

Viviana Andreia Bastos Rodrigues

Mecanismos de destoxificação do dimetilmercúrio

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2011

Viviana Andreia Bastos Rodrigues

Mecanismos de destoxificação do dimetilmercúrio

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2011

Viviana Andreia Bastos Rodrigues

Mecanismos de destoxificação do dimetilmercúrio

"Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre em Ciências farmacêuticas “

Sumário

O mercúrio (Hg^{2+}) é tóxico devido à ligação covalente que estabelece com os grupos tiol das várias enzimas nos microsomas e mitocôndria. Essa ligação tem como consequência a interrupção do metabolismo e da função celular. Existem vários mecanismos de destoxificação, entre os quais inclui-se a redução do Hg iônico (Hg^{2+}) a Hg^0 . Este processo é realizado por um conjunto de enzimas codificadas pelo operão *mer*: a MerB que substitui os grupos metilo do metilmercúrio por tiolatos, a MerA que reduz o Hg^{2+} a Hg^0 e MerC, MerF e MerE que assumem um papel no transporte de Hg^{2+} do periplasma para o citoplasma. Neste trabalho fez-se um estudo computacional do mecanismo reaccional de MerB. Concluiu-se que a adição do primeiro tiolato é um passo limitado por difusão, e que a entrada do novo tiolato não é possível a velocidades compatíveis com as observadas na enzima. Portanto a reacção deve ocorrer com a adição de um tiolato e um tiol ao Hg e não com dois tiolatos.

Abstract

Mercury (Hg^{2+}) is toxic because it establishes covalent bonds with the thiol groups present in enzymes from microsomes and mitochondria. These covalent bonds lead to loss of function and interruption of metabolism and cell function. Several detoxification mechanisms exist, such as the reduction of ionic Hg to Hg^0 . This process is catalyzed by a set of proteins encoded by the *mer* operon: MerB replaces the methyl groups in methylmercury by thiolates, MerA then reduces Hg^{2+} to $\text{Hg}(0)$ and MerC, MerF and MerE play roles in Hg^{2+} transport from the periplasm to the cytoplasm. In this work a computational study of the reaction mechanism of MerB was performed. It can be concluded that addition of the first thiolate is a diffusion-controlled step, and that the addition of a second thiolate is not possible at rates compatible to those observed in the enzyme. The reaction must therefore proceed through the addition of a thiolate and a thiol to Hg, rather than two thiolates.

Dedicatória

Aos meus pais e irmão, pois sem eles nada seria possível, e nada faria sentido.

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Pedro Jorge Araújo Alves da Silva, pela interminável paciência, disponibilidade e todo o apoio fundamental em casa fase do trabalho.

Aos meus pais, por me apoiarem e acompanharem sempre. Pelo amor e amizade, e por serem um pilar e exemplo na minha vida.

Ao meu irmão, por ser uma pessoa única e essencial. Pelo companheirismo e carinho demonstrados dia a dia.

Aos meus amigos, pela amizade e apoio sempre disponível.

Índice:

Sumário	i
Abstract	i
Dedicatória	ii
Agradecimentos.....	iii
Índice de figuras	v
Índice de tabelas	v
I) Introdução.....	1
II) Material e métodos	13
III) Resultados	15
IV) Discussão	26
V) Conclusão.....	29
VI) Referências bibliográficas	30

Índice de figuras

Figura 1 - O ciclo biogeoquímico do mercúrio.....	4
Figura 2 - Funções das Mer.....	9
Figura 3 - Mecanismo de MerB	11
Figura 4 - Estrutura do Reagente.....	15
Figura 5 - Estrutura do Intermediário 1.....	16
Figura 6 - Estrutura do TS2.....	17
Figura 7 - Estrutura do intermediário 2.....	18
Figura 8 - Estrutura do TS3.....	19
Figura 9 - Estrutura do intermediário 3.....	20
Figura 10 - Estrutura do TS2a.....	22
Figura 11 - Estrutura do intermediário 2a	23
Figura 12 - Variação da orbital ocupada de mais alta energia do Reagente até ao TS2.....	24
Figura 13 - Variação da orbital ocupada de mais alta energia do Reagente até ao TS2a.....	25
Figura 14 - Perfil de superfície de energia potencial em solução.....	29

