectos epidemiológicos e a interferência do Hg e seus desdobramentos

A infertilidade é considerada uma condição que afeta 1 em cada 6 pessoas ao redor do mundo, sendo definida pela falha em se obter sucesso na concepção, com tempo estimado de prevalência de 12 meses, contudo estudos realizados nas Américas identificaram que esse período pode se estender até 15 meses (WHO, 2023). Essa condição pode ter diversas etiologias, sendo subdivididas em três: a feminina, a masculina, idiopáticas e/ou a combinação das três.

Somente a infertilidade masculina contribui com cerca de 30-50% dos casos, sendo decorrente dos seguintes fatores: disfunções endócrinas e/ ou testiculares (como a varicocele), o estilo de vida (como a influência da obesidade e do uso de cigarro), de fatores genéticos congênitos (como a síndrome de Klinefelter) e ocupacionais e/ou toxinas (como álcool, uso de pesticidas, exposição a agentes químicos tóxicos), entre outros (Agarwal *et al.*, 2021; Eisenberg *et al.*, 2023).

Entretanto, as questões epidemiológicas envolvendo os fatores masculinos ainda são escassas, tanto a níveis nacionais como a mundiais, uma vez que existem inúmeros paradigmas sociais e culturais acerca dessa patologia e, portanto, levando a uma subnotificação e impossibilitando uma abordagem estatística mais precisa (Agarwal *et al.*, 2015). Tais estigmas socio-culturais correlacionados ao gênero ainda estão muito enraizados, impostos pela construção da “masculinidade hegemônica”, a qual pode levar a uma série de preceitos irreais sobre a sexualidade, como “A sexualidade masculina é frequentemente aceita e incentivada, enquanto a expressão da sexualidade feminina pode ser estritamente regulada, restringida e até reprovada”, e que consequentemente afeta a busca pelos tratamentos médicos pelos homens e atrasa o diagnóstico dessa condição (Pakpahan *et al.*, 2023).

Ainda dentro desse conceito, destaca-se outro parâmetro enrustido na construção social-cultural de “ser homem”, a coexistência da tripla virilidade, que segundo Silva (2013), subdivide- se em:

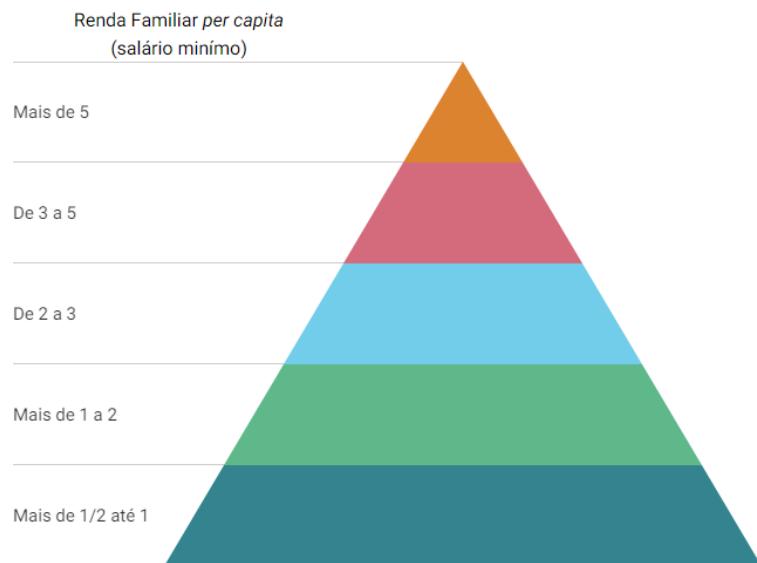
- a. Psíquica: aquela que é composto pela não apresentação de fragilidade ou sentimentos;
- b. Moral: aquela que o considera a postura de provedor e de forte;
- c. Sexual: relacionada a “eternização” da disponibilidade para o ato sexual e sobre preceitos a cerca desse, como a ereção peniana e a fertilidade.

Esse parâmetro, leva não somente a problemas, como aceitar seu diagnóstico de infertilidade, mas também como o modo de sua própria percepção (seu “eu”) no mundo e discorrer sobre esse assunto (Maux *et al.*, 2019).

Além disso, as condições socio-econômicas também podem interferir na busca pelos tratamentos de reprodução assistida, uma vez que de acordo com Sistema Nacional de Produção de Embriões (SisEmbrio), existem 204 centros de reprodução humana, no Brasil, até o ano de 2023 (Brasil, 2024), sendo somente 11 vinculadas ao Sistema Único de Saúde (SUS) (UNFPA, 2024).

Diante disso, uma pesquisa realizada pelo IBGE, no ano de 2022, demonstrou os seguintes valores percentuais para o rendimento *per capita* por pessoa, em relação ao salário mínimo (R\$ 1.212, ano-base: 2022), no Brasil: Mais de 5 salários (3,4%), mais de 3 a 5 (4,8%), mais de 2 a 3 (7,5%), mais de 1 a 2 (24,3%), mais de metade até 1 (30,5%) (IBGE, 2022), ou seja, a maioria da população brasileira enquadra-se na base da pirâmide dentro de metade até 1 salário-mínimo, conforme mostra a Figura 17.

Figura 17– Renda Familiar *per capita* por pessoa, no ano de 2022.



Fonte: Adaptado de IBGE (2022).

Esse cenário, implica em uma inviabilização dos serviços de reprodução, uma vez que a maioria desses indivíduos dessa categoria utilizam o SUS, ocorrendo uma alta demanda e sem dúvidas não teriam como custear os altos custos dos tratamentos de reprodução assistida, principalmente aqueles que necessitam de técnicas de alta complexidade, como FIV (fertilização *in vitro*) ou ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides) (UNFPA, 2024). Com isso, se considerarmos apenas os casos de

casais que necessitam dessas metodologias, o custo médio, no ano de 2019, era de R\$ 18.828, 64 (incluindo exames específicos, como aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimos (PESA), medicamentos e a estimulação ovariana) (Entringer *et al.*, 2023), isto significa que apenas a população com a renda mais alta (UNFPA, 2024), aquela que se encaixa entre 3 a 5 ou mais de salários-mínimos, no topo da pirâmide de renda (Figura 17), conseguiria custear todo o tratamento.

No entanto, a infertilidade masculina devido a causas ocupacionais e/ou contaminações por metais pesados, ainda apresenta discrepâncias, além da falta de homogeneidade nos parâmetros metodológicos, pela insensibilidade e não confiança nas informações que são fornecidas, sendo assim necessário mais investigações, que envolvam estudos a nível celular e molecular, acerca do assunto, a fim de permitir uma avaliação mais complexa sobre a correlação existente entre os disruptores endócrinos químicos e seus impactos no prognóstico da saúde reprodutiva masculina (Cocretto *et al.*, 2023; López-Botella *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2019).

Diante disso, em 2020, a Endocrine Disruption Exchange Database, listou 1482 químicos como disruptores endócrinos (do inglês, “*endocrine-disrupting chemicals (EDC)*”), ou seja, substâncias exógenas, como o Hg e suas especiações (Wu *et al.*, 2024), os quais são capazes de modificarem a síntese metabólica e a interação hormônio- receptor, incluindo os hormônios sexuais, levando a uma desregulação na expressão gênica e modulando negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, consequentemente inibindo ou diminuindo a esteroidogênese processada nas células de Leydig e Sertoli, a espermatogênese, o desenvolvimento dos órgãos sexuais, a qualidade espermática, as taxas de fertilidade, além de induzirem a fragmentação de DNA através das metilações e promoverem o desbalanço REDOX, favorecendo o aumento exacerbado das EROs e ERNs e a diminuição dos índices de antioxidantes, sendo assim, essas são classificadas como uma das etiologias associadas a infertilidade masculina devido as causas ocupacionais ou contaminação ambientais, independentes do modo que ocorreu a exposição, podendo ser agudo ou crônico (Dutta *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2023; Tauana *et al.*, 2022).

O Hg e suas espécies têm grande afinidade pelas proteínas seleno e pelos domínios de cisteínas/ tióis (-SH), desta forma conseguem driblar a função dos sistemas antioxidantes, como a via da glutationa e entrar no organismo, além de ocasionar efeitos deletérios através do aumento dos radicais livres, assim levando a

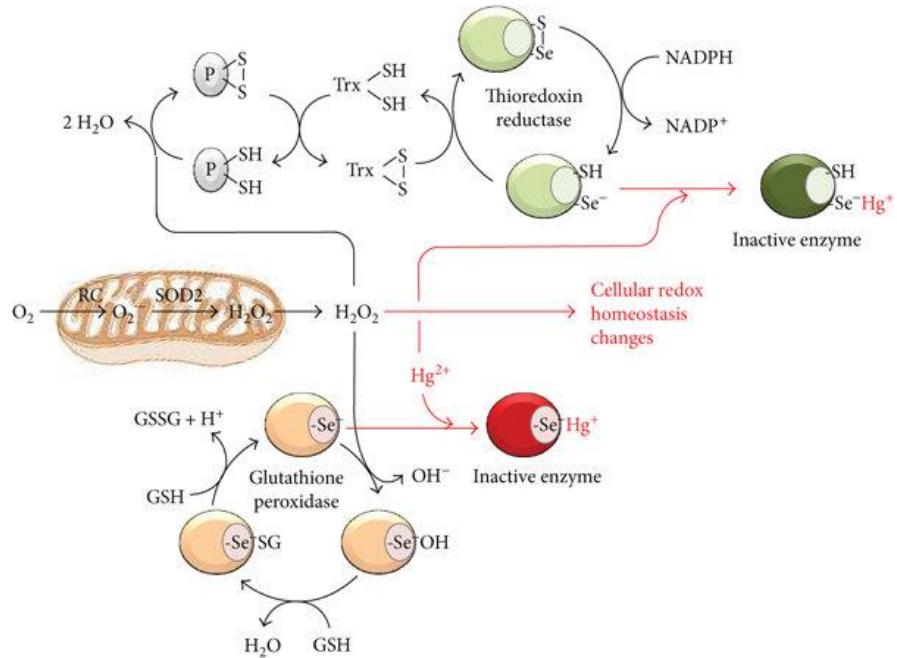
uma depleção nas organelas e nos órgãos que necessitam da homeostase desses radicais (Tinkov *et al.*, 2015), conforme é demonstrado Figura 18. Contudo estudos têm demonstrado que a entrada de mercúrio, principalmente o HgCl_2 , pode ser facilitada pela inibição das aquaporinas, uma das principais transportadoras na célula espermática (Yeung *et al.*, 2010), e por outros canais, como DMT1 (transportador divalente de metal 1), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ /ATPase e glicose (GLUT), porém esses mecanismos ainda precisam ser melhor explicados (Delgado *et al.*, 2021; Machado-Neves, 2022; Pellavio *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2022).

O acúmulo de mercúrio ativa as EROs de modo desgovernado, ocasionando uma desregulação nos eixos hormonais, da seguinte forma:

- a. As EROs e as interações Hg-SH perturbam o funcionamento da adrenal, que é produtora de cortisol, o hormônio do estresse e o principal fabricante de hormônios esteroides, como FSH e LH;
- b. Deste modo, acabam modulando de modo autócrino-parácrino, a família de fatores de crescimento da insulina (IGF) via PI3K/AKT, diminuindo os níveis de testosterona, afetando a função testicular e de seus componentes, como as células de Leydig, além da diminuição da ligação do ABP (do inglês, “androgen binding protein”) a esse hormônio, interferindo na célula de Sertoli;
- c. Os testículos aumentaram a atividade enzimática da aromatase e em decorrência disso ocorrerá a exacerbação de estradiol;

Já no eixo hipotálamo-hipófise haverá o aumento de prolactina e diminuição de GnRH (Barati *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2009).

Figura 18 – Afinidade do mercúrio e espécies por enzimas de rotas antioxidantes



Fonte: Zefferino *et al.* (2017)

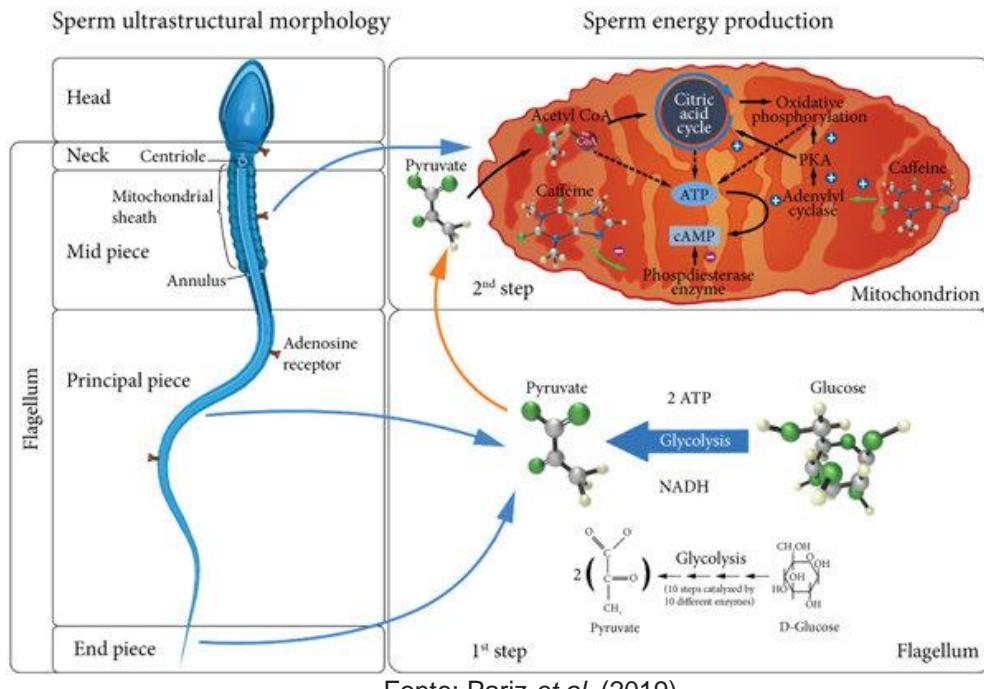
Fisiologicamente, o arcabouço espermático, é rico em mitocôndrias, as quais irão auxiliar em suas funções, principalmente na capacitação e na reação acrosomal (RA), essas necessitam das EROs e ERNs, sendo geradas de três formas principais, sumariamente:

1. Pela NADPH que mantem os níveis membranares desses radicais;
2. Pela reação da NAD(P)H dependente de óxido redutase do tipo 5 (NOX5) promovida na mitocôndria que irá colaborar com a motilidade espermática;
3. Pela ação hidrolizante de fosfolipase A2 (PLA2) e pela geração de PUFA, como os ácidos docosahexanóico (DHA; C22:6), araquidônico (AA; C20:4) e linoleico (AL; C18:2), sendo o primeiro o mais abundante (34,5%) na membrana espermática, e seus produtos, como o15-HETE através da oxidação via das lipoxigenases (Agarwal *et al.*, 2014; Villaverde *et al.*, 2019).

Além disso, o espermatozoide necessita do ciclo OXPHOS (do inglês, “glycolysis and oxidative phosphorylation”), para obter cerca 1-3% de todo o oxigênio para realizar suas funções fisiológicas (Agostini *et al.*, 2018), sendo a via glicolítica difundida na parte caudal principal e a da fosforilação oxidativa na mitocôndria presente na porção média da cauda (Pariz *et al.*, 2019), ocorrendo da seguinte forma, sumariamente (Figura 19):

- a. Iniciando-se na via glicolítica, responsável pelo fornecimento de duas moléculas de ATP e uma molécula de piruvato, esse último necessário para o ciclo seguinte;
- b. O ciclo de Krebs é iniciado com auxílio da molécula de piruvato e por consequência esse auxilia nas etapas subsequentes da cadeia transportadora de elétrons (CTE) na mitocôndria, onde terá grande participação das EROs;
- c. Além disso, apesar de não levar o nome na via em questão, o cálcio é considerado o responsável pela regulação da fosforilação e do ciclo do ácido cítrico, uma vez que medeia a produção de NADH, ATP e controla enzimas, como alfa ceto-glutarato, além de participar dos processos fisiológicos exercidos pelas células somáticas espermáticas, sendo um dos sinalizadores, os quais são capazes de colaborarem com os mecanismos apoptóticos, com a RA e a motilidade (Giib *et al.*, 2020; Foutouhi *et al.*, 2022).

Figura 19- Estrutura e mecanismos de produção de energia do espermatozoide

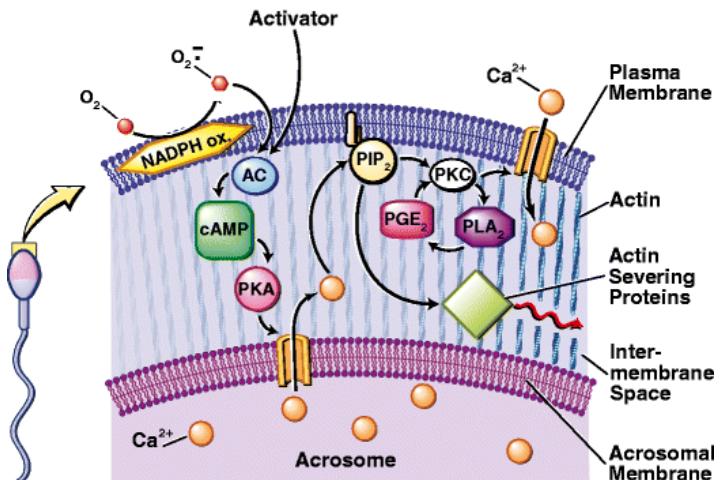


Fonte: Pariz *et al.* (2019)

Esses eventos reportados anteriormente são essenciais para inicializar a RA, a qual é explicada bioquimicamente, após a contribuição das EROs sob influência de NOX5 e pela entrada de cálcio, os quais irão clivar a fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2), o qual dará origem a diacilglicerol (DAG), essa última promovendo a iniciação da proteína kinase C (PKC), gerando um influxo de cálcio e estimulando PLA2,

formando os PUFA que aumentaram a fluidez da parede celular, além do trifosfato inositol (IP3), (Figura 20) sendo essa ativadora da proteína de recorte de actina, por consequência levando a exocitose acrossomial (Du Plessis *et al.*, 2015).

Figura 20 – Provável via bioquímica da reação acrossômica



Fonte: Du Plessis *et al.* (2015)

Em decorrência disso, o gameta masculino é bastante suscetível a eventos de oxidação lipídica (Kurkowaska *et al.*, 2020), sendo assim existem diversos estudos que afirmam a existência de um complexo entre o Hg e a acetil-coenzima A sintase (ACSL), que causará alteração na beta oxidação mitocondrial, levando ao aumento de PUFA de cadeia longa, de produtos secundários (MDA, 4-HNE) e de peróxidos lipídicos, intensificando o fenômeno da PL e a diminuição da capacidade antioxidante total, por fim colaborando para a fragmentação de DNA espermático (a nível de cromatina, de histonas e/ou a combinação dos dois), para a disfunção mitocondrial, para o influxo iônico de Ca^{2+} e Mg^{2+} , proporcionado pela elevação de moléculas de H_2O_2 , promovendo mudanças, como alterações morfológicos no espermatozoide, tanto de cabeça como de cauda, além da diminuição da contagem total e da motilidade, entre outras modificações, como a degeneração das células de Sertoli e Leydig e processos inflamatórios gerados pela interferência dos radicais nitrogenados, como o ataque de citocinas pró- inflamatórias, posteriormente causando a morte celular, principalmente a apoptótica (Chen *et al.*, 2019; Hayati *et al.*, 2019; Ilieva *et al.*, 2022; Kushawaha *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022; Wong *et al.*, 2011). Esses efeitos ocorrem independentemente da cronicidade da exposição, entretanto são dependentes da dose pela qual foram submetidas, um estudo publicado na Nature,

no ano de 2021, realizado com espermatozoides de cabras expostos ao HgCl_2 , demonstrou que houve uma queda significativa na motilidade entre os grupos das concentrações de 1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (39,8% e 19,95%), em relação ao período de 3h, porém quando comparado a maior concentração com o controle, no intervalo de 1h, não foram observadas diferenças significativas (65,7% e 58,7%, respectivamente) (Kushawaha *et al.*, 2021).

Outras pesquisas publicadas recentemente indicam que o HgCl_2 modula negativamente a GPX4, COX-2 e HIF-1 α , este último intuitivamente leva a uma desregulação na homeostase do ferro, consequentemente aumentando seus níveis (Ghafouri-Fard *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2023). Com isso, é importante considerar um envolvimento do metabolismo do ferro no sistema reprodutor masculino, uma vez que o mesmo necessita da transferrina (Tf), do ferro estocado na ferritina na célula de Sertoli (CS) e do ferro circulante, este último entrará via receptores de Tf na barreira testicular-sangue, sendo essenciais para o desenvolvimento celular, principalmente para o espermatócito na fase de preleptotone e para o alongamento das espermátides, além da proteção contra ataques das proteaseas pela Tf nos espermatozoides (Ilieva *et al.*, 2023; Wojtczak *et al.*, 2005). Além disso, o metal pode levar a ferroptose pelo acúmulo de ferro circulante entre a espermatogênese e as células testiculares e órgãos que as regulam (Yuan *et al.*, 2023), esse mecanismo ocorre de forma similar ao que já foi descrito anteriormente sob influência das EROs e da PL, consequentemente lesando o ambiente celular (Su *et al.*, 2023), porém existem poucos estudos que correlacionam o HgCl_2 a esse tipo de morte celular (Chen *et al.*, 2023; Fu *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2021).

Embora, existem esses estudos, Orisakwe *et al.* (2001), avaliou a influência do zinco perante a intoxicação de camundongos por HgCl_2 , concluindo que bicloreto de mercúrio pode interferir na ligação de metais essenciais (ferro, zinco, manganês, selênio, etc.) para a homeostase testicular, por ter uma afinidade pela transferrina, auxiliando na privação de ferro para as células germinativas (Orisakwe *et al.*, 2001). Em contrapartida, existem estudos que afirmam que a Tf é fundamental para o desenvolvimento da ferroptose no ambiente testicular, uma vez que haverá aumento da sensibilidade de seu receptor (TfR) nas CS o que promoverá maiores índices de ferro circulante dentro da CS, por consequência também aumentaram os níveis de ferro na mitocôndria, posteriormente ocorrendo o dano na parede celular pela PL,

prejudicando as demais linhagens germinativas, além das células adjacentes, como a célula de Leydig, assim promovendo a morte celular ocasionada pelo excesso de ferro (Zhao *et al.*, 2023).

Por levar a depleção dos sistemas antioxidante e pela inflamação de modo incontrolável, as EROs e as ERNs podem perturbar células do sistema imune, em especial, esse papel é liderado pelas ERNs por ativarem as mieloperoxidases nos PMN e esses em uma tentativa de defesa ao sofrimento acabam falhando dando origem ao fenômeno de leucocitospermia, conhecido pelo aparecimento dessas células no ambiente reprodutivo, precisamente nos testículos e epidídimos, em um número maior do que necessário (Dutta *et al.*, 2022; Dutta *et al.*, 2024; Khodamoradi *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2022), no entanto, não existem estudos que possam associar o Hg a esse fenômeno.

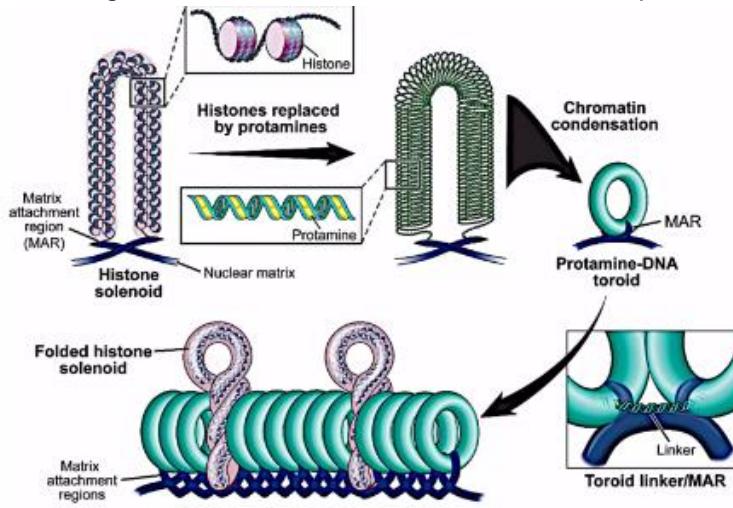
Todos esses eventos podem comprometer a estrutura do DNA espermático (sDF), impulsionando a sua fragmentação, prejudicando os desfechos reprodutivos. A sDF pode ser desencadeia por três fatores, sumariamente:

1. Erros nas bases nitrogenadas;
2. Ligação do DNA a dímeros de pirimidina;
3. Quebra das fitas, tanto uma como duas (do inglês, “single or double strand breaks (SSBs/ DSBs)”), este último relacionado a PL (Kowalczykowski, 2000).

Microscopicamente o cromossomo é composto por DNA e proteínas associadas, como as histonas em estruturas de cromatina, porém o modo de organização na célula espermática sofre variação quando comparado com outras células, principalmente por ter um alto nível de condensação fisiologicamente (Figura 21), isso leva a impossibilidade da transcrição com outras células somáticas, sendo assim suas histonas são no formato solenóide, já sua condensação da cromatina envolve a reação de protaminação e receptores de toróides, os quais se ligarão as matrizes nucleares, que possuem regiões de ligações denominadas MAR (*matrix attachment regions*), porém o processo pode ser facilitado pela nuclease endógena topoisomerase II, cuja função é realizar quebras na fita de DNA, portanto qualquer defeito ou perturbação pode levar a quebra, levando ao mecanismo de reparado ineficiente, assim gerando anormalidades (Ribas-Maynou *et al.*, 2022; Ziouziou *et al.*, 2024). Existem inúmeros métodos capazes de visualizarem essas alterações, como

aqueelas que utilizam fluoróforos, por exemplo, os ensaios TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labelling*) e acridina orange, entre outros que podem ser baseados em pigmentações, como a toluidina e anilina azuis, além da 8-oxi-7,8-dihidro-2-deoxiguanosina (8-oxodG) (Dai et al., 2021).

Figura 21- estrutura interna do cromossomo espermático



Fonte: Vavouri et al. (2011).

Diante disso, um grupo de pesquisadores analisou espermatozoides de peixes tropicais (*Cyprinus carpio L.*) expostos a diferentes concentrações de $HgCl_2$ (5-0,5 ppm), esses consideraram que houve um alto índice de fragmentação de DNA no grupo que recebeu 5 ppm da substância, com cerca de 80% de comprometimento do material genético quando comparado ao controle (4%) (Hayati et al., 2019).

Além disso, os metais pesados, incluindo o Hg podem levar a metilação de DNA, tanto por adição como perda de radical metil (hiper ou hipometilação), em decorrência do estresse oxidativo ou devido a interação direta levando a inibição da enzima MTase (DNA metiltransferase) ou seus substratos, sendo esses as moléculas de SAM e SAH no ciclo bioquímico de metilação e transulfuração do ser humano e espermático, consequentemente esse processo também pode induzir a fragmentação de DNA prejudicando o *imprinting* genômico (Geeson et al., 2023; Tunc et al., 2009; Ruiz-Hernandez et al., 2015).

Estudos recentes têm correlacionado o desenvolvimento do EO exacerbado, presentes no plasma seminal, com os produtos proteicos avançados de oxidação (do inglês, "advanced oxidation protein products – AOPP") (Janiszewaska et al., 2022), os quais são uma família de moléculas oxidadas que contem domínios de ditirosina, cujo

tem a capacidade de se ligarem a proteínas plasmáticas e promoverem uma reação de oxidação cloraminada, isto é, mediado pelos radicais HOCL/OCL⁻, resultando em alterações no percurso da atividade da MPO, desregulando o sistema imune (Cristani *et al.*, 2016; Zhuang *et al.*, 2021).

Para tentar contornar esses impactos devido a intoxicação por Hg e por seus desdobramentos, principalmente pelo descontrole das EROs, estudos têm avaliado e colocado em práticas terapêuticas que causem menores efeitos colaterais e adversos, como exemplo, os antioxidantes naturais (Abouelgreed *et al.*, 2024).

2.5 Fitoterápicos e plantas medicinais: potentes antioxidantes naturais

O termo “fitoterapia” foi relatado pela primeira vez pelo físico francês Henri Leclerc em 1913, porém as primeiras publicações somente foram aceitas, em 1922, nas edições da *Précis de phytothérapie* (“Handbook of Phytotherapy”) (Fintelmann, 1991). No Brasil, esse termo somente começou a entrar em vigor quando a OMS publicou a declaração de Alma-Ata, em 1978 (Rosa *et al.*, 2011).

Os conhecimentos sobre as plantas medicinais são seculares, sendo assim, diversos povos, como os gregos (~370 a.C) (Petrovska, 2012), utilizavam essas para tratar os enfermos e em tradições de cunho religioso, muitas vezes eram passadas de geração em geração, além de serem uma das formas mais acessíveis e de custo-benefício, para comunidades geograficamente mais afastadas, devido ao relevo e as dimensões colossais, implicando em diversas problemáticas, como a ausência de políticas públicas, o saneamento básico e serviços de saúde básicos oferecidos pelos agentes comunitários de saúde e desta forma, aumentando negativamente os fatores determinantes para causadores de saúde-doença (Silva *et al.*, 2019). Apesar de existir, no Brasil, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (Habimorad *et al.*, 2020).

Sendo assim, os ribeirinhos e os povos originários, enquadravam dentro dessa perspectiva de carência multidimensional, tornando-se, portanto, inviabilizados e vulneráveis (Ninomiya *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2019). Além disso, a maioria dos indivíduos pertencentes a esses grupos, ou não possuem rendimentos (45,9%) ou obtém uma renda *per capita* de meio até um salário mínimo (26,8%, ano-base 2018: R\$ 954) (Silva *et al.*, 2019) e cerca de 50,9% e 54,5 % utilizam as plantas

medicinais para tratamento doenças e acreditam que essas não causam malefícios, respectivamente (Silva *et al.*, 2023).

Diante disso, se considerarmos aquelas somente utilizadas no contexto como terapêuticas para condições do sistema reprodutivo (como ciclo menstrual, ejaculação prematura, impotência sexual, entre outras) ou para o tratamento de infecções do trato geniturinário (como a prostatite), existem inúmeras plantas medicinais que já são utilizadas por essas comunidades, e que normalmente são preparadas através da infusão, decocção ou maceração, como as folhas e/ou frutos, podendo também ser utilizadas as raízes (Ribeiro *et al.*, 2017), conforme Tabela 12.

Tabela 12– Exemplos de espécies utilizadas pela comunidade para enfermidades do trato geniturinário e reprodutivo.

Espécies	Forma de preparo
<i>Chiococca alba (L.) Hitchc.</i>	Decocção, infusão (chá) e maceração
<i>Aloe vera (L.) Burm.f</i>	Infusão fresca, maceração
<i>Uncaria tomentosa</i>	Infusão (chá)
<i>Peumus boldus</i>	Infusão (chá)
<i>Dalbergia monetaria L.</i>	Infusão e maceração

Fonte: Adaptado de Ribeiro *et al.* (2017); Silva *et al.* (2019); Silva *et al.* (2023).

O Brasil é um país extremamente rico em biodiversidade, cerca de 15 a 20% da biodiversidade no mundo pertence ao país, fazendo parte dessa seis tipos de biomas: Mata Atlântica, Cerrado, Floresta Amazônica, Pampa, Pantanal e Caatinga, no entanto, existem espécies pouco exploradas, o que possibilita o desenvolvimento de novos produtos naturais, que diminuem os custos com medicamentos sintéticos e facilita ao acesso pela maioria da população (Leite *et al.*, 2021).

A utilização de plantas medicinais é reservada na pesquisa de seus metabólitos, sendo esses:

- Primários, que auxiliam e são fundamentais para divisão celular, fotossíntese, respiração e crescimento, como vitaminas, aminoácidos e lipídeos.
- Secundários: descritos pela primeira em 1891 por Kossel, sendo considerados altamente reativos e com capacidades protetivas contra as condições de estresse abióticos e bióticos, portanto, sendo considerados antioxidantes, por atuarem reduzindo a formação excessiva de radicais livres,

neutralizando-os através da doação ou captura de elétrons (Reshi *et al.*, 2023).

Diante disso, esses últimos podem ser utilizados pela indústria a fim de serem grandes coadjuvantes na saúde da população, por terem diversas aplicações, esses podem ser subdivididos em quatros grupos conforme mostrado na Tabela 13.

Tabela 13- Metabolitos secundários: classificações e aplicações terapêuticas

Metabolitos secundários		
Grupos	Subclassificações	Mecanismos e ações biológicas
Terpenos	<ul style="list-style-type: none"> • Monoterpenos • Sesquiterpenos • Diterpenos • Saponinas 	Anti-inflamatórias por inibição enzimática de COX e LOX; antimicrobianas por alteração de membrana celular; imunomoduladores podem atuar no receptor CB2.
Compostos fenólicos	<ul style="list-style-type: none"> • Taninos: hidrolizados e proantocianidinas condensadas <ul style="list-style-type: none"> • Liginas • Polifenois (Cumarinas) • Estibenos (resveratrol) <ul style="list-style-type: none"> • Flavonoides: antocianidinas, isoflavonas, flavonas, flavononas, flavonoides. • Ácidos fenólicos (ácido gálico) 	Cardioprotetoras por modulação do perfil lipídico, fotoprotetoras por absorção de radiação UVA e UVB, anti-inflamatórias por redução de COX, LOX e menor ativação de NF- κ B, cicatrizantes, antidiabéticas reduzem resistência à insulina, entre outras
Compostos nitrogenados	<ul style="list-style-type: none"> • Alcaloides 	Analgésicos através dos receptores opioides no SNC, estimulantes bloqueiam os receptores de adenosina, antimaláricas inibindo a síntese de

Compostos de enxofre	<ul style="list-style-type: none"> • Glicosinolatos 	ácidos nucleicos e a digestão de hemoglobina. Expectorantes por diminuição da viscosidade do muco, cardiotônicas atuam reduzindo pressão arterial (vasodilatadores)
-----------------------------	--------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

SNC: sistema nervoso central; CB2: receptor de canabidiolide do tipo 2 ; COX: ciclooxygenases; LOX: lipoxigenases.

Fonte: Adaptado de Kisiel *et al.* (2023); Razak *et al.* (2023)

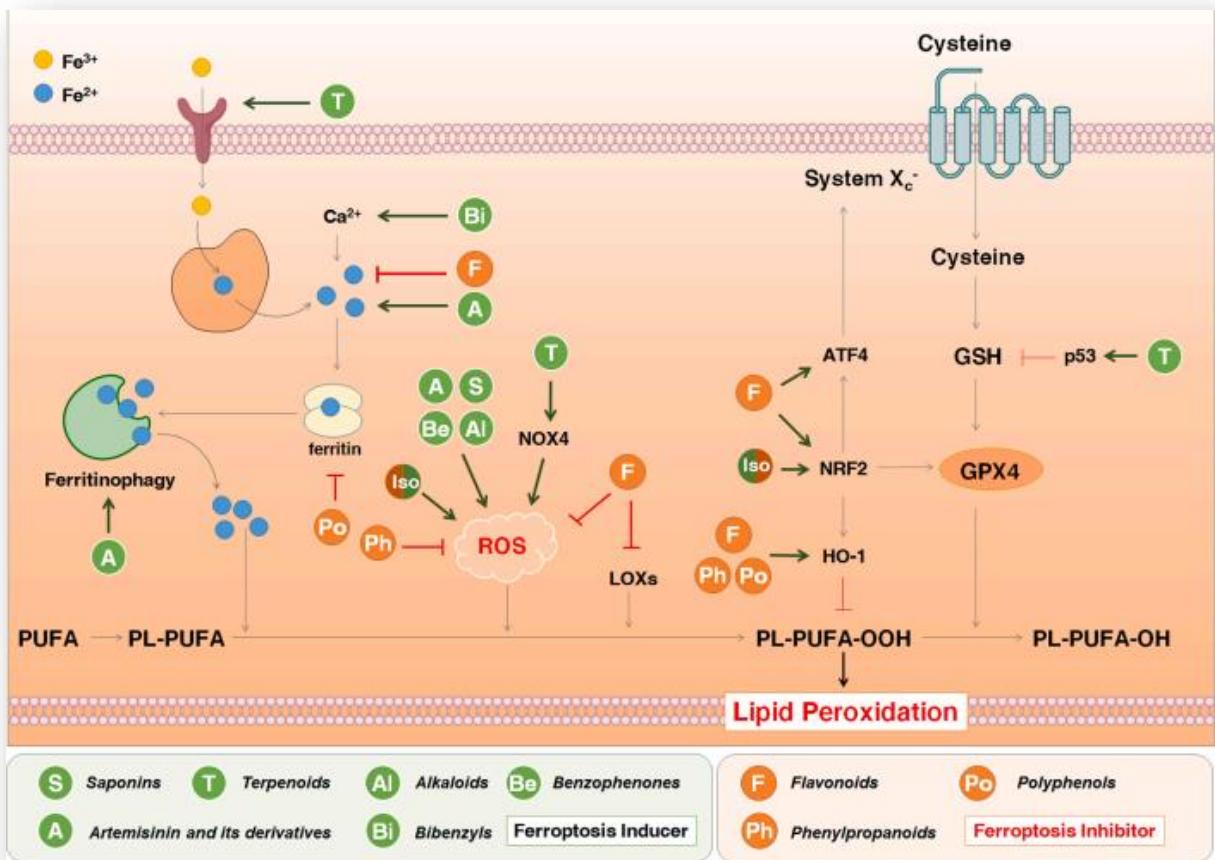
Além disso, estudos recentes têm associado essas subclassificações, principalmente os polifenóis e os flavonoides, a outras atividades, como as ferroptóticas, anti-ferroptóticas (Figura 22), queladoras de ferro e/ou gônada protetoras (Abarikwu *et al.*, 2020).

Diante disso, uma revisão sistemática que reuniu 20 estudos com cerca de 1519 homens inférteis, conclui que a maioria dos estudos (n=15) são de qualidade e confirmam os benefícios da utilização de plantas medicinais para os parâmetros espermáticos, principalmente a contagem total, a motilidade e para o aumento dos níveis dos hormônios andrógenos e de enzimas antioxidantes ($p <0,05$) (Roozbeh *et al.*, 2021). Esses compostos irão atuar em diversas vias bioquímicas, como a NRF2, a rota de defesa antioxidante (glutationa), na via das ciclooxygenases e lipoxigenases, atuando no combate ao EO desgovernado gerado pelos radicais de oxigênio e nitrogênio, na PL e nesse tipo de morte celular, auxiliando para que haja o retorno da homeostase do organismo, de suas funções presentes nas células e organelas, como o espermatozoide e células de Sertoli (Zheng *et al.*, 2021).

Além de serem potentes colaboradores nos efeitos ocasionados pela intoxicação por metais pesados no organismo (Mirkov *et al.*, 2020; Nabi *et al.*, 2021). No Brasil, no ano de 2019, o Ministério do Meio Ambiente em conjunto com a ONU, entrou em vigência o “Plano de Ação Nacional – Ouro sem Mercúrio”, com objetivo de reduzir e reeducar as indústrias, cooperativas e os trabalhadores de ASGM que utilizam como base o metal, a estratégia segue todos os princípios da convenção internacional de Minamata (Ministério do Meio Ambiente, 2019). Esse plano entrou em parceria com universidades brasileiras junto a EMBRAPA, onde estão desenvolvendo um bioextrato das folhas de Pau-de-Basal (*Ochroma pyramidalis*) capaz de ser um agente potencial para auxiliar no processo extractivo de Ouro, ou seja, um composto substituto ao uso

de Hg (Castigo *et al.*, 2021).

Figura 22- Mecanismo anti-ferroptótico e ferroptótico exercido pelos metabólicos secundários



Fonte: Zheng *et al.* (2021)

Entretanto, apesar da maioria das atividades terem atribuições positivas, muitas delas ainda são desconhecidas e/ou podem ser maléficas, e devem ser investigadas antes de serem utilizadas pela comunidade, por conta disso, no Brasil, o governo criou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos em 2006, com o objetivo:

“Garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos e promover o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (Brasil, 2016).

Diante disso, para que haja a pesquisa desses metabolitos são necessários os processos de extração, por diferentes métodos, como a quente por Soxhlet com a utilização de solventes orgânicos (como metanol, acetato de etila, etc), cujo é capaz de concentrar compostos lipídicas com precisão (Saini *et al.*, 2021), além de realizar

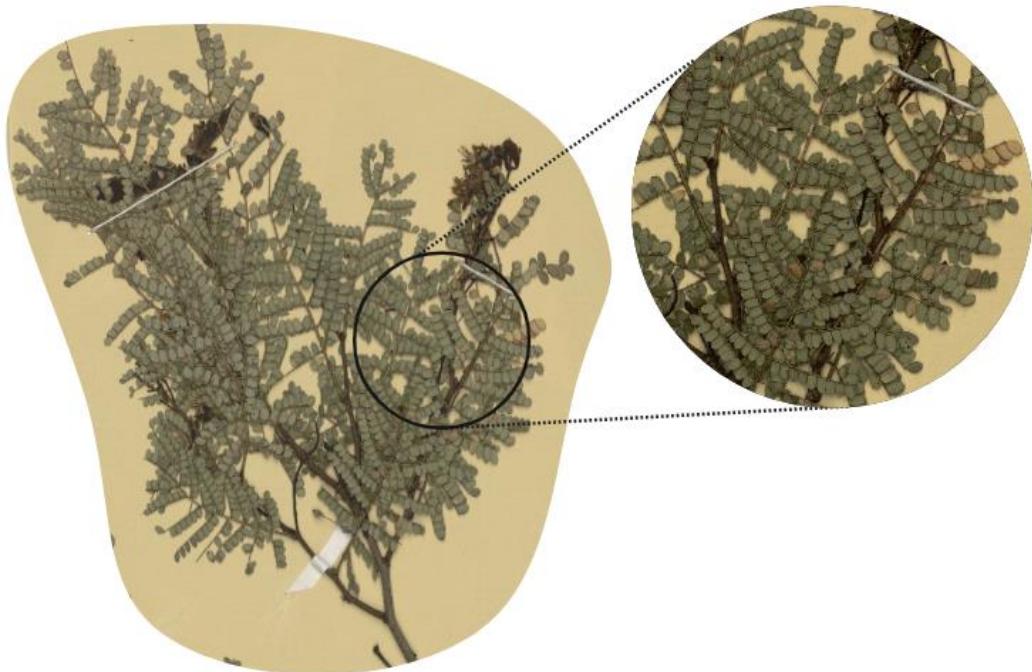
a quantificação de seus metabólicos, e posteriormente a fim de avaliar qual molécula exerce tal atividade, isto é, o processo de purificação e caracterização, pode-se utilizar a ressonância magnética (RMN) e a cromatografia de camada delgada (HPLC) (Abubakar *et al.*, 2020).