Índice de tabelas

Tabela 1 - Energias calculadas para todas as espécies intervenientes no processo em que a Cys96 é a primeira a desligar-se	21
Tabela 2 - Energias calculadas para todas as espécies intervenientes no processo em que a Cys159 é a primeira a desligar-se	23

I) Introdução

O mercúrio (Hg) é o único metal encontrado na forma líquida em condições de temperatura e pressão normais, formando vapores incolores e inodoros. (Boening, 2000) A poluição do mercúrio suscita uma grande preocupação devido aos efeitos que provoca na saúde decorrentes da exposição ao mercúrio metilado encontrado na água e alimentos aquáticos. (Lin, *et tal.*, 1999)

O mercúrio está presente no ambiente devido a vários factores. Existem as fontes artificiais e naturais. As fontes artificiais são mais diversificadas: estas incluem a entrada do mercúrio para a atmosfera através da queima de combustíveis fósseis, incineração ou eliminação de outros produtos, tais como baterias, restaurações dentárias e os eléctrodos utilizados no processo de cloro-álcali (electrólise do cloreto de sódio em solução aquosa). (Barkay *et al.*, 2003) Alguns compostos de mercúrio são usados como fungicidas na agricultura e numa variedade de aplicações no exército, pilhas, odontologia e medicina. Na sua forma natural o mercúrio surge da degradação da crosta terrestre a partir de vulcões e provavelmente pela evaporação a partir de oceanos. (Boening, 2000)

No estado líquido o Hg é muito pouco absorvido pelo tracto gastrointestinal, portanto não é considerado nocivo se ingerido, embora no estado gasoso possa facilmente atravessar a membrana alveolar até atingir a circulação sanguínea. (WHO, 2003)

O mecanismo de toxicidade do mercúrio baseia-se essencialmente na ligação covalente entre o mercúrio e os grupos tiol das várias enzimas nos microssomas e na mitocôndria. Essa ligação tem como consequência a interrupção do metabolismo e da função celular. As proteínas que têm grupos tiol tanto existem nas membranas extracelulares como nas intracelulares. Através das alterações no estado dos tióis intracelulares, o mercúrio pode induzir a peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e mudanças no metabolismo do grupo heme. (Marcelo, *et al.*, 2005)

Há vários mecanismos de toxicidade do mercúrio como inactivar várias enzimas, proteínas estruturais ou processos de transporte, e alteração da permeabilidade da membrana celular pela formação de mercaptides. Para aumentar mais a toxicidade do mercúrio, embora com menor afinidade pode-se ligar aos grupos amida, amina, fosforilo e carboxilo das enzimas. (Guzzi, *et al.*, 2008)

Existe uma variedade de alterações induzidas pelo mercúrio que podem ocorrer individualmente ou em conjunto, como: inibição da polimerização e formação de microtúbulos, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, interrupção da síntese de proteínas, defeito na transmissão sináptica, paragem da replicação do DNA, interferência na actividade da DNA polimerase, na fosforilação-desfosforilação, desregulação do sistema imunitário e mudança da homeostase do cálcio. (Zahir, *et al.*, 2005) O mercúrio origina uma depleção dos níveis de superóxido dismutase, glutatona, catalase e glutatona peroxidase, o que confere uma menor protecção das células em relação ao fenómeno de stress oxidativo. (Zahir, *et al.*, 2005)

A exposição crónica a baixas concentrações de metais pesados, incluindo o mercúrio, resulta em disfunções imunológicas, que podem desencadear deficiências imunorregulatórias. O mercúrio pode ser capaz de desencadear doenças imunológicas, como a doença auto-imune, ou promover infecção crónica. Estudos indicam que a apoptose de linfócitos e monócitos induzida pelo mercúrio tem um papel importante na disfunção imune causada por este metal. (Ben-Ozer, *et al.*, 2000) (Shenker, *et al.*, 2000)