2.5.1 *Cenostigma microphyllum*

A caatinga é restrita as florestas tropicais secas e é um dos biomas exclusivos do Brasil com ampla diversidade vegetal e animal, sendo assim, estudos etnobotânicos têm considerado uma grande busca pelas espécies nativas, principalmente na região Nordeste, uma vez que apresentam, segundo a população local, um enorme potencial biológico para fins terapêuticas, contudo muitas dessas ainda não foram caracterizadas a fim de se comprovar essa finalidade ou sua eficácia no tratamento de doença (Sá-Filho *et al.*, 2021).

É o caso da *Cenostigma microphyllum* (Mart ex. G. Don.) E. Gagnon & G.P. Lewis (Figuras 23), antes denominada *Poincinella microphylla* (Gagnon *et al.*, 2016), conhecida popularmente como catingueira de porco ou catingueira rasteira, que é uma das espécies endêmicas do bioma da caatinga, com grande presença na Região Nordeste, pertencente ao gênero Fabacea, família *Caesalpinia* e do grupo *Leguminosae*, esta já é utilizada pela comunidade local para tratar enfermidades do trato digestivo e inflamatório (Agra *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2015).

Figura 23- Folhas de *Cenostigma microphyllum*



Fonte: Gaem, 2020

No entanto, os estudos com essa espécie ainda são escassos, sendo descrito somente a fitoquímica qualitativa, a qual aponta uma riqueza em flavonoides, principalmente glicosídeos e agliconas em seu extrato hidroalcóolico das folhas e da casca (Teixeira *et al.*, 2021) e a quantificação de taninos hidrolizados (Silva *et al.*, 2020) com poucas atividades biológicas relatadas e exploradas, como anti-protozóaria, em especial a anti- *Trichomonas* e a citotóxica em eritrócitos humanos em suas frações metanólicas extraídas por Sephadex (Silva *et al.*, 2020).

Além disso, existem poucos estudos que avaliaram a plasticidade fenotípica de suas tricomas e a densidade de seus estomas durante os períodos com maior índice de pluviosidade, para verificar variações em suas características em seus teores fitoquímicos, como os taninos, mediante ao estresse hídrico ou a influência dos raios solares (Albergaria, 2020; Nascimento *et al.*, 2022).

Em contrapartida, outras espécies do mesmo gênero, já são bastante estudadas e com diversas atividades avaliadas cientificamente, como a *C. macrophyllum*, sendo descrito um potencial anti-inflamatória, anti-nociptetiva, antioxidante, antiulcerogênica e antibacteriana, além dos de fenóis totais (Souza *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2013) e a *C. pluviosum*, com a atividade anti-SARS-CoV-2 (Pattaro *et al.*, 2023).

Portanto, é necessário que haja mais estudos com *C. microphyllum*, tanto para que se avalie cientificamente suas propriedades bioativas, seus metabólicos e sua

segurança e eficácia terapêuticas, além do doseamento de seus demais componentes secundários, mas também outros modelos extractivos devem ser considerados, uma vez que se sabe que esses podem diferenciar ações farmacológicas (Sá-Filho *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito gônada protetor do extrato metanólico das folhas de *Cenostigma microphyllum*, pela exposição exógena ao bicloreto de mercúrio ($HgCl_2$) em camundongos machos (*Mus musculus*).

3.2 Objetivos Específicos

- Preparar o extrato das folhas de *C. microphyllum*;
- Avaliar a fitoquímica do extrato das folhas de *C. microphyllum*;
- Avaliar o potencial antioxidante e anti-inflamatória do extrato;
- Elucidar de forma indireta o efeito do extrato frente a peroxidação lipídica in vitro;
- Avaliar os efeitos do extrato in vivo de camundongos (*Mus musculus*), em modelo de infertilidade por exposição ao bicloreto de mercúrio ($HgCl_2$);
- Analisar os parâmetros reprodutivos por espermograma básico e tamanho testicular;
- Avaliar a fragmentação de DNA espermático;
- Mensurar os níveis de ferro total e ferro ferroso nos testículos a fim de avaliar a ferroptose.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e extração da amostra vegetal

A catingueira foi coletada no Parque Nacional do Catimbau (Buíque-Pernambuco, Brasil), sendo direcionada a identificação botânica e posterior registro no SISBIO (16.806), IPA número de registro 84880 e SISGEN sob codificação A6ACCCB. Após, foram separadas as partes de interesse do espécime (galhos, cascas e/ou folhas) para que se dê seguimento ao presente trabalho. As folhas, forma pesadas, secas em uma temperatura de 40°C por 2 dias e trituradas a fim de se obter o pó (100 g). Este seguiu para o método de extração a quente de forma eluotrópica, por aparelho Soxhlet, o qual baseia-se na utilização de 1 L de solventes orgânicos conforme a polaridade química (ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol). Por fim, os extratos foram concentrados com auxílio do rota-evaporador, para que haja a eliminação total do solvente, até que se obtenha o extrato bruto.

4.2 Metodologias para quantificação dos metabólitos secundários

4.2.1. Dosagem dos compostos fenólicos totais e taninos

Para quantificar a concentração de fenóis totais e taninos presentes na amostra de extrato, foi utilizado o método proposto por Li *et al.* (2008), via reação colorimétrica por reagente de Folin-Ciocalteu. O ensaio foi feito com a concentração de 1 mg/mL do extrato, onde foi pipetado 20 µL deste e adicionados 100 µL do reagente de Folin (1:10 em água destilada) e após 3 minutos adicionados 80 µL de carbonato de sódio 7,5%. A leitura foi realizada por espectrofotômetro após 2 horas em ambiente escuro em 735 nm (fenóis totais) e 725 nm (taninos) e a concentração de compostos fenólicos totais foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama (mgEAG/g) e a de taninos em miligramas equivalentes de ácido tânico por grama (mgEAT/g). Teste realizado em triplicata.

4.2.2. Doseamento de flavonoides

Para a determinação da concentração desta classe de metabólitos secundária presentes no extrato das folhas de *C. microphyllum*, a metodologia seguiu de acordo com Woisky e Salatino (1998). Foram adicionados 0,1 mL de AlCl₃ a 2% (m/v), diluído

em metanol, em 0,1 mL da amostra do extrato diluído. Em seguida, foi direcionada a incubação por 1 hora em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após, foi realizada a leitura por espectrometria no comprimento de onda de 420 nm. Os resultados serão expressos em miligramas equivalentes de quercetina por grama (mgEQ/g). Teste realizado em triplicata.

4.3. Atividade Antioxidante do extrato das folhas

4.3.1 Atividade sequestradora do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O sequestro deste radical livre seguiu conforme Brand-Willians (1995) com pequenas modificações. Foram adicionados 40 μ L da amostra-teste, em diferentes concentrações (1-0,03125 mg/mL), em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 250 μ L da solução do radical DPPH, diluído em metanol (22 mg/mL). Para o controle positivo foi utilizado o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (1-0,03125 mg/mL) e o controle negativo foi o diluente. A leitura foi realizada, após 30 minutos, em 517 nm. Teste realizado em triplicata.

A porcentagem de radical sequestrado foi determinada de acordo com a expressão:

$$SRL (\%) = \frac{(abs\ controle\ negativo - abs\ amostra)}{abs\ controle\ negativo} \times 100$$

4.3.2 Atividade sequestrado do radical ABTS+

A atividade sequestradora do ABTS+ [2,2'-azino-bis (3-etylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi determinada pelo método de Re *et al.* (1999). Para que a metodologia aconteça foi necessário produzir este radical, pela reação entre persulfato de potássio a 2,45 nM e ABTS a 7nM. Após, a solução do radical ABTS foi mantida fora do alcance luminoso a 28°C por 16 horas. Depois disso, a solução foi diluída em álcool metílico e foi realizada a leitura, por espectrofotometria, desta até que se obtenha uma absorbância de 0,700 (\pm 0,02) a 734 nm. Em seguida, foram adicionados 2 μ L da amostra-teste na concentração de 1 mg/mL a 200 μ L da solução do radical. Para o

controle negativo foram pipetados 2 μ L do diluente e o controle positivo 2 μ L de trolox, ambos adicionados a 200 μ L da solução do radical. Teste realizado em triplicata. Após, a realização da leitura do teste, foi calculada a porcentagem de inibição do radical que seguirá a expressão:

$$Inibição (\%) = \frac{(abs\ controle\ negativo - abs\ amostra)}{abs\ controle\ negativo} \times 100$$

4.3.3 Capacidade antioxidante total (CAT)

A capacidade antioxidante total (CAT) foi determinada conforme descrito por Prieto *et al.* (1999). Foi pipetada uma alíquota de 0,1 mL da amostra-teste (1 mg/mL) a 1 mL da solução reagente, ácido sulfúrico a 600 mM, fosfato de sódio a 28 mM e molibdato de amônio a 4 mM. Após, a mistura foi incubada a 95º C por 90 min. Em seguida, seguiu para leitura no comprimento de onda de 695 nm. O controle positivo foi o ácido ascórbico (vitamina C) e o negativo o diluente do extrato (metanol). Teste realizado em triplicata. Os cálculos para quantificação da CAT, foram expressos por:

$$CAT (\%) = \frac{(abs\ amostra - abs\ controle\ negativo)}{(abs\ do\ controle\ positivo - abs\ controle\ negativo)} \times 100$$

4.3.4 Potencial redutor do Ferro (FRAP)

A investigação deste potencial seguiu Benzie *et al.* (1998). O extrato foi preparado em diferentes concentrações (2- 0,25 mg/mL, em metanol). Após, foi preparado a solução de FRAP (10:1:1), que teve os seguintes constituintes: 10 mmol/L TPTZ diluído em 40 mmol/L HCl, 20 mmol/L de $FeCl_3 \bullet 6 H_2O$ e tampão acetato (300 mmol/L, pH 3,6) , mantido longe da luminosidade e levada a banho-maria a 37ºC por 30 min. Foi feita uma curva-padrão com 27 μ L Fe_2SO_4 diluído metanol das concentrações de 10-100 μ g/ml. Também, foram adicionados 27 μ L da amostra- teste, controle positivo (ácido ascórbico) e o controle negativo (metanol) a microplaca. Depois disso, foram adicionados, em todos os poços, 200 μ L da solução de FRAP, exceto no poço do controle do reagente de cor, o qual foi pipetado 300 μ L da solução FRAP. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente e ausência de luz foi realizada a leitura em 593 nm. As absorbâncias foram plotadas na equação da reta

da curva padrão do Fe_2SO_4 e os resultados expressos em $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg}$ de extrato. Teste realizado em triplicata.

4.4 Avaliação da peroxidação lipídica por atividade sequestradora de espécies reativas

4.4.2 Atividade do sequestro do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O sequestro da molécula de peróxido de hidrogênio seguiu de acordo com exposto por Aryal *et al.* (2019), com pequenas modificações. O extrato foi preparado em diferentes concentrações (2-0,25 mg/mL), diluídos em PBS (0,2 M, pH 7,4). Foram adicionados 100 μL de cada concentração e 200 μL de H_2O_2 em solução comercial (3%), nos poços da microplaca. O controle positivo foi 300 μL H_2O_2 e o negativo 100 μL PBS mais 200 μL H_2O_2 . Após, 10 minutos realizou-se a leitura em 230 nm. Teste realizado em triplicata. A porcentagem de sequestro de H_2O_2 foi calculada usando a equação:

$$\% \text{ sequestro de } \text{H}_2\text{O}_2 = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Onde A_0 é a absorbância do controle (PBS com H_2O_2) e A_1 é a absorbância do teste (extrato).

4.4.3 Atividade do sequestro do Hidroxil (-OH)

A metodologia seguiu Zhou *et al.* (2020) com pequenas modificações. Extrato foi preparado em diferentes concentrações em diluição seriada (2-0,25 mg/mL). 200 μL das diferentes concentrações do extrato foram adicionados a 200 μL H_2O_2 (3% solução comercial (v/v)), 60 μL de salicilato de sódio (20 mM) e 400 μL Fe_2SO_4 (1,5 mM). Depois disso, foi levado a incubação por 30 minutos e adicionado 90 μL de H_2O destilada. O controle negativo foi composto por 200 μL de H_2O_2 , 60 μL da solução de salicilato de sódio, 400 μL da solução de Fe_2SO_4 e 200 μL de H_2O destilada e o positivo 200 μL vitamina C (2 mg/mL), 200 μL H_2O_2 , 60 μL da solução de salicilato de sódio, 400 μL da solução de Fe_2SO_4 , além da realização do desconto de cor, que foi pipetado somente 200 μL do extrato. Após, as amostras e os controles devem ser centrifugados por 10 min a 2.500 rpm e plaqueado 100 μL do sobrenadante. A microplaca foi lida em espectrofotômetro a 510 nm. Teste realizado em triplicata. A %

de sequestro do hidroxil (-OH), foi expressa pela seguinte equação de acordo com Ajiboye *et al.* (2015):

$$\text{Sequestro - OH (\%)} = \frac{\text{abs controle} - (\text{abs teste} - \text{abs extrato})}{\text{abs controle negativo}} \times 100$$

Onde, abs controle é a absorbância da mistura sem o extrato (controle negativo), abs teste é a absorbância da mistura com extrato e abs extrato é a absorbância somente do extrato (desconto de cor).

4.4.3 Atividade anti-hemolítica

Metodologia seguiu conforme Tenore *et al.* (2015) com algumas modificações. Foi realizada a coleta sanguínea venosa em tubo de EDTA. Após, o sangue total foi centrifugado a 2.500 rpm por 10 min, com o precipitado de hemácias foi realizado três lavagens em PBS (0,2M, pH 7.4) seguidas de centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos. Depois, foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 20% em PBS. Em seguida, à amostra diluída em 0,2 mL PBS (2 - 0,25 mg/ml) adicionou-se 0,2 mL da suspensão de eritrócitos a 20% (v/v). A mistura seguiu-se para incubação de 30 min a 37°C. Após foram adicionados 0,2 mL de peróxido de oxigênio (H₂O₂) a 3% (solução comercial) com mais uma incubação por 2 h a 37°C. Decorrido este tempo foram colocados 3,2 ml de PBS e novamente foi realizada uma centrifugação a 2.500 rpm por 10 min. Teste realizado em triplicata. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540nm e as absorbâncias foram utilizadas para definir a inibição da hemólise seguindo a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 1 - \left(\frac{\text{abs amostra}}{\text{abs hemólise}} \right) \times 100$$

O controle positivo ou com hemólise utiliza o peróxido de oxigênio a 3% e o controle negativo ou sem hemólise utiliza o PBS.

4.5 Atividade anti-inflamatório in vitro do extrato

4.5.1. Atividade anti-proteinase

Para a realização da metodologia seguiu-se Akitmat *et al.* (2021) com pequenas modificações de Assiry *et al.* (2022). Para isso, foram pesados 2 mg do extrato e dos anti-inflamatórios comerciais (indometacina, nimesulida, diclofenaco sódico, AAS a 2 – 0,25 mg/mL). Ocorrerá a transferência de 200 µL das respectivas diluições para tubos de ensaio, além da adição de 200 µL tampão TRIS-HCl (20 mM, pH 7.4). Em seguida, 50 µL da enzima tripsina (10 µg/mL) foi colocada a mistura. O controle negativo foi composto por 200 µL de tampão TRIS-HCl + 50 µL tripsina + 200 µL salina 0,9%. Após, ambos foram levados a banho-maria a 37°C por 5 min. Depois disso, adicionou-se 200 µL de caseína (0,8%), sendo levado novamente a incubação a 37°C por 20 min. Para que ocorra o bloqueio da reação, deve-se adicionar 400 µL de ácido perclórico 70% (v/v). Em seguida, foram os tubos centrifugados a 2.500 rpm por 8 min. Posteriormente, foi feita a leitura do sobrenadante, por espectrofotometria em 280 nm, sendo o branco 1 mL do tampão TRIS-HCl. Teste realizado em triplicata. O processamento do percentual da atividade anti-proteinase seguiu a seguinte expressão:

$$\text{Atividade anti-proteinase (\%)} = \frac{(\text{abs controle} - \text{abs teste})}{\text{abs controle negativo}} \times 100$$

Onde, abs controle é a absorbância referente ao controle negativo (tampão TRIS-HCl, tripsina, salina 0,9%) e abs teste é a absorbância da amostra.

4.6 Intoxicação e avaliação toxicológica dos animais ao bicloreto de mercúrio e ao extrato das folhas da catingueira

4.6.2 Animais e comitê de ética

Os animais utilizados foram camundongos albinos suíços (*Mus musculus*), machos, com idade entre 2 e 4 meses, provenientes do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE. Eles foram mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica (UFPE), em um ambiente apropriado com temperatura de 22°C e ciclos de iluminação de 12h-ligado/12h-desligado, com comida (Presence) e bebida *ad*

libitum, por um tempo de adaptativo de 7 dias. A metodologia desse projeto seguiu as normas éticas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco com número de protocolo nº 0012/2021.

4.6.3 Avaliação do extrato em modelo *in vivo* de infertilidade frente a exposição ao bicloreto de mercúrio

A metodologia seguiu de acordo com o proposto por Rao *et al.* (2001) com modificações. Antes da realização da exposição dos animais foram tomadas as medidas de segurança necessárias tanto a nível individual para o pesquisadores e frequentadores das dependências laboratoriais como dos animais para que se prossiga o procedimento, uma vez que foram utilizados a capela de fluxo laminar, equipamentos de proteção individuais (EPI) (luvas de nitrilo, máscara com filtro apropriada para produtos químicos potencialmente tóxicos e jaleco), fichas de segurança (FISPQ) e protocolos operacionais padrões de segurança para reagentes químicos (POP) de acordo com a NBR 14725-4:2014 e descarte específico. Os camundongos foram divididos em 6 grupos de 4 animais cada. Os grupos serão G1 (controle negativo) – somente água destilada, G2 (controle positivo) – somente 1,25 mg/g/dia de HgCl_2 , G3 (EMCm 50 mg/kg) (1,25 mg/g/dia de HgCl_2 + 50 mg/kg do extrato), G4 (EMCm 100 mg/kg) (1,25 mg/g/ dia de HgCl_2 + 100 mg/kg do extrato), G5 (EMCm 200 mg/kg) (1,25 mg/g/ dia de HgCl_2 + 200 mg/kg do extrato). Foram administrados 0,1 mL/animal desta solução e/ou do extrato, via oral com auxílio de agulha de gavagem. Os animais do grupo de tratamento receberam a dose do extrato cerca de 30 min antes do bicloreto de mercúrio. O experimento foi realizado de forma aguda, com duração de 48h. Por fim, os animais foram anestesiados e coletado o seu sangue total via plexo retrororbital e após foi feita a eutanásia dos animais e retira dos testículos, epidídimos e alguns órgãos (fígado, coração e rins).

4.6.4 Determinação dos níveis intracelulares de ferro totais em amostras testiculares

O nível de ferro intracelular seguiu Zhao, *et al.* (2020) e os kits comerciais disponíveis. Inicialmente, foram pesados 10 mg de tecido testicular, em seguida, colocados em solução de tampão fisiológico Tyrode® (pH 7,4; NaCl (137 mmol/L); KCl

(5 mmol/L); CaCl_2 (2 mmol/L); MgCl_2 (1 mmol/L); NaH_2PO_4 (1 mmol/L); NaHCO_3 (12 mmol/L); glicose (11 mmol/L)), homogeneizados no gelo, macerados e centrifugados a 2.500 rpm a 10 minutos. Após isto o precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado. Em seguida, foi realizado o doseamento com as devidas informações fornecidas pelo kit comercial. Após a leitura foi feita por espectrofotômetro em 593 nm.

4.7 Espermograma básico

4.7.1. Preparo, conservação e retirada da amostra seminal de epidídimos e testículos

Após a eutanásia dos animais foi feita uma incisão na região abdômen inferior para posterior retirada do epidídimos e testículos. Os órgãos foram mantidos em solução tampão (Tyrode®) devidamente apropriada proposta por Vilvanathan, *et al.* (2022) e pela OMS (2021), sendo 0,5 mL para os epidídimos e 2 mL para os testículos. Algumas etapas do espermograma, devem ser realizadas a fresco e outras foram armazenadas em freezer (-22 °C) para análises posteriores.

4.7.2. Lavagem espermática (“Sperm- Wash”)

Esta metodologia ocorreu a fim de promover a limpeza e separação entre o tecido epidídimos e o sêmen, seguindo Zimmerman *et al.* (1994) com pequenas alterações. Após a retirada do epidídimos e da adição de 0,5 mL solução Tyrode® realizadas no mesmo dia da eutanásia dos animais, as amostras seguiram para centrifugação a 2.500 rpm por 10 min.

4.7.3. Avaliação do tamanho testicular

Após a retirada dos órgãos os índices correspondentes ao tamanho dos testículos foram determinados. Esses serão pesados e a metodologia seguiu conforme Han *et al.* (2022). A partir disso, foi possível determinar os índices de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Índice do tamanho testicular} = \text{peso do testículo (mg)}/\text{peso corporal (g)} \times 100\%$$

4.7.4. Contagem total e motilidade espermática

A metodologia seguiu de acordo com OMS (2021) e Coelho (2008). A contagem total foi determinada com auxílio da câmara de Neubauer, sendo este processo realizado em duplicata e no mesmo dia da eutanásia dos animais, onde foram adicionados 10 µL da amostra seminal fresca, sendo observado na objetiva de x40 contando no quadrante central (composto por 5 quadrado totais, 4 laterais e 1 central). Para a motilidade espermática, foi seguido o mesmo processo, contudo se contou os números de espermatozoides imóveis (IM), móveis (M) e progressivos (PR). Necessário, utilizar contador de células. Os cálculos seguiram conforme as metodologias já citadas, ambos sendo realizadas em duplicata.

4.7.5. Avaliação para verificação da viabilidade por solução hipo- osmótica (HOST)

Para verificação da integridade da membrana espermática, o método de escolha seguiu Agarwal et al. (2016); Roy et al. (2016) e OMS (2010) com algumas modificações. O teste baseia-se no enrolamento da cauda do espermatozoide, promovido que foi promovido pela solução de HOST (100 mOsm), contendo 0,09 g de frutose e 0,049 g de citrato de sódio. Após, deve-se adicionar 40 µL da amostra seminal e 40 µL da solução hipo-osmótica. Depois disso, a mistura seguiu para incubação a 37°C por 60 min. Em seguida, 40 µL da mistura foram adicionados em uma lâmina e foi depositado por cima uma lamínula. Por fim, contou-se até 200 espermatozoides na objetiva de x40 com diminuição da luz do condensador do microscópio para facilitar visualização, sendo contados somente aqueles com presença de inchaço caudal (vivos).

4.7.6. Reação acrossômica (RA)

Para analisar a integridade acrossomal foi seguido Lu, et al. (1997) e Oliveira, et al. (2009) com modificações. Foi realizado a transferência de 20 µL da amostra-teste em tampão Tyrode® para outra solução de tamponamento enriquecida com BSA (MT6 BSA). Após foi feita uma nova transferência com 10 µL dessa mistura, sendo adicionado 10 µL de formaldeído 5% durante 30 min. Em seguida, foi realizada adição de acetado amônia (0,1 M; pH 9). Foi realizado os esfregaços com 20 µL dessa

mistura, em triplicata, aguardar 2 min a fim que ocorra a fixação. Depois disso, as lâminas foram coradas com azul de Comassie G250 0,22% (diluído em 50% metanol e 10% de ácido acético glacial). Por fim, foi realizado a contagem de até 100 espermatozoides, na objetiva x100, onde foram observados a cabeça do espermatozoide (acrossoma) ou a região posterior a essa, em que regiões coradas intensamente indicam positividade e não coradas negatividades.

4.8. Espermograma avançado

4.8.1. Teste para peroxidase- positiva (Teste de ENDTZ)

Para verificação de processo inflamatório no trato genital acessório masculino, utilizou o método proposto por WHO, 2010; Sharma et al., 2022; Agarwal et al, 2016; Henkel et al., 2021. O objetivo foi a visualização da mieloperoxidase, presente em polimorfonucleares (neutrófilos e macrófagos), que possam indicar inflamação. Foi preparado a solução de 0,125% benzidina (diluído em álcool etílico 96% e 50 mL de água destilada). Para que a benzidina promova a marcação da peroxidase é necessário fazer uma alíquota desta (2 mL da solução estoque) com 25 µL de peróxido de hidrogênio 3% (comercial). Deve-se incubar a 37°C por 5 min. Após a preparação da solução de trabalho, a contagem foi feita em câmara de Neubauer, sem um número pré-determinado para estas células, em triplicata, no mesmo dia da eutanásia, na objetiva x40 e serão observadas as células arredondadas de coloração marrom-alaranjada. O valor de referência para leucócitos presentes no sêmen atribuído pela OMS (2021) é de 1×10^6 células/mL.

4.8.2 FRAP seminal e índice de estresse oxidativo

O FRAP seminal seguiu de acordo com Kratz *et al.* (2014), foi feita a solução de FRAP (10:1:1), que teve os seguintes constituintes: 10 mmol/L TPTZ diluído em 40 mmol/L HCl, 20 mmol/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ e tampão acetato (300 mmol/L, pH 3,6), esperou-se 30 min com a solução em banho- maria a 37°C. Após adicionou-se 12 µL da amostra seminal. Foi feita uma curva-padrão com 27 µL Fe_2SO_4 diluído metanol das concentrações de 10-100 µg/ml. Após esse período de incubação, utilizou-se 52 µL da solução de FRAP e esperou-se 5 min para realizar a leitura em 595 nm. Os

resultados foram expressos em $\mu\text{gFe}^{2+}/\mu\text{L sêmen}$. Com isso, será possível determinar o índice de estresse oxidativo, de acordo com Barranco *et al.* (2021), dado por: OSI (%)= AOOP x 100/FRAP.

4.8.2. Verificação de produtos avançados de oxidação (AOOP)

A reação tem como princípio a análise da presença de grupos proteicos avançados de oxidação no plasma seminal, seguiu de acordo com Barranco *et al.* (2021) com pequenas modificações. Foi utilizado a curva de regressão da clorammina T (10 mM até 100 mM). Após foram pipetados 10 μL clorammina T ou da amostra seminal, 160 μL de iodeto de potássio (0,074 M) e 25 μL de ácido acético glacial 10% em microplaca de 96 poços, em triplicata. Como padrão de proteínas plasmáticas foi utilizado o calibra H. A leitura foi realizada em 340 nm. As absorbâncias foram plotadas na equação da reta da clorammina T e o resultado expresso em μg clorammina T/mg de extrato.

4.8.3. Testes para análise de fragmentação de DNA espermático

4.8.3.1. Anilina azul (AB)

A metodologia seguiu Faramarzi *et al.* (2020) com pequenas alterações. A amostra seminal (10 μL) foi fixada em 10 μL glutaraldeído 3% diluído em PBS (0,2 M, pH 7.4) por 30 min. Após, foi realizado o esfregaço para que posteriormente sejam coradas em anilina blue aquosa 5% (com adição de ácido acético glacial 4% (pH 3,5). O teste foi realizado em triplicata, sendo contados até 100 espermatozoides e os resultados foram determinados da seguinte forma: espermatozoides com a cabeça corada de azul escuro foram considerados anormais e indicaram alto índice de metilação de histonas, já espermatozoides sem cor ou com menos intensidade de AB foram considerados normais (negativos) e com baixo índice de metilação de histonas.

4.8.3.2. Toluidina azul (TB)

A metodologia seguiu Agudo-Rios *et al.* (2023) com pequenas alterações. A amostra seminal (10 μL) foi fixada em 10 μL etanol- ácido acético glacial (3:1) por 2

minutos. Após, foi realizado o esfregaço para que posteriormente sejam coradas em toluidina blue aquosa 1% por 15 min. O teste foi realizado em triplicata, sendo contados até 100 espermatozoides e os resultados foram determinados da seguinte forma: o corante TB tem a afinidade por ligamento soltos de grupamentos fosfato e desta forma indica que quanto menos densa a cromatina (cabeça do espermatozoide), mais intensa a coloração (positivo).

4.9. Análises estatísticas

Todos os testes foram realizados em triplicata, exceto a contagem total espermática que foi realizada em duplicata, entretanto foram atribuídas médias e desvios padrões (média \pm DP) no Microsoft office Excel 2019. Quando adequado, foi realizado a análise estatística comparativa (One-Way ou Two-Way ANOVA), seguido de Teste de Tukey, Sidak ou Bonferroni ($p<0,05$) em software GraphPad Prism 8.0.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a coleta do material vegetal, cerca de 100 g do pó das folhas de *C. microphyllum* foram submetidos ao método de Soxhlet, que visa extrair compostos apolares de forma eficiente com o auxílio de solventes orgânicos, aproveitando-se das interações moleculares, ou seja, pela diferença de polaridade (Saini et al., 2021). Dessa forma, diversos extratos foram obtidos utilizando, na seguinte ordem, os solventes: clorofórmio, ciclohexano, acetato de etila e metanol. Devido à menor toxicidade entre os demais solventes (Joshi et al., 2019) e por ter obtido maior rendimento obtido, em torno de 17%, o extrato metanólico das folhas de *C. microphyllum* (EMCm) foi selecionado para dar continuidade ao presente projeto.

É amplamente conhecido na literatura que os metabólitos secundários de plantas medicinais, como os flavonoides, fenóis totais e os taninos, os quais podem modularem suas estruturas química e exercer atividades bioativas, incluindo ações antioxidantes, anti-inflamatórias e cicatrizantes (Twaij et al., 2022). Além disso, eles podem atuar como agentes quelantes de metais, interagindo com fosfolipídios da membrana celular para formar um complexo protetor contra esses metais, o que aumenta a lipofilicidade e ajuda a combater o estresse oxidativo excessivo e a inibir a

peroxidação lipídica (Sadzak *et al.*, 2020; Tarahowsky *et al.*, 2014). Para avaliar essas interações, foi realizada a quantificação dos flavonoides, fenóis totais e dos taninos no EMCm em diferentes concentrações (2-0,25 mg/mL), conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1- Quantificação de metabólitos secundários presentes no EMCm.

Concentração	Flavonoides (mgEqQ/g)	Fenóis Totais (mgEqAG/g)	Taninos (mgEqAT/g)
1 mg/mL EMCm	66,44 ± 0,06	392,49 ± 0,05	401,16 ± 0,07

mgEqQ/g= miligrama/ equivalente de Quercetina por grama de extrato; mgEqAG/g= miligrama equivalente de ácido gálico por grama extrato; mgEqAT/g: miligrama equivalente de ácido tâmico por grama extrato.

A quantificação de compostos fenólicos no EMCm a 1 mg/mL foi de 392,49 ± 0,05 mgEqAG/g e de flavonoides, 66,44 ± 0,06 mgEqQ/g. Esses valores foram significativamente maiores do que os obtidos no extrato bruto seco das folhas de *Caesalpinia pyramidalis*, que apresentou 253,83 ± 5,81 mgEqAG/g e 44,69 ± 1,46 mgEqQ/g, respectivamente (Figueiredo *et al.*, 2024). Já em relação ao doseamento de taninos, o EMCm atingiu em 1 mg/mL cerca de 401,16 ± 0,07 mgEqAT/g, ou seja, níveis relativamente maiores do que os encontrados no extrato bruto seco das cascas de *Poincinella pyramidalis* que apresentou 374,69 ± 23,89 mgEAT/g (Soares *et al.*, 2024), mesmo ambas pertencendo à mesma família e grupo taxonômico.

Diante disso, torna-se relevante considerar o potencial terapêutico desses compostos, uma vez que podem auxiliar na restauração da homeostase em vias metabólicas (Garcia *et al.*, 2021), frequentemente comprometidas por agentes patogênicos e/ou substâncias tóxicas, como o Hg e outros metais pesados. Estes, em particular, afetam a via da glutationa, especialmente os mecanismos antioxidantes e de desintoxicação no organismo humano (Di Giacomo *et al.*, 2023). Com base nisso, foi realizada uma avaliação da atividade antioxidante presente no EMCm, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2- Avaliação antioxidante por diferentes metodologias do EMCm

	CAT (%)	DPPH (%SRL)	ABTS+ (%) Inibição em 1h)
1 mg/mL EMCm	56,22 ± 0,00	81,35 ± 0,00	91,8±0,00
Vitamina C			
(ácido	100± 0,00	98,5± 0,00	–
ascórbico)			
Trolox	–	98,57 ± 0,00	–

Controles positivos (C+): trolox e vitamina C (ácido ascórbico). SRL= sequestro de radical livre; CAT= capacidade antioxidante total.

Para avaliar o sequestro de radicais, foram empregadas várias técnicas que medem a capacidade antioxidante do extrato com base na captura de radicais através de interações de cargas elétricas. Assim, foi analisada a capacidade do extrato em inibir cátions e/ou capturar elétrons, utilizando, por exemplo, os radicais ABTS+ e DPPH, respectivamente (Cano *et al.*, 2023).

Os resultados mostraram que o EMCm teve maior eficácia na inibição do que no sequestro, com valores de $91,80 \pm 0,00\%$ e $80,49 \pm 0,00\%$, respectivamente. Esses valores são significativamente superiores aos obtidos na concentração mais alta do extrato etanólico das sementes de *Caesalpinia bonducuella* (200 µg/mL), que apresentou $74,77 \pm 0,16\%$ de captura de SRL (Shukla *et al.*, 2009). Também superaram a inibição de ABTS+ no extrato etanólico das folhas de *Cenostigma nordestinum*, da mesma família, que foi de $54,59 \pm 0,16\%$ µg/mL (Soares *et al.*, 2022).

Para a atividade capacidade antioxidante total (CAT), utilizou-se o método do fosfomolibdênio, e o EMCm obteve, em sua maior concentração testada (1 mg/mL), cerca de $56,22 \pm 0,00\%$, evidenciando um potencial antioxidante total superior ao observado em estudos com o extrato salino das folhas de *Caesalpinia bonducuella*, que apresentou aproximadamente $6,78 \pm 0,02\%$ mg/g (Aguiar *et al.*, 2019). Além disso, alguns autores utilizam também o método de redução de íons de ferro para determinar a capacidade antioxidante total (Miere *et al.*, 2021; Muzolf-Panek *et al.*, 2021; Shahsavari *et al.*, 2023), destacando-se que essa técnica é igualmente relevante para avaliar o potencial do extrato em neutralizar reações de Fenton exacerbadas (Ivanova *et al.*, 2020; Wojtunik-Kulesza, 2020).

A reação de Fenton é a principal fonte do radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), cuja produção

aumentada pode intensificar a peroxidação lipídica por meio da geração de radicais lipídicos, entretanto essa reação também produz íons Fe^{2+} , que, em condições fisiológicas, desempenham funções essenciais no organismo humano, como na síntese de heme e no transporte de elétrons pela cadeia respiratória (CTE), no entanto, em um estado de desequilíbrio homeostático, o excesso de Fe^{2+} pode levar à morte celular por ferroptose (Souza *et al.*, 2022).

Estudos com o extrato etanólico das folhas de *Caesalpinia sappan* evidenciaram um potencial redutor de $20,42 \pm 0,36 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg}$ a uma concentração de $200 \mu\text{g/mL}$ (Boonmee *et al.*, 2023), valor que é relativamente inferior ao obtido na maior concentração de EMCm (2 mg/mL), com $515,10 \pm 0,04 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg}$. Esse resultado foi calculado pela equação da reta obtida na curva de regressão gerada com concentrações variadas de Fe_2SO_4 (10-100 $\mu\text{g/mL}$), onde $y = 0,0285x + 0,7607$ e $R^2 = 0,97$.

Além disso, o radical hidroxil é considerado um dos radicais com maior reatividade, em decorrência de seu curto tempo de meia vida de aproximadamente 10-9 segundos (Twaij *et al.*, 2022). Diante disso, se sua formação estiver exacerbada, pode acarretar em danos nucleares irreversíveis, uma vez que tem a capacidade de gerar adutos (produtos da adição direta de duas ou mais moléculas diferentes), os quais se formaram a partir de uma interação entre esse radical e a base guanina do DNA, mais precisamente uma oxidação no carbono 8, originando o 8-OH guanina ou pela oxidação do nucleosídeo desoxiguanosina, formando o 8-OHdG (Jomova *et al.*, 2023). Sendo assim, tanto a formação desse radical como a de seus adutos oxidados podem influenciar negativamente na integridade e estabilidade das funções do DNA espermático, principalmente na proteína MAR (Mut Y adenine DNA glycosylase), a qual constitui o sistema de reparo no arcabouço espermático (Jomova *et al.*, 2023).

Por conta disso, a atuação dos compostos fenólicos, taninos e flavonoides, principalmente esse último, podem colaborar para minimizar esses efeitos danosos ocasionados no sistema reprodutivo, mas também auxiliar no controle da atividade reacional desse radical, proporcionando o retorno homeostático e a redução do estresse oxidativo, devido a capacidade modulatória desses metabólitos secundários (Di-Giacomo *et al.*, 2023). Com isso, o presente trabalho avaliou a atividade inibitória da formação do radical hidroxil pelo EMCm.

Os resultados obtidos com o EMCm demonstram um percentual de sequestro de OH• de $33,8 \pm 0,03\%$ e $27,41 \pm 0,03\%$ nas concentrações de 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL, respectivamente, valores significativamente superiores aos observados nas mesmas concentrações do controle positivo (ácido ascórbico), que apresentou $25,26 \pm 0,01\%$ e $20,60 \pm 0,03\%$, conforme mostrado na figura acima. Adicionalmente, ao comparar a maior concentração testada de 2 mg/mL do EMCm com a de 1 mg/mL do extrato metanólico de *Caesalpinia volkensii*, o EMCm apresentou um percentual de inibição maior, com valores de $43,54 \pm 0,01\%$ contra $30,98 \pm 0,28\%$, respectivamente (Muthoni et al., 2020), mesmo sendo plantas de famílias idênticas, isto é, sugerindo que EMCm pode corroborar para inativação de radicais hidroxil adicionais, podendo capturá-los e prevenindo os danos.

Além disso, tanto o OH• quanto a decomposição lenta da molécula de peróxido de hidrogênio, que contém uma ligação de oxigênio-oxigênio, são considerados impulsionadores de uma das mais drásticas consequências induzidas pelo estresse oxidativo, a peroxidização lipídica (Borges et al., 2011). Em decorrência da ausência de carga elétrica, o H₂O₂ é considerado um potente oxidante, o qual pode facilmente atravessar as biomembranas, principalmente a membrana eritrocitária, podendo acumular-se e promover sua quebrar (Andres et al., 2022). Com isso determinou-se o percentual de sequestro de H₂O₂ e atividade anti-hemolítica do EMCm.

O EMCm obteve em sua maior concentração testada (2 mg/mL), cerca de $25,4 \pm 0,02\%$ atividade inibitória do peróxido de hidrogênio, ou seja, um melhor percentual neutralizador quando comparado a concentração de 20 µg/mL do extrato hidro-metanólico das sementes de *Caesalpinia bonducella*, o qual apresentou somente 11,22% de inibição (Jana et al., 2011), isso pode ser devido a quantidade de compostos fenólicos presentes no EMCm, que podem doar elétrons, sendo assim, auxiliando na transformação de H₂O₂ em água.

Enquanto para a atividade citoprotetora, o EMCm demonstrou cerca de $86,4 \pm 0,05\%$ de proteção contra a quebra da estrutura da hemácia, em sua menor concentração testada de 0,25 mg/mL, enquanto o extrato metanólico das sementes de *Jordanian mirabilis jalapa* indicou valores inferiores, do que os apresentados pelo EMCm vistos na Figura 4, com cerca de $29,30 \pm 2,12\%$ na menor concentração testada do composto de 0.0605 µg/mL (Atrooz et al., 2024), ou seja, reafirmam que

seus compostos bioativos e antioxidantes contribuem para o fortalecimento da bicamada lipídica prevenindo contra a desestabilização celular.

Como a intoxicação por Hg, além de levar a ferroptose, pode promover uma atividade proteolítica irreversível e a processos inflamatórios devido ao aumento das EROs e ERNs (Pollard *et al.*, 2019), portanto, sendo importante avaliar a atividade anti- inflamatória do extrato por ação anti-proteinase mediado pela enzima tripsina, com utilização de fármacos já conhecidos por atuarem via COX 1 e 2, como ácido acetil salicílico (AAS), diclofenaco, indometacina, entre outros. O EMCm, apresentou $55,34 \pm 0,07\%$ de atividade anti-inflamatória pelo método de inibição da proteinase in vitro, na concentração de 2 mg/mL, sendo considerado maior do que a atividade exercida pelo AAS, que inibiu cerca de $32,83 \pm 0,02\%$ na mesma concentração, como é visto na Figura 5, lembrando que esse pode atuar nas duas vias. Sendo assim, o extrato aquoso bruto das folhas de *Sida linifolia*, demonstrou valores menores na concentração de 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cerca de $49,25 \pm 0,29\%$ de inibição de protease (Nwankwo *et al.*, 2023).

Diante disso, esse tipo de morte celular é caracterizado pelo aumento dos níveis de ferro intracelulares e extracelulares podendo ser uma das severas consequências da intoxicação por Hg em decorrência da PL produzida por esse metal, por esse motivo esse pode ser considerado um dos seus principais hallmarks, contudo existem autores que avaliam a participação de outros fatores importantes do metabolismo do ferro nesse desencadeamento, como a supressão do receptor de transferrina 1 (TRF1) (Xiao *et al.*, 2023). Existem estudos realizados com outros metais de transição, também tóxicos, como o arsênico, que induzem a ferroptose e a danos no sistema reprodutivo, bem como o Hg (Meng *et al.*, 2020). Deste modo, avaliou-se inicialmente em modelo in vivo, em camundongos machos (*Mus musculus*), os efeitos relacionados a esses mecanismos, como as dosagens de férricas e a saturação de transferrina, além dos parâmetros biométricos e reprodutivos, sendo esse último presente na tabela 3.