O mercúrio possui efeitos teratogénicos e na reprodução. O metilmercúrio da mãe passa para o feto através da placenta. O mercúrio inorgânico, como tem menor capacidade de atravessar a barreira placentária, encontra-se em maior quantidade no líquido amniótico, e é também transportado pelo leite materno. Os compostos de mercúrio, principalmente os orgânicos, causam danos severos no desenvolvimento do feto, sobretudo a nível neurológico. (Schuurs, 1999)

A exposição pré-natal a compostos de mercúrio orgânico conduz a defeitos no desenvolvimento cerebral. Estes são tanto mais intensos quanto maior a exposição. (Schuurs, 1999)

Na reprodução o mercúrio pode influenciar o status hormonal, causando um ciclo menstrual irregular e menos ovulações (Gerhard, *et al.*, 1992). Outros autores ponderam que o mercúrio afecta as glândulas adrenais causando um distúrbio no ciclo menstrual. (Schuurs, 1999)

O mercúrio induz citotoxicidade que leva à redução da função das células linfóides. Linfócitos e monócitos tratados com mercúrio, tanto orgânico como inorgânico, apresentam sinais funcionais e morfológicos de morte celular, como exemplo há um profundo decréscimo na produção de adenina, alteração na síntese de fosfolípidos e aumento dos iões cálcio. Com estas alterações as células manifestam mudanças nucleares e membranares. Estas mudanças são consideradas características de uma célula em processo de morte celular programada, portanto as células linfóides morrem por apoptose devido a serem tratadas com mercúrio. (Guo, *et al.*, 1998)

A genotoxicidade é outra consequência do mercúrio. Estudos efectuados em plantas e animais comprovaram que o mercúrio inibe a formação do fuso mitótico, conduzindo a uma distribuição anormal dos cromossomas e poliploidia. A inibição é possível devido à forte afinidade do mercúrio pelos grupos sulfidrilo que se encontram nas proteínas do fuso, e esta é considerada a acção mais típica dos compostos mercúrio a nível genético. (Bucio, *et al.*, 1999)