O EMCm alcançou o fenômeno da dose dependência, ou seja, quando maior a concentração administrada espera-se o maior efeito, além de diminuir os níveis ferrícios testiculares e indiretamente também promover um diminuir a sensibilidade de entrada de íons Fe^{3+} pelos receptores de Tf em todas as doses (50-200 mg/kg EMCm) em 48h, obtendo valores de 64,64, 135,32, 170,27 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de ferro totais e 75,67, 60,14,

28,73% da saturação de Tf, respectivamente, quando comparadas ao controle positivo (1,25 mg/kg de HgCl_2), o qual obteve valor de 303,34 $\mu\text{g/dl}$ de ferro e 134,82% de saturação de Tf, entretanto, não existem estudos que avaliem esse ultimo parâmetro de forma indireta.

Contudo, estudos feitos com camundongos machos submetidos a fitalatos (aditivos de plásticos), como o di-2-etylhexil fitalato (DEHP) e seus metabólitos como mono(2-etyl-5hidroxihexil) (MEHP), obteveram diferenças significativas com relação a densidade do receptor de Tf, quando comparados a erastina ($p<0,001$), um composto considerado ferroptotico, portanto considerando a sensibilidade do receptor de Tf como biomarcador da ferroptose (Zhao *et al.*, 2023). Com relação as níveis férricos, não foram encontrados estudos que avaliassem um grupo com tratamento com compostos naturais associados a exposição, contudo, uma pesquisa avaliou os níveis de ferro testiculares utilizando o bussulfan, um qumiterápico mais o uso de dois medicamentos considerados ferroptóticos, a ferrostatina 1 e a deferoxamina, nas concentrações de 1 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente, quando o bussulfan é avaliado com a ferrostatina 1 obteve valores significativamente similares ao controle positivo (somente bussulfan), apresentando aproximante 150 ng/mg de ferro total presente nos testículos, entretanto, quando avaliado o DFO observou-se uma queda para aproximadamente 130 ng/mg de ferro total testicular (Zhao *et al.*, 2020). Esse tipo de morte já é bem descrito na literatura que os metais pesados promovem a ferroptose (Lan *et al.*, 2024).

Já nos parametros biométricos testiculares, quando avaliados em conjuntos, testículo direito e testículo esquerdo, não foram vistas diferenças significativas em nenhuma das doses administradas de EMCm no período de 48h, isso pode ser devido ao tempo de exposição, indicando que não houve danos a nível macroscópicos, contudo estudos realizados com 1 mg/kg de HgCl_2 com ratos machos albinos (*Rattus norvigicus*) + 30 mg/kg de ZnCl_2 + 100 mg/kg de vitamina E (alfa tocoferol) expostos de 1 a 4 semanas , revelam que esses danos somente ocorrem a partir da terceira semana de intoxicação, quando comparado ao controle positivo ($p<0,05$; seguido de pós teste de Tukey), apresentando uma mudança testicular relativa de 1,2 g de testiculos/100 g de peso corporal (Shalan, 2022).

Tabela 3- Parâmetros biométricos e índice variação de peso testicular após 48h de exposição com HgCl_2 em camundongos machos (*Mus musculus*).

Grupos	Peso corporal (g)	Peso testicular (mg)	Testicular Index (%)
Controle	$43,52 \pm 4,26$	$0,074 \pm 0,013$	$0,169 \pm 0,031$
Negativo			
Controle	$45,25 \pm 7,36$	$0,090 \pm 0,017$	$0,198 \pm 0,025$
Positivo			
EMCm 50	$42,70 \pm 7,49$	$0,073 \pm 0,027$	$0,169 \pm 0,036$
mg/kg			
EMCm 100	$43,37 \pm 3,46$	$0,058 \pm 0,006$	$0,132 \pm 0,015$
mg/kg			
EMCm 200	$41,75 \pm 5,67$	$0,070 \pm 0,043$	$0,167 \pm 0,074$
mg/kg			

Resultados expressos em média \pm desvio padrão. One-Way ANOVA pós teste de Bonferroni ($p<0,05$). N= 4.

Com isso, foram analisados também por espermograma básico: a concentração e motilidade espermática tanto isoladamente (móveis, imóveis e/ou progressivos) como total, tendo em vista que esses parâmetros também são afetados pela intoxicação por HgCl_2 , em decorrência do próprio estresse oxidativo promovido quanto pela ligação do agente tóxico a grupamento tióis livres ou pela interação negativa com os hormônios sexuais, resultando em desordens no gameta masculina e células adjacentes, que posteriormente irão levar a infertilidade (Ma *et al.*, 2019).

Dessa forma, não foram observadas alterações significativas na contagem e motilidade totais após 48 horas de administração em nenhum dos grupos analisados. No entanto, ao examinar individualmente os dados de motilidade, foi identificada diferença significativa em todas as doses de EMCm administradas, em comparação aos dois grupos controle, como ilustrado na Tabela 4.

Tabela 4- Contagem total e motilidade espermática após 48h de exposição ao HgCl₂ em camundongos machos (*Mus musculus*).

Grupos	Contagem	Motilidade	Móveis (M)	Não	Imóveis (IM)
Controle	0,25 ± 0,00	87,62 ± 8,49	67,60±3,52*	20,00 ± 2,73*	13,87 ± 2,79*
Negativo					
Controle	0,25 ± 0,00	60,12 ± 10,53	14,37 ± 1,67	45,75 ± 4,06	39,8 ± 5,81
Positivo					
EMCm 50	0,25 ± 0,01	79,37 ± 3,68	44,12±7,44*	35,25 ± 6,02*	20,62 ± 5,81*
mg/kg					
EMCm 100	0,25 ± 0,01	78,37 ± 6,40	46,25±6,33*	32,12 ± 3,93*	24,15 ± 1,20*
mg/kg					
EMCm 200	0,23 ± 0,00	77,76 ± 15,44	56,62±3,48*	21,14 ± 2,73*	15,62 ± 1,85*
mg/kg					

** Contagem total dada em $\times 10^6$ sptz/mL/quadrado

(*) diferenças significativas quando comparado com controle positivo e negativo. One-Way ANOVA pós teste Bonferroni ($p<0,05$). Resultados expressos em média ± desvio padrão. N= 4. SPTZ= espermatozoides

Por outro lado, estudos de toxicidade com *Cenostigma pyramidalis*, planta pertencente ao mesmo gênero, também examinaram a contagem total e o índice gonadossomático (GSI) em cabras machos, onde observaram-se alterações significativas apenas no GSI dos animais alimentados com essa planta ($0,48 \pm 0,08$ para o feno de *C. pyramidalis* vs. $0,34 \pm 0,09$ no controle negativo) ao longo de 120 dias e concluíram que, apesar desses resultados, não foi possível confirmar os efeitos tóxicos atribuídos à espécie (Santos et al., 2020). Em função dos grupos de animais selecionados e do método de administração do composto, torna-se difícil realizar uma comparação direta com o presente estudo. No entanto, estudos conduzidos com camundongos expostos ao arseniato de sódio também indicaram contagens similares às encontradas com o EMCm (Tabela 4), com valores de $9,34 \times 10^6$ espermatozoides/epidídimo na dose equivalente de 40 mg/mL de arseniato de sódio + 1,5 g/L de ácido ascórbico, e $9,82 \times 10^6$ espermatozoides/epidídimo no controle negativo, em um período experimental de cinco semanas (Chang et al., 2007).

Além dessas metodologias, avaliar os parâmetros oxidantes, principalmente os

produtos proteicos avançados de oxidação (AOOP), e os antioxidantes, além da sua respectiva relação também são de suma importância, uma vez que índices de estresse relativos (OSI) elevados no plasma seminal, podem também corroborar tanto para o desenvolvimento da infertilidade masculina (Takeshima *et al.*, 2021) como para morte celular induzida por metais pesados. Sendo assim, avaliou-se a capacidade antioxidante total (CAT) seminal plasmática pelo método de FRAP, onde observou-se que o EMCm não obteve diferenças significativas quando comparado com o grupo de 1,25 mg/kg de HgCl₂, entretanto, pesquisas demonstram que ratos Wistar quando expostos ao 30 mg/kg ácido ellágico + 10 mg/kg de arseniato de sódio, durante 21 dias, obtiveram um aumento de 0,8 µg/mg de proteína (testículo) quando comparado ao controle somente com arseniato, onde ocorreu uma depleção da CAT para 0,4 µg/mg de proteína (testículo) ($p<0,05$) (Mehrzadi *et al.*, 2018).

No entanto, quando avaliado os níveis de oxidante presentes no plasma, pelos AOOP, obtém-se na concentração de 200 mg/kg EMCm + 1,25 mg/kg HgCl₂, cerca de $5,91 \pm 0,00$ mM eq.CT/ µL semê, considera-se baixo quando comparado ao controle positivo $9,55 \pm 0,06$ mM eq.CT/ µL semê, além de obter percentuais significamente baixos, nessa mesma concentração, 21,56% vs. 49,62% de estresse oxidativo, porém não é possível relacionar este OSI com outros metais pesados, uma vez que não foram encontrados estudos capazes de obter essas informações, entretanto, indivíduos considerados azoospérmicos, isto é, aqueles que apresentam níveis a baixo dos valores de referência recomendados pela OMS, apresentam cerca de 69,46 ± 11,68% de OSI, sendo esses considerados altos com relação ao indivíduos normozoospérmicos, cuja razão é de $26,18 \pm 24,54\%$ (Nsonwu *et al.*, 2019).

Contudo, não existem estudos que correlacionem com a terapêutica de fitoterápicos e metais pesados no semê, porém na literatura esse marcador já é utilizado para evidenciar tanto para o EO como reações inflamatórias mediadas pelos PMN (polimorfonucleares), um estudo demonstrou que com aumento do tempo de exposição a metais tóxicos, como Hg, podem aumentar de forma dose-dependente (0,001-0,002 mg/mL) os níveis desses produtos produzidos no plasma sanguíneo, indo de 5 mg/mL plasma sanguíneo no dia 2 para 25 mg/mL no dia 6 (Alfanie *et al.*, 2015).

Diante do que foi exposto, sabe-se que o Hg eleva as citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1beta, entre outros (Maria *et al.*, 2000). Por conta disso, o teste de Endtz

baseia-se na utilização da benzedina, a qual irá demarcar as peroxidases presentes nos PMN, substâncias que podem sofrer ação das EROs e das ERNs colaborando para uma resposta inflamatória no trato genital masculino, principalmente nos testículos (Flint *et al.*, 2012). Sendo assim, este é o primeiro estudo a avaliar esse método para intoxicação por metais pesados mais fitoterápicos, o EMCm demonstrou que quando comparado ao controle positivo ($1,72 \pm 0,11$), obteve diferenças estatísticas no número de PMN presentes no sêmen de camundongos, em todas as doses administradas. Além de evidenciar que o controle positivo demonstrou valores superiores aos recomendados pela OMS (2021) ($VR = >1 \times 10^6$ PMN/mL sêmen).

Sabe-se que metais pesados podem alterar a capacidade de múltiplas reações essenciais para o arcabouço espermático, como a reação acrossomica (Oliveira *et al.*, 2009). Estudos sobre a toxicidade cadmio com extrato metanolico das raízes de *Carpolobia lutea* em ratos Wistar, demonstrou que a reação acrossomica permaneceu intacta nas duas doses administradas (100 mg/kg e 200 mg/kg), tendo valores de $33,0 \pm 2,55\%$ e $68,0 \pm 7,52\%$, respectivamente, sendo maiores do que no controle positivo ($15,2 \pm 2,40\%$) (Akinola *et al.*, 2020). Já o EMCm obteve valores significantemente menores do que o estudo apresentado, porém quando comparado com o controle positivo ($7,08 \pm 3,47\%$) auxiliou nos danos ocasionados na reação acrossômica, considerando as concentrações de 100 mg/kg e 200 mg/kg, $25,83 \pm 5,83\%$ e $18,5 \pm 4,30\%$ de reações acrossômicas intactas, respectivamente.

Além disso, já é bem descrito na literatura que agentes tóxicos podem prejudicar a vitalidade dos espermatozoides (Saleh *et al.*, 2013). O EMCm atingiu níveis maiores de espermatozoides viáveis em todas as doses, apesar de não apresentar diferenças significativas quando comparado ao controle positivo, a dose de 200 mg/kg que atingiu $109,33 \pm 16,51\%$, pelo método de HOST, do que os encontrados na dose de 320 mg/kg ($35,83 \pm 2,64\%$), no período de 180 dias utilizando somente folhas jovens de *Diplazium esculentum* (Koenig ex Retz.) Sw. (Athyriaceae), em camundongos Swiss albino (Roy *et al.*, 2017).

Por fim, avaliou-se o espermograma avançado para determinar os danos causados pelo $HgCl_2$ no material genético espermático, tanto a nível de cromatina como a nível de histonas, optou-se por diferentes métodos. Quando avaliado pelo método da toluidina percebe-se que não houve diferença significativa para o percentual de maturidade espermática, isto é, maturidade da cromatina, em

nenhumas das concentrações de EMCm quando relacionadas ao controle positivo, contudo quando administrado 100 mg/mL de vitamina E (alfa tocoferol), em camundongos, o grupo de pesquisadores observou cerca de $17,9 \pm 3,2\%$ preservação da estrutura da cromatina espermática (Anvari *et al.*, 2020). No entanto, quando avaliado a nível de histonas por anilina blue, percebe-se que na dose de 100 mg/kg do EMCm ($5,08 \pm 0,61\%$) demonstrou preservar a estrutura da histona espermática, com uma diferença estatística em relação ao controle positivo ($13,91 \pm 5,16\%$), por exemplo. Já o extrato metanólico das raízes de *Carpolobia lutea* em ratos Wistar intoxicados por cádmio, também obteve percentuais protetivos do material gênico, na mesma concentração testada ($11,4 \pm 1,10\%$) com relação ao controle positivo ($35,9 \pm 5,26\%$) pelo mesmo método (Akinola *et al.*, 2020).

Em resumo, os resultados deste estudo destacam a relevância dos produtos naturais e seus compostos bioativos como terapias auxiliares, ao demonstrar que o extrato metanólico das folhas de *C. microphyllum* contribui para parâmetros essenciais do desenvolvimento espermático, tais como a reação acrossomal e a motilidade, auxiliando nas atividades bioquímicas e cinéticas necessárias para a fecundação. Adicionalmente, o extrato pode favorecer o equilíbrio homeostático entre pró-oxidantes e antioxidantes, graças à presença dos metabolitos secundários, como taninos, fenois totais e flavonoides, diminuindo os índices de estresse oxidativo e oferecendo proteção ao gameta e a outras células contra efeitos nocivos, como a peroxidação lipídica, a morte celular induzida pelo acúmulo de ferro e os danos ao DNA espermático, além de auxiliar reduzindo tanto as células mediadoras inflamatórias, como os polimorfonucleares no semen devido a presença da atividade anti-inflamatória. Assim, o extrato desempenha um papel fundamental no enfrentamento da infertilidade causada por disruptores endócrinos, como o mercúrio (Hg).

6 CONCLUSÃO

Este estudo avaliou os danos causados pela exposição exógena ao HgCl_2 em camundongos machos frente ao extrato metanólico das folhas de *Cenostigma microphyllum* (EMCm). Os resultados indicaram que o EMCm possui vários potenciais, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória, gonada protetora e anti-ferroptótica, sendo estas duas últimas confirmadas tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O

extrato pode, portanto, ajudar a combater o estresse oxidativo e suas consequências, além de contribuir para a manutenção dos níveis de ferro testicular e para a preservação das funções reprodutivas, favorecendo a motilidade dos espermatozoides e a ativação do acrossomo. Contudo, ainda são necessários estudos *in vivo* focados na toxicidade da planta, bem como mais investigações sobre outros potenciais dos compostos bioativos presentes na planta, além de elucidar melhor os mecanismos de ação anti-inflamatórios via ciclooxygenases 1 e 2.

REFERÊNCIAS

- ABARIKWU, et al. Plants in the management of male infertility. **Andrologia**, v. 52, n. 3, p. e13509, 2020.
- ABBAS, et al. Mercury exposure and health problems of the students using skin-lightening cosmetic products in Makassar, South Sulawesi, Indonesia. **Cosmetics**, v. 7, n. 3, p. 58, 2020.
- ABOUELGREED, et al. The influence of oral antioxidants on men with infertility: a systemic review. **Archivio Italiano di Urologia e Andrologia**, 2024.
- ABUBAKAR, et al. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2020.
- ACKER, et al. The good, the bad and the ugly in oxygen-sensing: ROS, cytochromes and prolyl-hydroxylases. **Cardiovascular research**, v. 71, n. 2, p. 195-207, 2006.
- AGARWAL, et al. A unique view on male infertility around the globe. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 13, p. 1-9, 2015.
- AGARWAL, et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. **The world journal of men's health**, v. 32, n. 1, p. 1-17, 2014.
- AGARWAL, et al. Hypoosmotic swelling test (HOS). **Andrological Evaluation of Male Infertility: A Laboratory Guide**, p. 93-96, 2016.
- AGARWAL, et al. Male infertility. **The Lancet**, v. 397, n. 10271, p. 319-333, 2021.
- Agência Nacional de Mineração (ANM), 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anm/pt-br>>. Acesso em: 18 maio. 2024.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Toxicological Profile for Mercury, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, **U.S. Government Printing Office**, USA, 1999.
- AGOSTINI, et al. Spermatic mitochondria: role in oxidative homeostasis, sperm function and possible tools for their assessment. **Zygote**, v. 26, n. 4, p. 251-260, 2018.
- AGRA, et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.

AGRAWAL, et al. Thimerosal induces TH2 responses via influencing cytokine secretion by human dendritic cells. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 81, n. 2, p. 474-482, 2007.

AGUDO-RIOS, et al. Sperm Chromatin Status and DNA Fragmentation in Mouse Species with Divergent Mating Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 21, p. 15954, 2023.

AGUIAR, et al. Antioxidant, antimicrobial and immunostimulant properties of saline extract from *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz (Fabaceae) leaves. 2019.

AHMAD, et al. Lipid peroxidation vs. antioxidant modulation in the bivalve *Scrobicularia plana* in response to environmental mercury—organ specificities and age effect. **Aquatic toxicology**, v. 103, n. 3-4, p. 150-158, 2011.

AJIBOYE. Standardized extract of Vitex doniana Sweet stalls protein oxidation, lipid peroxidation and DNA fragmentation in acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 164, p. 273-282, 2015.

AKIMAT, et al. Antioxidant, anti-inflammatory, acute oral toxicity, and qualitative phytochemistry of the aqueous root extract of *Launaea cornuta* (hochst. Ex oliv. & hiern.). **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine**, v. 26, p. 2515690X211064585, 2021.

AKINOLA, et al. Effects of the methanol root extract of *Carpolobia lutea* on sperm indices, acrosome reaction, and sperm DNA integrity in cadmium-induced reproductive toxicity in male Wistar rats. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 24, n. 4, p. 454, 2020.

ALAMINO, et al. O peso da mineração na Região Sudeste. CETEM/MCTI, 2014.

ALBERGARIA. O efeito da pluviosidade na caatinga sobre teores de fenóis é taninos totais em *Cenostigma microphyllum* (Mart ex G.Don) E. Gagnon & G.P. Lewis (Fabaceae). 2020. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2020.

ALDROVANDI, et al. Ferroptosis: the Good, the Bad and the Ugly. **Cell Res**, v. 30, 1061–1062 (2020).

ALFANIE, et al. Effect of heavy metal on malondialdehyde and advanced oxidation protein products concentration a focus on arsenic, cadmium, and mercury. **J. Med. and Bioengineering**, v. 4, 2015.

ALGHAMDI, et al. Essential minerals and metabolic adaptation of immune cells. **Nutrients**, v. 15, n. 1, p. 123, 2022.

ALMEIDA. A busca pelo ouro e o rastro de destruição. **Thoreauvia-Periódico de Ciências Biológicas da UNIVASF**, v. 2, n. 1, 2023.

ANDRABI, et al. Nitric oxide: physiological functions, delivery, and biomedical applications. **Advanced Science**, v. 10, n. 30, p. 2303259, 2023.

ANDRÉS, et al. Chemistry of hydrogen peroxide formation and elimination in mammalian cells, and its role in various pathologies. **Stresses**, v. 2, n. 3, p. 256-274, 2022.

ANJOS, et al. Bioaccumulation of methylmercury in fish tissue from the Roosevelt River, Southwestern Amazon basin. **Rev. Ambient. Água**, v. 11, n. 3, 2016

ANVARI, et al. Effects of acrylamide in the presence of vitamin E on sperm parameters, chromatin quality, and testosterone levels in mice. **Clinical and experimental reproductive medicine**, v. 47, n. 2, p. 101, 2020.

ARYAL, et al. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. **Plants**, v. 8, n. 4, p. 96, 2019.

ASCHBACHER, et al. Eustress, distress, and oxidative stress: Promising pathways for mind-body medicine. In: **Oxidative Stress**. Academic Press, 2020. p. 583-617.

ASCHNER, et al. Ferroptosis as a mechanism of non-ferrous metal toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 96, n. 9, p. 2391-2417, 2022.

ASSIRY, et al. Evaluation of in vitro antiprotease activity of selected traditional medicinal herbs in dentistry and its in Silico PASS prediction. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022.

ATROOZ, et al. In vitro Assessment of biological and cytotoxic activity of methanol seed extract of Jordanian *Mirabilis jalapa* L. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 8, n. 2, p. 6087-6092, 2024.

AYLWARD, et al. Evaluation of biomonitoring data from the CDC National Exposure Report in a risk assessment context: perspectives across chemicals. **Environmental health perspectives**, v. 121, n. 3, p. 287-294, 2013.

BACELLAR, et al. A Área de Insumos Básicos e a inovação na Região Sudeste. **BNDES**, 2015.

BAIR. A narrative review of toxic heavy metal content of infant and toddler foods and evaluation of United States policy. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 919913, 2022.

BARATI, et al. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, p. 93-113, 2020.

BARBOSA, et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARRANCO, et al. Measurement of oxidative stress index in seminal plasma can predict in vivo fertility of liquid-stored porcine artificial insemination semen doses. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1203, 2021.

BASTA, et al. Health Risk Assessment of Mercury Exposure from Fish Consumption in Munduruku Indigenous Communities in the Brazilian Amazon. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 18, p. 7940, 2021.

BASTA, et al. Impacto do mercúrio em áreas protegidas e povos da floresta na Amazônia: uma abordagem integrada saúde-ambiente-Relatório Técnico. 2024.

BASTA, et al. Risk Assessment of Mercury-Contaminated Fish Consumption in the Brazilian Amazon: An Ecological Study. **Toxics**, v. 11, n. 9, p. 800, 2023.

BASTA. Gold mining in the Amazon: the origin of the Yanomami health crisis. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 39, p. e00111823, 2023.

BASTIANSZ, Ashley et al. A systematic review of mercury exposures from skin-lightening products. **Environmental Health Perspectives**, v. 130, n. 11, p. 116002, 2022.

BASU, et al. A state-of-the-science review of mercury biomarkers in human populations worldwide between 2000 and 2018. **Environmental health perspectives**, v. 126, n. 10, p. 106001, 2018.

BASU, et al. Our evolved understanding of the human health risks of mercury. **Ambio**, v. 52, n. 5, p. 877-896, 2023.

BENSEFA et al. Mercury poisoning. **La Revue de medecine interne**, v. 32, n. 7, p. 416-24, 2011.

BENZIE, et al. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidante power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERLIN et al. Mercury. Handbook on the toxicology of metals. **Elsevier**, v. 10, p. B978-012369413, 2007.

BEZERRA, et al. Poisonings in ruminants by *Cenostigma pyramidale* (Tul.) Gagnon & GP Lewis (Fabaceae): A mini-review of teratogenic potential and phytochemical evidence. **Toxicon**, p. 107794, 2024.

BHARTI, et al. Effect of heavy metals: An overview. **Materials Today: Proceedings**, v. 51, p. 880-885, 2022.

BLOOD, et al. The medicinal chemistry of nitrite as a source of nitric oxide signaling. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 15, p. 1758-1768, 2017.

BOONMEE, et al. The antioxidant activities and inhibitory effects on α -glucosidase and α -amylase of ethanolic and aqueous extracts from various parts of Thai *Caesalpinia sappan* L. **ScienceAsia**, v. 49, n. 4, 2023.

BORGES, et al. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011.

BOURGONJE, et al. Oxidative stress and redox-modulating therapeutics in inflammatory bowel disease. **Trends in molecular medicine**, v. 26, n. 11, p. 1034-1046, 2020.

BRAND. Riding the tiger—physiological and pathological effects of superoxide and hydrogen peroxide generated in the mitochondrial matrix. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 55, n. 6, p. 592-661, 2020.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões*. 2024. Disponível em: < SisEmbrio — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa (www.gov.br)>. Acesso em: 10/11/2024.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. - **Brasília: Ministério da Saúde**, 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Saúde Ambiental, do Trabalhador e de Vigilância das Emergências em Saúde Pública. Orientações Para a Notificação de Intoxicações por Mercúrio [recurso eletrônico] / **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília**: Ministério da Saúde, 2021. Acesso em:12 de Maio de 2024. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cartilha_notificacao_intoxicacoes_mercuro.pdf

BRASIL. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 145, DE 21 DE MARÇO DE 2017 Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária Disponível em: legis.anvisa.gov.br/leisref/public >. Acesso em: 07/05/24.

Brasília, DF: Fundação Nacional do Índio - Funai, 2018. **Terra indígenas, e, Terra indígena em estudo.** Disponível em: <<http://www.funai.gov.br/index.php/shape>> Acesso em: maio 2024

BRIDGES, et al. Negotiating gender in the male-dominated skilled trades: A systematic literature review. **Construction management and economics**, v. 38, n. 10, p. 894-916, 2020.

CANO, et al. ABTS/TAC methodology: Main milestones and recent applications. **Processes**, v. 11, n. 1, p. 185, 2023.

CANTON, et al. Reactive oxygen species in macrophages: sources and targets. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 734229, 2021.

CARLSTRÖM. Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health. **Nature reviews nephrology**, v. 17, n. 9, p. 575-590, 2021.

CARMO, et al. Biological indicators of oxidative stress [malondialdehyde, catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase] and their application in nutrition. In: **Biomarkers in Nutrition**. Cham: Springer International Publishing, p. 1-25, 2022.

CARTA, et al. DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes. **Journal of leukocyte biology**, v. 86, n. 3, p. 549-555, 2009.

CASTRO, et al. The disconnection between the Brazilian health information system and the cases of mercury exposure in Amazon. **Health Information Management Journal**, v. 50, n. 1-2, p. 103-104, 2021.

CDC . (2024). CDC National Environmental Public Health Tracking Program website. Acesso em: <https://www.cdc.gov/nceh/tracking/index.html>

CENCI, et al. Managing and exploiting stress in the antibody factory. **FEBS letters**, v. 581, n. 19, p. 3652-3657, 2007.

CHAKRABORTI, et al. Arsenic contamination of groundwater and its induced health effects in Shahpur block, Bhojpur district, Bihar state, India: risk evaluation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 9492-9504, 2016.

CHANG, et al. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 218, n. 2, p. 196-203, 2007.

CHANHOON, et al. Selenium and mercury concentrations in biological samples from patients with COVID-19. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 73, p. 127038, 2022.

CHAVDA, Vishal; LU, Bingwei. Reverse electron transport at mitochondrial complex I in ischemic stroke, aging, and age-related diseases. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p. 895, 2023.

CHEN, et al. Characteristics and biomarkers of ferroptosis. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 637162, 2021.

CHEN, et al. Iron metabolism in ferroptosis. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 590226, 2020.

CHEN, et al. Methylmercury-induced testis damage is associated with activation of oxidative stress and germ cell autophagy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 190, p. 67-74, 2019.

CHEN, et al. Roles of glutathione peroxidase 4 on the mercury-triggered ferroptosis in renal cells: implications for the antagonism between selenium and mercury. **Metallomics**, v. 15, n. 3, p. mfad014, 2023.

CHEN, et al. The role of NOX4 and TRX2 in angiogenesis and their potential cross-talk. **Antioxidants**, v. 6, n. 2, p. 42, 2017.

CHOUCHANI, et al. Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. **Nature**, v. 532, n. 7597, p. 112-116, 2016.

CLARKSON, et al. The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 18, p. 1731-1737, 2003.

CLEMENTS. et al. Thiomersal in vaccines. **The Lancet**, v. 355, n. 9211, p. 1279-1280, 2000.

COELHO. Regeneração da espermatogénese e qualidade espermática em ratinhos expostos a CdCl₂. 2008. p.66. Dissertação de Doutorado — **Universidade de Aveiro**, Aveiro, Portugal, 2008. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10773/777>. Acesso em: 2 jul. 2023.

COLLETT, et al. Endoplasmic reticulum stress stimulates the release of extracellular vesicles carrying danger-associated molecular pattern (DAMP) molecules. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 6707, 2018.

CONRAD, et al. Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. **Genes & development**, v. 32, n. 9-10, p. 602-619, 2018.

CRISTANI, et al. Circulating advanced oxidation protein products as oxidative stress biomarkers and progression mediators in pathological conditions related to inflammation and immune dysregulation. **Current medicinal chemistry**, v. 23, n. 34, p. 3862-3882, 2016.

CROCETTO, et al. Heavy metal pollution and male fertility: an overview on adverse biological effects and socio-economic implications. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, v. 23, n. 2, p. 129-146, 2023.

CRUZ-GREGORIO, et al. Quercetin and ferroptosis. **Life**, v. 13, n. 8, p. 1730, 2023.

D'ORIA, et al. The role of oxidative stress in cardiac disease: from physiological response to injury factor. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, n. 1, p. 5732956, 2020.

DE SAÚDE INDÍGENA (SESAI), S. **RELATÓRIO SITUACIONAL DSEI YANOMAMI**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sesai>>. Acesso em: 15 maio. 2024.

DI GIACOMO, et al. Natural compounds and glutathione: Beyond mere antioxidants. **Antioxidants**, v. 12, n. 7, p. 1445, 2023.

DIXON, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **cell**, v. 149, n. 5, p. 1060-1072, 2012.

DIXON, et al. The cell biology of ferroptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1-19, 2024.

DIXON, et al. The hallmarks of ferroptosis. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 3, p. 35-54, 2019.

D'LTRI, et al. Mercury contamination: a human tragedy. **Environmental Management**, v. 2, p. 3-16, 1978.

DO, et al. Cases of acute mercury poisoning by mercury vapor exposure during the demolition of a fluorescent lamp factory. **Annals of occupational and environmental medicine**, v. 29, p. 1-8, 2017.

DOREA. Exposure to mercury during the first six months via human milk and vaccines: modifying risk factors. **American journal of perinatology**, p. 387-400, 2007.

DU PLESSIS, et al. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 32, p. 509-520, 2015.

DU PLESSIS, et al. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 32, p. 509-520, 2015.

DU, et al. Recent progress in ferroptosis: inducers and inhibitors. **Cell death discovery**, v. 8, n. 1, p. 501, 2022.

DUTTA, et al. Physiological and Pathological Functions of Reactive Nitrogen Species (RNS) and Reactive Sulphur Species (RSS) on Male Reproductive Functions. **Journal of Integrated Science and Technology**, v. 12, n. 3, p. 755-755, 2024.

DUTTA, et al. Reactive nitrogen species and male reproduction: Physiological and pathological aspects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10574, 2022.

DUTTA, et al. Reproductive toxicity of combined effects of endocrine disruptors on human reproduction. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1162015, 2023.

DUVE, et al. Functions of lysosomes. **Annual Review of Physiology**, v. 28, p. 435–492, 1966.

DYALL, et al. Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions. **Progress in lipid research**, v. 86, p. 101165, 2022.

EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. **Efsa Journal**, v. 10, n. 12, p. 2985, 2012.

EIJKELENBOOM, et al. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 14, n. 2, p. 83-97, 2013.

EISENBERG, et al. Male infertility. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 9, n. 1, p. 49, 2023.

ENTRINGER, et al. Análise de custo de um centro de reprodução humana assistida no Sistema Único de Saúde. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 33, p. e33080, 2023.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFFSA). EFSA sets lower tolerable intake level for cadmium in food, 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFFSA). Mercury in food – EFSA updates advice on risks for public health, 2012.

FAO; WHO. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*; Report of the Tenth Section: Rotterdam, The Netherlands, 2016.

FARAMARZI, et al. In vitro application of *Ceratonia siliqua* improved sperm parameters and chromatin quality after vitrification in normozoospermic aged men. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 24, p. 1-5, 2020.

FARIA, Marcília de Araújo Medrado. Mercuralismo metálico crônico ocupacional. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 116-127, 2003.

FARRAR, et al. A history of mercury. In: **The chemistry of mercury**. London: Palgrave Macmillan UK, 1977. p. 1-45.

FENG, et al. Mercury Poisoning. **The New England Journal of Medicine**, v. 387, n. 20, p. 1888-1888, 2022.

FERREIRA, et al. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, p. 32-39, 2007.

FIGUEIREDO, et al. Quantificação de fenóis e flavonoides totais dos extratos da espécie vegetal *Caesalpinia pyramidalis*. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, v. 16, n. 5, p. e4300-e4300, 2024.

FINTELmann. Modern phytotherapy and its uses in gastrointestinal conditions. **Planta medica**, v. 57, n. S 1, p. S48-S52, 1991.

FIOCRUZ. **Observatório do Mercúrio**. Disponível em: <<https://panda.maps.arcgis.com/apps/Cascade/index.html?appid=e74f4fc219b3428b8e4bce4d7295f210>>. Acesso em: 17 maio. 2024.

FLEMING, et al. Historical Writing on Meteorology: An Annotated Bibliography. **Historical Essays on Meteorology 1919–1995: The Diamond Anniversary History Volume of the American Meteorological Society**, p. 557-580, 1996.

FLINT, et al. Leukocytospermia and Oxidative Stress. **Studies on Men's Health and Fertility**, p. 517-533, 2012.

FORCINA, et al. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis. **Proteomics**, v. 19, n. 18, p. 1800311, 2019.

FORRESTER, et al. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. **Circulation research**, v. 122, n. 6, p. 877-902, 2018.

FOURQUET, et al. Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 11, p. 8463-8471, 2010.

FOUTOUHI, et al. Comparative oxidative metabolism in mammalian sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 247, p. 107095, 2022.

FREITAS, et al. Caracterização das notificações de intoxicações exógenas por agrotóxicos no Rio Grande do Sul, 2011-2018. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, p. e2020061, 2020.

FRITZ, Benjamin et al. Mercury and CO₂ emissions from artisanal gold mining in Brazilian Amazon rainforest. **Nature Sustainability**, v. 7, n. 1, p. 15-22, 2024.

FU, et al. miR-15b-5p promotes HgCl₂-induced chicken embryo kidney cells ferroptosis by targeting β-TrCP-mediated ATF4 ubiquitin degradation. **Toxicology**, v. 503, p. 153742, 2024.

FUJII, et al. Erythrocytes as a preferential target of oxidative stress in blood. **Free Radical Research**, v. 55, n. 8, p. 781-799, 2021.

FUJITA. A Mineração Artesanal (Garimpo) do Ouro no Brasil: Bases Legais, Impactos da Contaminação por Mercúrio e Tecnologias Inovadoras de Remediação. São Paulo, 37 p, 2024.

Gaem. *Cenostigma in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB605752>>. Acesso em: 21 jul. 2024

GALLAGHER. Mercury, polychlorinated biphenyls, and immune response indicators in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). **State University of New York at Stony Brook**, 2012.

GALLUZZI, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.

GANGULY, et al. Mercury and movement disorders: the toxic legacy continues. **Canadian journal of neurological sciences**, v. 49, n. 4, p. 493-501, 2022.

GAO, et al. Role of mitochondria in ferroptosis. **Molecular cell**, v. 73, n. 2, p. 354-363. e3, 2019.

GAO, et al. Selenium alleviates mercury chloride-induced liver injury by regulating mitochondrial dynamics to inhibit the crosstalk between energy metabolism disorder and NF-κB/NLRP3 inflammasome-mediated inflammation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 228, p. 113018, 2021.

GARCIA-CAPARROS, et al. Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. **The Botanical Review**, v. 87, p. 421-466, 2021.

GHAFOURI-FARD, et al. Counteracting effects of heavy metals and antioxidants on male fertility. **Biometals**, v. 34, p. 439-491, 2021.

GIBB, et al. Functions and effects of reactive oxygen species in male fertility. **Animal reproduction science**, v. 220, p. 106456, 2020.

GODLEE, et al. Wakefield's article linking MMR vaccine and autism was fraudulent. **Bmj**, v. 342, 2011.

GOLDWATER. **Mercury: A history of quicksilver**. York Press; First Edition, 1972.

GOMATHI, et al. Phytochemical Analysis and In vitro Anti-oxidant Activities of Medicinal Plants *Cyperus rotundus*, *Tinospora cordifolia* and their Formulation. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 39, n. 3, 2023.

GREESON, et al. Inheritance of paternal lifestyles and exposures through sperm DNA methylation. **Nature Reviews Urology**, v. 20, n. 6, p. 356-370, 2023.

GUPTA, et al. Inhibition of 5-aminolevulinic acid dehydratase by mercury in excised greening maize leaf segments. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 62, p. 63-69, 2013.

HABIMORAD, et al. Potencialidades e fragilidades de implantação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 2, p. 395-405, 2020.

HAIDAR, et al. Disease-associated metabolic pathways affected by heavy metals and metalloid. **Toxicology Reports**, 2023.

HAN, et al. Inhibition of ferroptosis attenuates oligospermia in male Nrf2 knockout mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 193, p. 421-429, 2022

HANNA et al. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. **Journal of advanced research**, v. 11, p. 23-32, 2018.

HAYATI, et al. Effects of in vitro exposure of mercury on sperm quality and fertility of tropical fish *Cyprinus carpio* L. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 45, n. 2, p. 189-195, 2019.

HAYATI, et al. Effects of in vitro exposure of mercury on sperm quality and fertility of tropical fish *Cyprinus carpio* L. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 45, n. 2, p. 189-195, 2019.

HAZELHOFF, et al. Gender related differences in kidney injury induced by mercury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 10523-10536, 2012.

HENKEL, et al. Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology. **Andrology**. 2021

HOUSTON. Role of mercury toxicity in hypertension, cardiovascular disease, and stroke. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 13, n. 8, p. 621-627, 2011.

HUANG, et al. Beyond NF-κB activation: nuclear functions of IκB kinase α. **Journal of biomedical science**, v. 20, p. 1-13, 2013.

IBGE. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua, 2022: acumulado de quintas visitas. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/trabalho/9221-sintese-de-indicadores-sociais.html>>. Acesso em: 10/11/2024.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Demográfico 2022. **População e Domicílios: Primeiros Resultados**. 2023.

ILIEVA, et al. Free radicals and oxidative stress as the main mechanism of heavy metal toxicity in the male reproductive system. **Acta morphologica et anthropologica**, v. 29, n. 1-2, p. 69-79, 2022.

ILIEVA, et al. Mechanisms of Action of Heavy Metals, Related with Abnormal Protein and Enzyme Activity in Male Infertility Aspect. **Acta Morphologica et Anthropologica**, v. 30, p. 1-2, 2023.

IVANOVA, et al. Study of antioxidant properties of agents from the perspective of their action mechanisms. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4251, 2020.

JANA, et al. Antioxidant potential of hydro-methanolic extract of seed of Caesalpinia bonduc: An: in vitro: study. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 4, p. 260-265, 2011.

JANISZEWSKA, et al. Are There Associations between Seminal Plasma Advanced Oxidation Protein Products and Selected Redox-Associated Biochemical Parameters in Infertile Male Patients? A Preliminary Report. **Cells**, v. 11, n. 22, p. 3667, 2022.

JIANG, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. **Nature**, v. 520, n. 7545, p. 57-62, 2015.

JIANG, et al. Connection between osteoarthritis and nitric oxide: from pathophysiology to therapeutic target. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1683, 2023.

JIANG, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. **Nature**, v. 520, n. 7545, p. 57-62, 2015.

JIANG, et al. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 22, n. 4, p. 266-282, 2021.

JOHNSON, Monte Ransome. 8 Meteorology. **The Cambridge Companion to Ancient Greek and Roman Science**, p. 160, 2020.

JOMOVA, al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging. **Archives of toxicology**, v. 97, n. 10, p. 2499-2574, 2023.

JOSHI, et al. An overview on common organic solvents and their toxicity. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 28, n. 3, p. 1-18, 2019.

JOSHI, et al. Human erythrocytes' perplexing behaviour: erythrocytic microRNAs. **Molecular and Cellular Biochemistry**, p. 1-13, 2024.

JÚNIOR, et al. Mercúrio no meio ambiente: uma revisão sobre seus efeitos toxicológicos e as principais fontes de emissão. **Revista DAE**, v. 69, n. 230, p. 127-139, 2021.

KAGAN, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. **Nature chemical biology**, v. 13, n. 1, p. 81-90, 2017.

KANEHISA, et al. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. **Nucleic acids research**, v. 51, n. D1, p. D587-D592, 2023.

KANG, et al. Mercury-induced toxicity: Mechanisms, molecular pathways, and gene regulation. **Science of The Total Environment**, p. 173577, 2024.

KARIN. How NF-κB is activated: the role of the IκB kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6867-6874, 1999.

KAUR, et al. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 4, p. 492-500, 2006.

KAUR, et al. Physiology of cellular demise: Apoptosis, necrosis, and autophagy. In: **Clinical Perspectives and Targeted Therapies in Apoptosis**. Academic Press, p. 23-78, 2021.

KESSLER. The Minamata Convention on Mercury: a first step toward protecting future generations. 2013.

KHODAMORADI, et al. Laboratory and clinical management of leukocytospermia and hematospermia: a review. **Therapeutic advances in reproductive health**, v. 14, p. 2633494120922511, 2020.