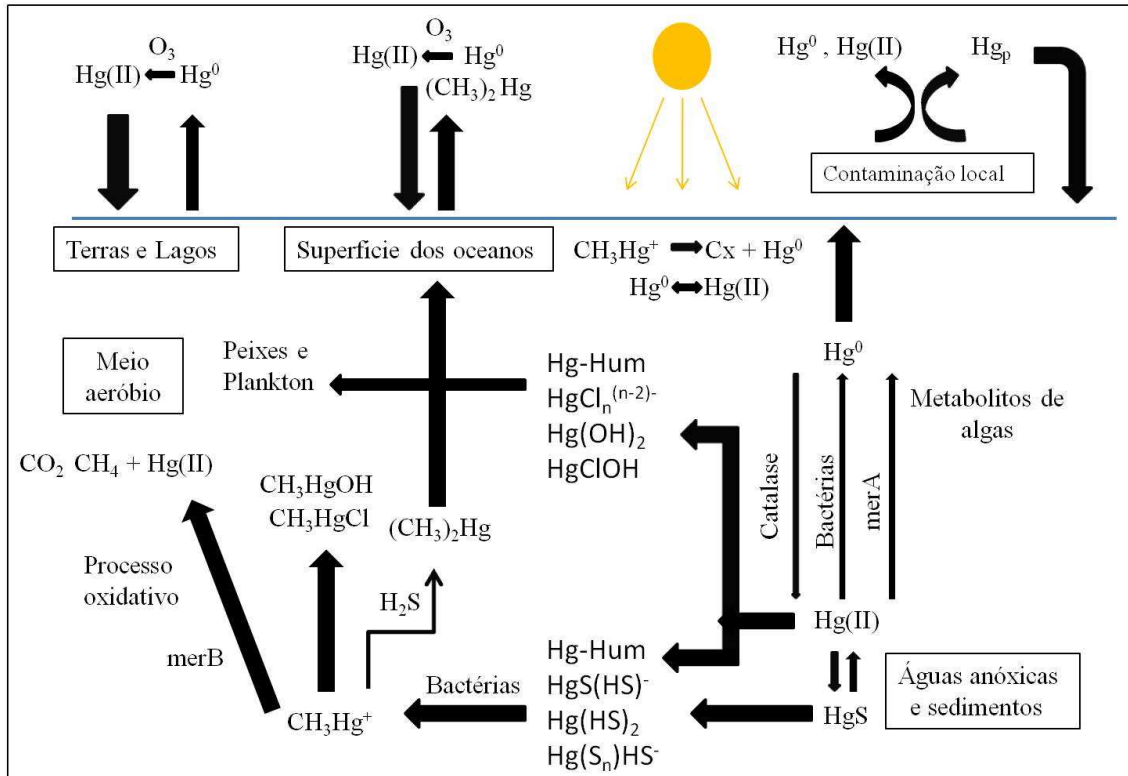


Figura 1 - O ciclo biogeoquímico do mercúrio

(Adaptado de Barkay *et al.*, 2003)

O mercúrio sofre metilação pela acção de microorganismos (bactérias) e dá origem a formas muito tóxicas, o metilmercúrio e o dimetilmercúrio. (Boening, 2000) A metilação do mercúrio, embora este se encontre no ambiente em formas inorgânicas, é feita através dos processos naturais bióticos e abióticos que podem sintetizar o metilmercúrio e este acumula-se devido a ser menos degradado por outros processos tanto bióticos como abióticos. A descoberta da metilação do mercúrio através de microorganismos em sedimentos anaeróbicos levou à conclusão que metilcorrinoídes (Vitamina B₁₂) eram os agentes mais prováveis com capacidade para transferir CH₃⁻ para Hg²⁺. À investigação sobre os produtores de corrinoídes anaeróbicos, incluindo metanogénios, seguiu-se a descoberta de que muitas bactérias podem metilar o Hg²⁺ em culturas de laboratório. Foram feitas experiências com sedimentos anaeróbicos usando inibidores metabólicos específicos e substratos implicando bactérias redutoras de sulfato

(BRS) como os principais metiladores em sedimentos naturais anaeróbicos. Combinando espécies químicas de Hg com medições da taxa de metilação mostrou-se que HgS neutra é o substrato para a metilação por BRS. Estudos feitos à metilação através de extracto celular bruto de *Desulfovibrio desulfuricans* mostrou que qualquer grupo metilo originado pelo C₃ da serina ou pela via acetil-CoA, via CH₃-tetraidrofolato (MeTHF) para metilcobalamina, é seguido pela metilação enzimática do mercúrio. A noção de que o mecanismo de síntese microbiana de MeHg é através de catálise enzimática em vez de uma transferência espontânea de CH₃ a partir da metilcobalamina, foi reforçada por um resultado positivo na correlação da transformação dependente de Hg²⁺ de MeTHF para THF no solo e em extractos de sedimentos com concentrações *in situ* de MeHg. A produção de dimetilmercúrio através do monometilmercúrio em ambientes ricos em H₂S pode ser o mecanismo realizado pelas BRS do dimetilmercúrio durante o crescimento sulfidogénico. Ainda existem bastantes incógnitas quanto à dependência de altos níveis de dimetilmercúrio em fluxos gasosos a partir dos locais de afloramento e na área terrestre para a formação do dimetilmercúrio. (Mason, 1999) A contribuição da metilação abiótica para a produção de metilmercúrio é uma questão que é contestada, e os ácidos húmicos e fúlvicos, ácidos carboxílicos e compostos alquilados de estanho utilizados na agricultura mostraram-se agentes responsáveis pela metilação abiótica do Hg. (Cerrati, 1992) (Barkay *et al.*, 2003)

Há vários mecanismos para a destoxificação do metilmercúrio e dimetilmercúrio, tal como sofrerem uma determinada alteração para diminuir a sua toxicidade. A desmetilação do metilmercúrio pode ocorrer devido à degradação redutiva de MeHg a CH₄ e Hg⁰ (Oremland, *et al.*, 1991), que ocorre devido à acção de proteínas codificadas por operões *mer*. Quando se encontra sob certas condições de desmetilação oxidativa, a degradação do MeHg a CO₂ e uma pequena quantidade de CH₄ ocorre possivelmente como subproduto co-metabólico do metabolismo metilotrófico (Oremland, *et al.*, 1991). A desmetilação oxidativa tal como a metilação é mediada por bactérias anaeróbicas. O mecanismo de desmetilação apesar de não ser totalmente conhecido pode ser análogo à degradação da monometilamina por metanogénios ou à oxidação de acetato pelas BRS (Marvin-Diapsquale, *et al.*, 1998).