KHOURY, et al. Manifestações neurológicas em ribeirinhos de áreas expostas ao mercúrio na Amazônia brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 11, p. 2307-2318, nov. 2013.

KIL, et al. Feedback control of adrenal steroidogenesis via H₂O₂-dependent, reversible inactivation of peroxiredoxin III in mitochondria. **Molecular cell**, v. 46, n. 5, p. 584-594, 2012.

KIM, et al. An integrated view of lipid metabolism in ferroptosis revisited via lipidomic analysis. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 55, n. 8, p. 1620-1631, 2023.

KISIEL, et al. Data science and plant metabolomics. **Metabolites**, v. 13, n. 3, p. 454, 2023.

KOBAYASHI, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2016.

KORBECKI, et al. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. **J Physiol Pharmacol**, v. 64, n. 4, p. 409-421, 2013.

KOWALCZYKOWSKI. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. **Trends in biochemical sciences**, v. 25, n. 4, p. 156-165, 2000.

KRAFCZYK, et al. FOXO transcription factors in antioxidant defense. **IUBMB life**, v. 74, n. 1, p. 53-61, 2022.

KRATZ, Ewa Maria et al. Decreased melatonin levels and increased levels of advanced oxidation protein products in the seminal plasma are related to male infertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 4, p. 507-515, 2016.

KRUK, et al. Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. **Free radical research**, v. 53, n. 5, p. 497-521, 2019.

KURKOWSKA, et al. Oxidative stress is associated with reduced sperm motility in normal semen. **American journal of men's health**, v. 14, n. 5, p. 1557988320939731, 2020.

KUSHAWAHA, et al. Collapsed mitochondrial cristae in goat spermatozoa due to mercury result in lethality and compromised motility along with altered kinematic patterns. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 646, 2021.

KUSHAWAHA, et al. Mercury-induced inhibition of tyrosine phosphorylation of sperm proteins and altered functional dynamics of buck spermatozoa: an in vitro study. **Biological trace element research**, v. 198, p. 478-492, 2020.

LAKIND, Judy S. et al. A proposal for assessing study quality: Biomonitoring, Environmental Epidemiology, and Short-lived Chemicals (BEES-C) instrument. **Environment international**, v. 73, p. 195-207, 2014.

LAN, et al. Synergistic effect of PS-MPs and Cd on male reproductive toxicity: Ferroptosis via Keap1-Nrf2 pathway. **Journal of Hazardous Materials**, v. 461, p. 132584, 2024.

LAPORTE, et al. Hydrogen peroxide permeability of cellular membranes in insulin-producing cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1862, n. 2, p. 183096, 2020.

LEE, et al. Lipid metabolism and ferroptosis. **Biology**, v. 10, n. 3, p. 184, 2021.

LEITE, et al. Recent progress in phytotherapy: A Brazilian perspective. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 41, p. 101270, 2021.

LI, et al. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 385-390, 2008.

LI, et al. Effect of inorganic mercury exposure on reproductive system of male mice: Immunosuppression and fibrosis in testis. **Environmental Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 69-78, 2022.

LI, et al. Inflammasome/NF-κB translocation inhibition via PPAR γ agonist mitigates inorganic mercury induced nephrotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 201, p. 110801, 2020.

LI, et al. Selenium represses microRNA-202-5p/MICU1 axis to attenuate mercuric chloride-induced kidney ferroptosis. **Poultry Science**, p. 103891, 2024.

LI, et al. The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. **Molecular biology of the cell**, v. 17, n. 9, p. 3978-3988, 2006.

LIANG, et al. Ferroptosis at the intersection of lipid metabolism and cellular signaling. **Molecular cell**, v. 82, n. 12, p. 2215-2227, 2022.

LIMA, et al. Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 45, p. 405-414, 2015.

LIN, et al. Lipid metabolism in ferroptosis. **Advanced Biology**, v. 5, n. 8, p. 2100396, 2021.

LIN, et al. The roles of neutrophil-derived myeloperoxidase (MPO) in diseases: The new progress. **Antioxidants**, v. 13, n. 1, p. 132, 2024.

LIU, et al. Crosstalk between lipid metabolism and ferroptosis in cardiovascular diseases. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 10, p. 1296935, 2023.

LOCKE et al. Adherence to iron chelation therapy among adults with thalassemia: a systematic review. **Hemoglobin**, v. 46, n. 4, p. 201-213, 2022.

LOCKSHIN, et al. Programmed cell death—V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. **Journal of insect physiology**, v. 11, n. 7, p. 831-844, 1965.

LONG, et al. Advancement in understanding the role of ferroptosis in rheumatoid arthritis. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 1036515, 2022.

LOPACHIN, et al. Application of the hard and soft, acids and bases (HSAB) theory to toxicant–target interactions. **Chemical research in toxicology**, v. 25, n. 2, p. 239-251, 2012.

LÓPEZ-OTÍN, et al. Hallmarks of health. **Cell**, v. 184, n. 1, p. 33-63, 2021.

LU, et al. Sperm from β 1, 4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. **Development**, v. 124, n. 20, p. 4121-4131, 1997.

LUNDBERG, et al. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. **Gut**, v. 62, n. 4, p. 616-629, 2013.

MA, et al. Effects of environmental contaminants on fertility and reproductive health. **Journal of Environmental Sciences**, v. 77, p. 210-217, 2019.

MACHADO-NEVES. Effect of heavy metals on epididymal morphology and function: An integrative review. **Chemosphere**, v. 291, p. 133020, 2022.

MAILLOUX. An update on methods and approaches for interrogating mitochondrial reactive oxygen species production. **Redox biology**, v. 45, p. 102044, 2021.

MANOUCHEHRI, et al. The effects of toxic heavy metals lead, cadmium and copper on the epidemiology of male and female infertility. **JBRA assisted reproduction**, v. 26, n. 4, p. 627, 2022.

MARCONATO, et al. Infertilidade masculina: principais causas e terapêuticas emergentes, uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, p. e405111033139-e405111033139, 2022.

MARGARITEL et al. Redox basis of exercise physiology. **Redox biology**, v. 35, p. 101499, 2020.

MARTIN, et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 761-770, 2006.

MARTIN, et al. Human health effects of heavy metals. **Environmental Science and Technology briefs for citizens**, v. 15, n. 5, p. 1-6, 2009.

MATAVELI, et al. Mining is a growing threat within indigenous lands of the Brazilian Amazon. **Remote Sensing**, v. 14, n. 16, p. 4092, 2022.

MAUX, et al. Um estudo de inspiração fenomenológico-hermenêutico sobre a infertilidade masculina. **Psicologia em Revista (Belo Horizonte) [online]**, v. 25, n. 2, p. 492-512, 2019.

MEHRZADI, et al. Ellagic acid: A promising protective remedy against testicular toxicity induced by arsenic. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1464-1472, 2018.

MENG, et al. Arsenite induces testicular oxidative stress in vivo and in vitro leading to ferroptosis. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 194, p. 110360, 2020.

MICARONI, et al. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, p. 487-495, 2000.

MIERE, et al. Evaluation of in vitro wound-healing potential, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of *Stellaria media* (L.) Vill. **Applied Sciences**, v. 11, n. 23, p. 11526, 2021.

MILKOVIC, et al. The 4-hydroxynonenal–protein adducts and their biological relevance: are some proteins preferred targets?. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p. 856, 2023.

MILLS, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. **Nature**, v. 556, n. 7699, p. 113-117, 2018.

MILLS. et al. Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 457-470. e13, 2016.

Minamata Convention on Mercury (2023). Minamata Convention on Mercury: text and annexes.

Ministério do Meio Ambiente. Plano de Ação Nacional Ouro Sem Mercúrio. 2019. Brasília: **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/planodeacao/ourosemmercurio>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MIRANDA, et al. "Risco epidemiológico de transmissão vertical do mercúrio na região de fronteira na Pan Amazônia. **Dal Molin, RS Saúde Em Foco Temas Contemporâneos**, v. 3, 2020.

MIRKOV, et al. Plant extracts and isolated compounds reduce parameters of oxidative stress induced by heavy metals: an up-to-date review on animal studies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 16, p. 1799-1815, 2020.

MONTECUCCO, et al. Chlorhexidine prevents hypochlorous acid-induced inactivation of α 1-antitrypsin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, n. 11, p. e72-e77, 2009.

MORALES, et al. Malondialdehyde: facts and artifacts. **Plant physiology**, v. 180, n. 3, p. 1246-1250, 2019.

MORTENSEN, et al. Polyunsaturated fatty acids drive lipid peroxidation during ferroptosis. **Cells**, v. 12, n. 5, p. 804, 2023.

MUKHERJEE, et al. The interplay of arsenic, silymarin, and NF- κ B pathway in male reproductive toxicity: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 252, p. 114614, 2023.

MURI, et al. Redox regulation of immunometabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 6, p. 363-381, 2021.

MUSSY, et al. Evaluating total mercury and methylmercury biomagnification using stable isotopes of carbon and nitrogen in fish from the Madeira River basin, Brazilian Amazon. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 12, p. 33543-33554, 2023.

MUTHONI et al. In vitro antioxidant activities of methanolic extracts of *Caesalpinia volkensii* Harms., *Vernonia lasiopus* O. Hoffm., and *Acacia hockii* De Wild. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, n. 1, p. 3586268, 2020.

MUZOLF-PANEK, et al. A chemometric approach to oxidative stability and physicochemical quality of raw ground chicken meat affected by black seed and other spice extracts. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 903, 2020.

MUZOLF-PANEK, et al. Comprehensive study on the antioxidant capacity and phenolic profiles of black seed and other spices and herbs: Effect of solvent and time of extraction. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 5, p. 4561-4574, 2021.

NABI, et al. A comprehensive review of adaptations in plants under arsenic toxicity: physiological, metabolic and molecular interventions. **Environmental Pollution**, v. 290, p. 118029, 2021.

NAM, et al. Computational drug discovery approach based on nuclear factor- κ B pathway dynamics. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, n. 12, p. 4397-4402, 2011.

NAM, et al. Mercury (II) adsorption from wastewaters using a thiol functional adsorbent. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 42, n. 9, p. 1955-1964, 2003.

NASCIMENTO, et al. Phenotypic plasticity of trichomes and stomatal density in *Cenostigma microphyllum* (Mart. ex G. Don) E. Gagnon and GP Lewis (Fabaceae) in a seasonally dry tropical forest, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 45, n. 2, p. 645-650, 2022.

NATELSON, et al. Acquired myelodysplasia or myelodysplastic syndrome: clearing the fog. **Advances in hematology**, v. 2013, n. 1, p. 309637, 2013.

NEVALAINEN. Cytotoxicity of vinblastine and vincristine to pancreatic acinar cells. **Virchows Archiv B Cell Pathology**, v. 18, p. 119–127, 1975.

NINOMIYA, et al. Indígenas sob um contexto vulnerável de segurança social em meio à crise sanitária. **Journal of Law and Sustainable Development**, v. 9, n. 1, p. e676-e676, 2021.

NOGARA, et al. Methylmercury's chemistry: From the environment to the mammalian brain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1863, n. 12, p. 129284, 2019.

NSONWU, et al. Heavy metals, biomarkers of oxidative stress and changes in sperm function: A case-control study. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, v. 17, n. 3, p. 163, 2019.

NWANKWO, et al. Phytochemical composition and potential anti-inflammatory and antioxidant mechanisms of leaf extracts of *Sida linifolia* L.(Malvaceae). **Journal of Herbal Medicine**, v. 38, p. 100630, 2023.

NWANKWO, et al. Phytochemical composition and potential anti-inflammatory and antioxidant mechanisms of leaf extracts of *Sida linifolia* L.(Malvaceae). **Journal of Herbal Medicine**, v. 38, p. 100630, 2023.

O'CONNOR, et al. Mercury speciation, transformation, and transportation in soils, atmospheric flux, and implications for risk management: A critical review. **Environment international**, v. 126, p. 747-761, 2019.

OKAMOTO, et al. The Au-Hg (gold-mercury) system. **Bulletin of alloy phase diagrams**, v. 10, n. 1, p. 50-58, 1989.

OLIVEIRA, et al. Lead chloride affects sperm motility and acrosome reaction in mice: lead affects mice sperm motility and acrosome reaction. **Cell biology and toxicology**, v. 25, p. 341-353, 2009.

OLIVEIRA, et al. Lead chloride affects sperm motility and acrosome reaction in mice: lead affects mice sperm motility and acrosome reaction. **Cell biology and toxicology**, v. 25, p. 341-353, 2009.

OLIVEIRA, et al. Mercury in wild animals and fish and health risk for indigenous Amazonians. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 14, n. 3, p. 161-169, 2021.

OLIVEIRA, et al. Zinc and N-acetylcysteine modify mercury distribution and promote increase in hepatic metallothionein levels. **J Trace Elem Med Biol.** V. 32, p 183-188, 2015.

OLIVEIRA-MARQUES, et al. Role of hydrogen peroxide in NF-κB activation: from inducer to modulator. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 9, p. 2223-2243, 2009.

OLIVEIRA-MARQUES, et al. Role of hydrogen peroxide in NF-κB activation: from inducer to modulator. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 9, p. 2223-2243, 2009.

ORISAKWE, et al. Low-dose mercury induces testicular damage protected by zinc in mice. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 95, n. 1, p. 92-96, 2001.

PAITHANKAR, et al. Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction. **Chemosphere**, v. 262, p. 128350, 2021.

PAKPAHAN, et al. "Am I Masculine?" A metasynthesis of qualitative studies on traditional masculinity on infertility. **F1000Research**, v. 12, 2023.

PANG, et al. Global health impact of atmospheric mercury emissions from artisanal and small-scale gold mining. **Iscience**, v. 25, n. 9, 2022.

PAPAYANNOPOULOS, et al. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 2, p. 134-147, 2018.

PARIZ, et al. Melatonin and caffeine supplementation used, respectively, as protective and stimulating agents in the cryopreservation of human sperm improves survival, viability, and motility after thawing compared to traditional TEST-yolk buffer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, n. 1, p. 6472945, 2019.

PARK, et al. Diversity and complexity of cell death: a historical review. **Experimental & molecular medicine**, v. 55, n. 8, p. 1573-1594, 2023.

PARSONS, et al. A brief history of mercury and its environmental impact. **Mercury: sources, measurements, cycles, and effects**, v. 34, p. 1-20, 2005.

PATTARO, et al. Antiviral activity of *Cenostigma pluviosum* var. *peltophoroides* extract and fractions against SARS-CoV-2. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 15, p. 7297-7308, 2023.

PAVITHRA, et al. Mercury sources, contaminations, mercury cycle, detection and treatment techniques: A review. **Chemosphere**, v. 312, p. 137314, 2023.

PEARSON. Hard and soft acids and bases. **Journal of the American Chemical society**, v. 85, n. 22, p. 3533-3539, 1963.

PEARSON. Hard and soft acids and bases—the evolution of a chemical concept. **Coordination chemistry reviews**, v. 100, p. 403-425, 1990Hard and soft acids and bases. **Journal of the American Chemical society**, v. 85, n. 22, p. 3533-3539, 1963.

PEARSON. Hard and soft acids and bases—the evolution of a chemical concept. **Coordination chemistry reviews**, v. 100, p. 403-425, 1990.

PELÁEZ, et al. ROS are universal cell-to-cell stress signals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 79, p. 102540, 2024.

PELLAVIO, et al. Human sperm functioning is related to the aquaporin-mediated water and hydrogen peroxide transport regulation. **Biochimie**, v. 188, p. 45-51, 2021.

PERINI et al. Single-Nucleotide Polymorphisms Associated with Mercury Levels and Neurological Symptoms: An Overview. **Toxics**, v. 12, n. 3, p. 226, 2024.

PERINI, et al. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 1075-1086, 2010.

PERINI, et al. Genetic Polymorphism of Delta Aminolevulinic Acid Dehydratase (*ALAD*) Gene and Symptoms of Chronic Mercury Exposure in Munduruku Indigenous Children within the Brazilian Amazon. *Int J Environ Res Public Health.* 18, p. 8746, 2021.

PERINI, et al. Single-Nucleotide Polymorphisms Associated with Mercury Levels and Neurological Symptoms: An Overview. *Toxics*, v. 12, n. 3, p. 226, 2024.

PEROTTONI, et al. Effects of mercury and selenite on delta-aminolevulinate dehydratase activity and on selected oxidative stress parameters in rats. *Environ Res.* V 95, p 166-173, 2004.

PETROVSKA. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, v. 6, n. 11, p. 1-5, jan. 2012.

PIRES. Timerosal contido em vacinas e transtornos do espectro autista: revisão de literatura. *SANARE-Revista de Políticas Públicas*, v. 17, n. 1, 2018.

PODGÓRSKA, et al. Natural and conventional cosmetics—mercury exposure assessment. *Molecules*, v. 26, n. 13, p. 4088, 2021.

POLLARD, et al. Mercury-induced inflammation and autoimmunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1863, n. 12, p. 129299, 2019.

POLLARD, et al. Mercury-induced inflammation and autoimmunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1863, n. 12, p. 129299, 2019.

POPE, et al. Regulation of ferroptosis by lipid metabolism. *Trends in Cell Biology*, 2023.

POULIN, et al. Mercurio: Evaluación de la carga de morbilidad ambiental a nivel nacional y local. Editora, Prüss-Üstün A. **Organización Mundial de la Salud**, Ginebra, 2008.

POURRET, et al. It's time to replace the term "heavy metals" with "potentially toxic elements" when reporting environmental research. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 22, p. 4446, 2019.

PRIETO, et al. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, v. 269, p. 337-341, 1999.

PRIOR, et al. Multi-radical (ORAC MR5) antioxidant capacity of selected berries and effects of food processing. *Journal of berry research*, v. 6, n. 2, p. 159-173, 2016.

Projeto MapBiomas (2021) – Coleção 7 do Módulo de Mineração, acessado em 18 de maio de 2024 através do link: <https://doi.org/10.58053/MapBiomas/VJIJCL>

Projeto MapBiomas (2024) – Coleção 8 do Módulo de Mineração, acessado em 18 de maio de 2024 através do link: <https://doi.org/10.58053/MapBiomas/VJIJCL>

PUNZIANO, et al. Antioxidant systems as modulators of ferroptosis: focus on transcription factors. **Antioxidants**, v. 13, n. 3, p. 298, 2024.

RABIU, et al. Co-exposure to lead and mercury among artisanal gold miners. **Asian J. Environ. Ecol**, v. 11, p. 1-8, 2020.

RAISG - Rede Amazônica de Informação Socioambiental Georreferenciada, 2020. Disponível em: <<https://www.raisg.org/pt-br/mapas/>>. Acesso em: 18 maio. 2024.

RAO, et al. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 6, p. 705-712, 2001.

RAUF, et al. Reactive oxygen species in biological systems: Pathways, associated diseases, and potential inhibitors—A review. **Food Science & Nutrition**, v. 12, n. 2, p. 675-693, 2024.

RAZAK, et al. Modulating effects of zingiberaceae phenolic compounds on neurotrophic factors and their potential as neuroprotectants in brain disorders and age-associated neurodegenerative disorders: A review. **Nutrients**, v. 15, n. 11, p. 2564, 2023.

RE, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RESHI, et al. From Nature to lab: A review of secondary metabolite biosynthetic pathways, environmental influences, and in vitro approaches. **Metabolites**, v. 13, n. 8, p. 895, 2023.

RIBAS-MAYNOU, et al. Functional aspects of sperm chromatin organization. **Nuclear, Chromosomal, and Genomic Architecture in Biology and Medicine**, p. 295-311, 2022.

RIBEIRO, et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 205, p. 69-102, 2017.

ROCHETTE, et al. Lipid peroxidation and iron metabolism: two corner stones in the homeostasis control of ferroptosis. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 1, p. 449, 2022.

RODRÍGUEZ. Mercury methylation in boreal aquatic ecosystems under oxic conditions and climate change: a review. **Frontiers in Marine Science**, v. 10, 2023.

RODRÍGUEZ-VISO, et al. Mercury toxic effects on the intestinal mucosa assayed on a bicameral in vitro model: Possible role of inflammatory response and oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 166, p. 113224, 2022.

ROONEY. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. **Toxicology**, v. 234, n. 3, p. 145-156, 2007.

ROOZBEH, et al. A systematic review on use of medicinal plants for male infertility treatment. **Journal of Family & Reproductive Health**, v. 15, n. 2, p. 74, 2021.

ROSA, et al. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência & saúde coletiva**, v. 16, p. 311-318, 2011.

ROY, et al. Toxicological assessment of Diplazium esculentum on the reproductive functions of male Swiss albino mouse. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 40(2), p 171–182, 2016

RUIZ-HERNANDEZ, et al. Environmental chemicals and DNA methylation in adults: a systematic review of the epidemiologic evidence. **Clinical epigenetics**, v. 7, p. 1-24, 2015.

RUMIATO, et al. Contaminantes em alimentos e orientação nutricional: reflexão teórica. **Revista de Salud Pública**, v. 19, p. 574-577, 2017.

SÁ-FILHO, et al. Plantas medicinais utilizadas na caatinga brasileira e o potencial terapêutico dos metabólitos secundários: uma revisão. **Research, society and development**, v. 10, n. 13, p. e140101321096-e140101321096, 2021.