É importante a degradação do metilmercúrio, tanto por oxidação como por redução em sedimentos anaeróbios. A redução, processo mediado pelo operão *mer*, resulta na remoção de Hg do sedimento como vapor elementar monoatômico. Em contrapartida, Hg^{2+} , o provável produto da desmetilação oxidativa, é o substrato para a remetilação dentro da colônia de sedimentos, portanto para haver um ciclo metilação-desmetilação não é necessário existir o processo mediado pelo operão *mer*. Vários estudos ambientais sugerem que o operão *mer* redutor da desmetilação domina em ambientes mais aeróbios com altas concentrações de Hg. A desmetilação oxidativa domina em ambientes mais anaeróbios com baixas concentrações de Hg. Este padrão pode surgir a partir do efeito do oxigênio na indução da expressão do operão *mer*, devido à manifestação do operão *mer* de amplo espectro de um desnitrificador, *Pseudomonas stutzeri* OX. Este foi induzido em concentrações mais inferiores de Hg^{2+} durante um crescimento aeróbio do que durante um crescimento anaeróbio. Portanto a indução condicionada pelo operão *mer* pode afectar seriamente a produção de MeHg em ambientes contaminados com Hg. A degradação abiótica de MeHg, pode ser efectuada pela luz solar, especificamente UV-A e UV-B, abrangendo um comprimento de onda entre 280-400 nm, e este processo é inibido por agentes sequestrantes de oxigênio. Incubações no escuro, na água do lago, tinham uma concentração de MeHg 350 vezes maior do que uma incubação com luz. Foi relatado por Suda *et al* (Suda, *et al.*, 1993) a produção de Hg inorgânico a partir de MeHg durante a fotodegradação, e que Hg^0 foi identificado como o principal produto da fotodegradação em zonas húmidas. Em ambientes expostos à luz, tais como pântanos e lagos, e especialmente em baixas concentrações de Hg total, a fotodegradação pode ser o principal mecanismo para a degradação de metilmercúrio. Nos sedimentos e águas mais profundas, onde o metilmercúrio se acumula após metilação, a fotodegradação pode ter pouco impacto sobre a desmetilação, e os processos microbianos redutores ou oxidativos vão ser os que dominam. (Barkay *et al.*, 2003)

Outro mecanismo de destoxificação é a redução do mercúrio iónico, Hg^{2+} , a Hg^0 . Esta redução ocorre em ambientes de águas naturais e nos solos, que resulta na volatilização do Hg^0 , pois devido ao seu coeficiente de partição o Hg^0 é muito volátil e pouco solúvel na água. O principal meio para a redistribuição de Hg pelo ambiente é através da chuva e neve, em grande parte sob a forma iónica sendo altamente disponível

para a redução. A redução do Hg^{2+} depositado a Hg^0 transporta de novo Hg para a atmosfera e assim impede a sua precipitação e a fixação de sedimentos profundos onde este pode ser metilado. Portanto a redução biológica contribui muito para o fluxo de Hg das águas naturais para a atmosfera. No oceano Pacífico, perto da ressurgência equatorial, onde há água rica em nutrientes, há uma supersaturação de Hg^0 . A concentração de Hg^0 nestas águas foi positivamente correlacionada com a produtividade biológica (Kim, *et al.*, 1986). A volatilização do Hg das águas naturais é inibida por filtração ou autoclavação, o que indica que é um processo biótico. Os ambientes altamente contaminados com Hg^{2+} provocam o enriquecimento de populações de bactérias resistentes e induzem a redução mediada pelo operão *mer*. No entanto, as concentrações de Hg na maioria dos ambientes naturais, incluindo aqueles onde ocorre bioacumulação de metilmercúrio, estão dentro do intervalo 10^{-15} a 10^{-12} . Apesar de em condições oligotróficas, a expressão de fusões transcricionais *mer-lux* poder ser induzida com concentrações de Hg^{2+} abaixo de 10^{-12} , é possível que esta seja ineficiente. (Barkay *et al.*, 2003)