SAHOO, et al. Understanding the mechanistic roles of environmental heavy metal stressors in regulating ferroptosis: adding new paradigms to the links with diseases. **Apoptosis**, v. 28, n. 3, p. 277-292, 2023.

SAINI, et al. Advances in lipid extraction methods—a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13643, 2021.

SAINI, et al. Advances in lipid extraction methods—a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13643, 2021.

SAINI, et al. Advances in lipid extraction methods—a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13643, 2021.

SALEH, et al. Lead and Cadmium assay in serum and semen of infertile men attending andrology clinic in Assiut university hospital (Rural versus Urban). **Journal of Environmental Science, IOSR**, v. 2, n. 4, p. 2319-2399, 2013.

SANTOS et al. Hair as a biomarker of long term mercury exposure in Brazilian Amazon: a systematic review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 3, p. 500, 2018.

SANTOS, et al. Mercury exposure in Munduruku Indians from the community of Sai Cinza, state of Para, Brazil. 2002.

SANTOS, et al. Testicular and seminal evaluation of goats fed hay *Cenostigma pyramidale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 12, p. 963–969, 2020.

SARAEV, et al. Reactions of lipid hydroperoxides and how they may contribute to ferroptosis sensitivity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 81, p. 102478, 2024.

SCHAUDER, et al. Regulation and gene expression of heme synthesis under heavy metal exposure-review. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 29, n. 2, 2010.

SCHULZ, et al. Reprint of “Update of the reference and HBM values derived by the German Human Biomonitoring Commission”. **International Journal of Hygiene and Environmental Health** 215 : 150–158; 2012.

SCHULZ, et al. Twenty years of the German Environmental Survey (GerES): Human biomonitoring – Temporal and spatial (West Germany/East Germany) differences in population exposure. Int. **International Journal of Hygiene and Environmental Health** 210: 271–297; 2007.

SECRETARIA DE SAÚDE INDÍGENA (SESAI), S. RELATÓRIO SITUACIONAL DSEI YANOMAMI. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sesai>>. Acesso em: 15 maio. 2024.

SENDEROVIC, et al. The Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Assessing the Functional Level of Coronary Artery Lesions in Chronic Coronary Syndrome. **Cardiology Research**, v. 15, n. 5, p. 330, 2024.

SEPAND, et al. Ferroptosis: Environmental causes, biological redox signaling responses, cancer and other health consequences. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 480, p. 215024, 2023.

SHAHSAVARI, et al. Determination of antioxidant capacity of methanolic extract of *Allium ampeloprasum* subsp *Iranicum*. **Journal of Biochemicals and Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 3-6, 2023.

SHALAN. Amelioration of mercuric chloride-induced physiologic and histopathologic alterations in rats using vitamin E and zinc chloride supplement. **Helijon**, v. 8, n. 12, 2022.

SHARMA, et al. Relevance of leukocytospermia and semen culture and its true place in diagnosing and treating male infertility. **The World Journal of Men's Health**, v. 40, n. 2, p. 191, 2022.

SIES, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 23, n. 7, p. 499-515, 2022.

Sies, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. **Nature reviews. Molecular cell biology** vol. 23,7, p 499-515, 2022

SIES, et al. Fundamentals of redox regulation in biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1-19, 2024.

SIES. Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. In: **Oxidative stress**. Academic Press, 2020. p. 3-12.

SIES. What is oxidative stress?. In: **Oxidative stress and vascular disease**. Boston, MA: Springer US, p. 1-8,1985.

SIESSIES, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 23, n. 7, p. 499-515, 2022.

SILVA, et al. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 464-468, 2015.

SILVA, et al. Chronic mercury exposure and GSTP1 polymorphism in Munduruku indigenous from Brazilian Amazon. **Toxics**, v. 11, n. 2, p. 138, 2023.

SILVA, et al. Convenção de Minamata: análise dos impactos socioambientais de uma solução em longo prazo. **Saúde em Debate**, v. 41, n. spe2, p. 50–62, jun. 2017.

SILVA, et al. Hydrolyzable tannins from *Poincianella* (Caesalpini) microphylla fruits: Metabolite profiling and anti-*Trichomonas vaginalis* activity. **Food Research International**, v. 134, p. 109236, 2020.

SILVA, et al. Impact of environmental mercury exposure on the blood cells oxidative status of fishermen living around Mundaú lagoon in Maceió–Alagoas (AL), Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 219, p. 112337, 2021.

SILVA, et al. Plantas medicinais e seus usos em um quilombo amazônico: o caso da comunidade Quilombola do Abacatal, Ananindeua (PA). **Revista do NUFEN**, v. 11, n. 3, p. 113-136, 2019.

SILVA, et al. Plantas medicinais entre Agentes Comunitários de Saúde Ribeirinhos: conhecimento, uso, forma de preparação e indicação. **Revista Enfermagem UERJ**, v. 31, p. e78314-e78314, 2023.

SILVA, et al.. Convenção de Minamata: análise dos impactos socioambientais de uma solução em longo prazo. **Saúde em Debate**, v. 41, n. spe2, p. 50–62, jun. 2017.

SILVA. A construção das vulnera (ha) bilidades masculinas: uma questão de saúde e violência. **IL Paiva et al**, p. 153-173, 2013.

SIVIOTTI, et al. Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. **Toxicological reviews**, v. 23, p. 169-188, 2004.

SOARES, et al. Active biodegradable film based on chitosan and cenostigma nordestinum'extracts for use in the food industry. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 30, n. 1, p. 217-231, 2022.

SOARES. **Análise fitoquímica e atividade antimicrobiana do extrato bruto da casca de *Poincianella pyramidalis* [Tul.] LP Queiroz (catingueira)**. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso.

SOUSA, et al. Uma revisão de escopo de revisões sistemáticas sobre exposição humana ao mercúrio. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 47, p. e18, 2022.

SOUSA, et al.. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. Quím. Nova, 2007 30(2), p. 351–355, mar. 2007.

SOUZA, et al. A importância do ferro no organismo humano: uma revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 17, p. e151111738965-e151111738965, 2022.

SOUZA, et al. A VIDA RIBEIRINHA AMAZÀ" NICA: ALTERIDADE, TERRITORIALIDADE E INVISIBILIDADE. **Anais dos Cursos de Pós-Graduação Lato Sensu da Universidade Evangélica de Goiás-UniEVANGÉLICA**, v. 3, n. 1, p. 36-53, 2019.

SOUZA, et al. Chumbo e anemia. **InCID: Revista de Ciência da Informação e Documentação**, v. 42, n. 3, p. 337-340, 2009.

SRINIVAS, et al. ROS and the DNA damage response in cancer. **Redox biology**, v. 25, p. 101084, 2019.

SU, et al. Ferroptosis: a novel type of cell death in male reproduction. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 43, 2022.

TAKESHIMA, et al. et al. Oxidative stress and male infertility. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 20, n. 1, p. 41-52, 2021.

TAN, et al. Emerging roles and therapeutic potentials of ferroptosis: from the perspective of 11 human body organ systems. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 478, n. 12, p. 2695-2719, 2023.

TAN, et al. The endocrine effects of mercury in humans and wildlife. **Critical reviews in toxicology**, v. 39, n. 3, p. 228-269, 2009.

TANG, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. **Cell research**, v. 31, n. 2, p. 107-125, 2021.

TANG, et al. Mercury chloride activates the IFNy-IRF1 signaling in myeloid progenitors and promotes monopoiesis in mice. **Environmental Pollution**, v. 337, p. 122583, 2023.

TEIXEIRA, et al. Phytochemical screening of *Cenostigma microphyllum* (Mart ex G. Don) E. Gagnon & GP Lewis (Fabaceae). 2021.

TENORE, et al. Antioxidant peptides from "Mozzarella di Bufala Campana DOP" after simulated gastrointestinal digestion: In vitro intestinal protection, bioavailability, and anti-haemolytic capacity. **Journal of functional foods**, v. 15, p. 365-375, 2015.

THOMAS. The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. **Immunology letters**, v. 192, p. 88-96, 2017.

TINKOV, et al. Mercury and metabolic syndrome: a review of experimental and clinical observations. **Biometals**, v. 28, p. 231-254, 2015.

TROMBETTI, et al. Oxidative stress and ROS-mediated signaling in leukemia: novel promising perspectives to eradicate chemoresistant cells in myeloid leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 2470, 2021.

TROSTCHANSKY, et al. Regulation of arachidonic acid oxidation and metabolism by lipid electrophiles. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 152, p. 106482, 2021.

TUNC, et al. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 26, p. 537-544, 2009.

TWAIJ, et al. Bioactive secondary metabolites from plant sources: types, synthesis, and their therapeutic uses. **International Journal of Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 4-14, 2022.

ULRICH, et al. The role of thiols in antioxidant systems. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 140, p. 14-27, 2019.

UNEP, UNEP. Minamata Convention on Mercury: text and annexes. **UNEP, Geneva, Switzerland**, 2013.

UNEP. 2019b. *Minamata Convention Text and Annexes*.

UNEP. 2019b. *Minamata Convention Text and Annexes*.

UNEP. Global Mercury Assessment 2018: UN Environment Programme, Chemicals Branch, Geneva, Switzerland. Update to the Global Mercury Assessment 2013. Disponível em: <https://www.unenvironment.org/resources/publication/global-mercury-assessment-2018>. Acesso: 05 de Março de 2024.

UNEP. Global Mercury Assessment 2018: UN Environment Programme, Chemicals Branch, Geneva, Switzerland. Update to the Global Mercury Assessment 2013. Disponível em: <https://www.unenvironment.org/resources/publication/global-mercury-assessment-2018>. Acesso: 05 de Março de 2024.

UNEP. 2 nd Round of Mercury Laboratory Proficiency Testing. Disponível em: <http://nimd.env.go.jp/english/activity/international_contribution/promotion/doc/Report_on_2nd_proficiency_testing.pdf>. **UNEP, 2023** Acesso em: 7 maio. 2024.

UNFPA. *Reprodução assistida e direitos: panorama, desafios e recomendações para políticas públicas no Brasil*. Brasília, DF: **Fundo de População das Nações Unidas - UNFPA**, 2024.

US Food & Drug Administration (EPA). Thimerosal and vaccines. FDA [Internet]. 2 jan. 2018 [citado em 26 maio 2024]. Disponível em: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/thimerosal-and-vaccines#nolink>

VAHABZADEH, et al. Occupational metallic mercury poisoning in gilders. **The international journal of occupational and environmental medicine**, v. 7, n. 2, p. 116, 2016.

VALGIMIGLI, et al. Lipid peroxidation and antioxidant protection. **Biomolecules**, v. 13, n. 9, p. 1291, 2023.

VALKO, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAVOURI, et al. Chromatin organization in sperm may be the major functional consequence of base composition variation in the human genome. **PLoS genetics**, v. 7, n. 4, p. e1002036, 2011.

VEGA, et al. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 6, p. 1051, 2018.

VIANA, et al. Gastroprotective activity of Cenostigma macrophyllum Tul. var. acuminata Teles Freire leaves on experimental ulcer models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 316-323, 2013.

VIANNA, et al. Human exposure to mercury and its hematological effects: a systematic review. **Cadernos de saude publica**, v. 35, p. e00091618, 2019.

VICENTE-GUTIERREZ et al. Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour. **Nature metabolism**, v. 1, n. 2, p. 201-211, 2019.

VILLAVERDE, et al. From past to present: The link between reactive oxygen species in sperm and male infertility. **Antioxidants**, v. 8, n. 12, p. 616, 2019.

VILVANATHAN, et al. Physiological Salt Solutions. In: Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology: Volume 3: Experimental Pharmacology: Research Methodology and Biostatistics. Singapore: **Springer Nature Singapore**, p. 151-156.2022.

VITALE et al. Role of Oxidative Stress and Inflammation in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Brief Account. 2024.

VON KRUSENSTIERN, et al. Identification of essential sites of lipid peroxidation in ferroptosis. **Nature chemical biology**, v. 19, n. 6, p. 719-730, 2023.

WANG, et al. Co-exposure to Environmentally Relevant Levels of Molybdenum and Cadmium Induces Oxidative Stress and Ferroptosis in the Ovary of Ducks. **Biological Trace Element Research**, p. 1-10, 2024.

WANG, et al. HgCl₂ exposure mediates pyroptosis of HD11 cells and promotes M1 polarization and the release of inflammatory factors through ROS/Nrf2/NLRP3. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 269, p. 115779, 2024.

WANG, et al. Pharmacological inhibition of ferroptosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases and strokes. **Advanced Science**, v. 10, n. 24, p. 2300325, 2023.

WEI, et al. Arsenic induces pancreatic dysfunction and ferroptosis via mitochondrial ROS-autophagy-lysosomal pathway. **Journal of hazardous materials**, v. 384, p. 121390, 2020.

WELDON, et al. Mercury poisoning associated with a Mexican beauty cream. **Western Journal of Medicine**, v. 173, n. 1, p. 15, 2000.

WHO, World Health Organization. Guidance for Identifying Populations at Risk from Mercury Exposure; **World Health Organization**: Geneva, Switzerland, 2008.

WHO, World Health Organization. Infertility prevalence estimates, 1990–2021. **World Health Organization**, 2023.

WHO. Assessment of prenatal exposure to mercury: standard operating procedures.human biomonitoring survey: the first survey protocol: a tool for developing national protocols. **World Health Organization**. Regional Office for Europe, 2018.

WHO. Manual Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 5th edition, Geneva. **World Health Organization Manual**. Switzerland, 2010

WHO. Mercury and health. **World Health Organization**, 2024.

WHO. WHO fact sheet on infertility. **Global Reproductive Health**, v. 6, n. 1, p. e52, 2021.

WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th edition, Geneva. **World Health Organization Manual**. Switzerland, 2021.

WHO. Assessment of prenatal exposure to mercury: human biomonitoring survey: the first survey protocol: a tool for developing national protocols. Assessment

of prenatal exposure to mercury: standard operating procedures. **World Health Organization.** Regional Office for Europe, 2018.

WHO. The public health impact of chemicals: Knowns and unknowns: Data addendum for 2016. **World Health Organization**, 2018.

WITKOWSKA, et al. Heavy metals and human health: Possible exposure pathways and the competition for protein binding sites. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 6060, 2021.

WOISKY, et al. Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99-105, 1998.

WOJTCZAK, et al. Transferrin and antiproteases are major proteins of common carp seminal plasma. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 19, n. 4, p. 387-392, 2005.

WOJTUNIK-KULESZA. Approach to optimization of FRAP methodology for studies based on selected monoterpenes. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5267, 2020.

WONG, Candace; ROBERTS, Stephen M.; SAAB, Imad Neal. Review of regulatory reference values and background levels for heavy metals in the human diet. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 130, p. 105122, 2022.

WONG, et al. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. **Trends in pharmacological sciences**, v. 32, n. 5, p. 290-299, 2011.

World Health Organization (WHO). Evaluation of certain food additives and the contaminants mercury, lead and cadmium. **Technical Report Series Nº 505**, Geneva, 1972, 132pp

World Health Organization (WHO). Statement of Thimerosal. The global advisory committee on vaccine safety. **WHO** [Internet]. 2006. [citado em 26 maio 2024]. Disponível em:

http://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/thiomersal/statement_jul2006/e/

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. World Health Organization, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Exposição ao mercúrio: um grave problema de saúde pública. Disponível em: <<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/340715/9789240025172-por.pdf>>. WHO, 2021. Acesso em: 5 maio. 2024.

WU, et al. The toxicity of mercury and its chemical compounds: molecular mechanisms and environmental and human health implications: a comprehensive review. **Acs Omega**, v. 9, n. 5, p. 5100-5126, 2024.

XAVIER, et.,al. Contribuição para o estabelecimento de níveis de referência para a concentração de mercúrio no sangue de crianças na cidade do Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, 21 (2): 182-7; 2013.

XIE, et al. Molecular mechanisms of mercury-sensitive aquaporins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 144, n. 48, p. 22229-22241, 2022.

XU, et al. Ferroptosis as a mechanism for health effects of essential trace elements and potentially toxic trace elements. **Biological Trace Element Research**, v. 201, n. 9, p. 4262-4274, 2023.

YAMADA, et al. Compartmentalized mitochondrial ferroptosis converges with optineurin-mediated mitophagy to impact airway epithelial cell phenotypes and asthma outcomes. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 5818, 2024.

YANG, et al. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 2, p. 2411-2416, 2015.

YANG, et al. Salvianolic acid A attenuates arsenic-induced ferroptosis and kidney injury via HIF-2 α /DUOX1/GPX4 and iron homeostasis. **Science of The Total Environment**, v. 907, p. 168073, 2024.

YE, et al. Evaluation of mercury exposure level, clinical diagnosis and treatment for mercury intoxication. **Annals of occupational and environmental medicine**, v. 28, p. 1-8, 2016.

YEUNG, et al. Aquaporins in the human testis and spermatozoa—identification, involvement in sperm volume regulation and clinical relevance. **International journal of andrology**, v. 33, n. 4, p. 629-641, 2010.

YORIFUJI, et al. Minamata. In: **Encyclopedia of Toxicology, Fourth Edition: Volume 1-9**. Elsevier, 2023. p. V6-413-V6-418.

YUAN, et al. Emerging roles of ferroptosis in male reproductive diseases. **Cell Death Discovery**, v. 9, n. 1, p. 358, 2023.

ZEFFERINO, et al. Possible mechanisms of mercury toxicity and cancer promotion: involvement of gap junction intercellular communications and inflammatory

cytokines. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, n. 1, p. 7028583, 2017.

ZHANG et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. **Redox biology**, v. 26, p. 101284, 2019.

ZHANG, et al. BAP1 links metabolic regulation of ferroptosis to tumour suppression. **Nature cell biology**, v. 20, n. 10, p. 1181-1192, 2018.

ZHANG, et al. Crosstalk between ferroptosis and stress—Implications in cancer therapeutic responses. **Cancer Innovation**, v. 1, n. 1, p. 92-113, 2022.

ZHANG, et al. Fatty acid composition analyses of commercially important fish species from the Pearl River Estuary, China. **PLoS One**, v. 15, n. 1, p. e0228276, 2020.

ZHANG, et al. Gut microbiota-mediated ferroptosis contributes to mercury exposure-induced brain injury in. **Environmental Toxicology**, 2021.

ZHANG, et al. Methionine restriction-Association with redox homeostasis and implications on aging and diseases. **Redox Biology**, v. 57, p. 102464, 2022.

ZHANG, et al. PKC β II phosphorylates ACSL4 to amplify lipid peroxidation to induce ferroptosis. **Nature cell biology**, v. 24, n. 1, p. 88-98, 2022.

ZHANG, et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, n. 1, p. 4350965, 2016.

ZHANG, et al. The degradation pathways of contaminants by reactive oxygen species generated in the Fenton/Fenton-like systems. **Chinese Chemical Letters**, p. 109579, 2024.

ZHANG, Shuping et al. Adverse impact of heavy metals on bone cells and bone metabolism dependently and independently through anemia. **Advanced Science**, v. 7, n. 19, p. 2000383, 2020.

ZHAO, et al. Ferroptosis is critical for phthalates driving the blood-testis barrier dysfunction via targeting transferrin receptor. **Redox Biology**, v. 59, p. 102584, 2023.

ZHAO, et al. Inhibition of ferroptosis attenuates busulfan-induced oligospermia in mice. **Toxicology**, 440, 152489, 2020.

ZHENG, et al. Regulation of ferroptosis by bioactive phytochemicals: Implications for medical nutritional therapy. **Pharmacological Research**, v. 168, p. 105580, 2021.

ZHOU, et al. Antioxidant activities of Clerodendrum cyrtophyllum Turcz leaf extracts and their major components. **PLoS one**, v. 15, n. 6, p. e0234435, 2020.

ZHUANG, et al. Age-related accumulation of advanced oxidation protein products promotes osteoclastogenesis through disruption of redox homeostasis. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 12, p. 1160, 2021.

ZIELINSKI, et al. Lipid peroxidation: kinetics, mechanisms, and products. **The Journal of organic chemistry**, v. 82, n. 6, p. 2817-2825, 2017.

ZIMMERMAN, et al. Semen preparation with the Sperm Select system versus a washing technique. **Fertility and sterility**, v. 61, n. 2, p. 269-275, 1994.

ŽIVANČEVIĆ, et al. Integrative investigation of hematotoxic effects induced by low doses of lead, cadmium, mercury and arsenic mixture: In vivo and in silico approach. **Science of The Total Environment**, v. 930, p. 172608, 2024.

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de ética em pesquisa com animais



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Bociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 26 de julho de 2022

Ofício nº 49/22

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Vera Lúcia de Menezes Lima**
 Departamento de Bioquímica
 Processo nº 0012/2021

Certificamos que a proposta intitulada "**Atividades biológicas de extrato de Cenostigma microphyllum.**" Registrado com o nº 0012/2021 sob a responsabilidade de **Prof. Vera Lúcia de Menezes Lima** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 26/07/2022

Finalidade	(<input type="checkbox"/> Ensino (<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica)
Vigência da autorização	01/09/2021 ate 31/12/2023
Espécie/linhagem/raça	Mus musculus (Camundongo Albino Swiss)
Nº de animais	111
Peso/Idade	30 - 35 g / 8 a 14 semanas
Sexo	(111) Macho
Origem: Biotério de Criação	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Bioquímica

Atenciosamente

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691