Além das reductases de Hg^{2+} bacterianas, algumas algas reduzem Hg^{2+} quer por processos dependentes da luz ou independentes desta. A última transformação pode ser mediada por metabolitos extracelulares em vez de uma actividade enzimática específica (Devars, *et al.*, 2000). Quanto ao processo abiótico, Hg^{2+} pode ser reduzido por transformações fotoquímicas ou reacções no escuro. No que toca à fotorredução de Hg^{2+} , esta ocorre devido a radicais livres orgânicos produzidos por fotólise do carbono orgânico dissolvido, oxigénio dissolvido, complexos de carbono orgânico, e compostos orgânicos de Fe^{3+} de coordenação ácida. As reacções no escuro que reduzem o Hg^{2+} podem ocorrer devido à presença de ácidos fúlvicos e húmicos associados a radicais livres. Hg^0 está em equilíbrio com Hg(I) e Hg^{2+} , e o estado Hg(I) é favorecido a menos que haja ligantes que favoreçam fortemente o estado Hg^{2+} . (Barkay *et al.*, 2003)

A oxidação de Hg^0 é a etapa menos explorada no ciclo biogeoquímico do mercúrio. Smith *et al* demonstraram a oxidação de Hg^0 por hidroperoxidases bacterianas, KatG e em menor grau KatE, em *E. coli*. (Smith, *et al.*, 1998). O duplo mutante, sem as duas enzimas, manteve um nível baixo de oxidação de Hg^0 , sugerindo a existência de outras oxidases bacterianas Hg^0 . As bactérias aeróbias do solo, como por

exemplo bacilos, tinham altos níveis de actividade oxidativa de Hg^0 , sugerindo um papel importante para a oxidação microbiana no ciclo de Hg no ambiente. É importante ter atenção que em todos os casos, a taxa de oxidação de Hg^0 nestas estirpes sensíveis a Hg^{2+} , é pelo menos dez vezes inferior à taxa de redução de Hg^{2+} mediada pela MerA, portanto a oxidação mediada pela hidroxidase não gera um ciclo fútil dentro de uma célula HgR (Hg resistente). Também foi demonstrada uma relação entre a actividade da oxidase Hg^0 , medida pela acumulação de Hg^{2+} , após incubação de extractos proteicos da biomassa microbiana do lago com água saturada de Hg^0 e a taxa de acumulação de mercúrio gasoso, principalmente Hg^0 , na água do lago. A oxidação abiótica de Hg^0 para Hg^{2+} ocorre na atmosfera, nas águas naturais e nos solos. O Hg^{2+} iónico é rapidamente absorvido pela chuva, neve e nas partículas do ar. A oxidação de Hg^0 aumenta a deposição de Hg na atmosfera. Este processo de deposição resultou na definição de diversos caminhos para a oxidação fotoquímica. Os mecanismos de oxidação de Hg^0 em água naturais e solos não tem sido muito investigado, mas este processo pode afectar criticamente a produção de MeHg por aumentar a concentração de Hg^{2+} . A fotooxidação de Hg^0 é mediada pelo O_2 , na presença em excesso de cloreto, por peróxido de hidrogénio, ozono, compostos sulfidrílo e por os radicais livres $\text{BrO}\cdot$, $\text{Br}\cdot$ e $\text{Cl}\cdot$. Também é mediada por UV-B na presença de Cl_2 e compostos fotoreactivos como benzoquinona. Um vez que as mesmas biotransformações que constituem o ciclo biogeoquímico de Hg podem ter lugar dentro do corpo humano devido a exposição não ocupacional, a compreensão dessas transformações externas e processos de transporte serão uma ajuda no controlo da intoxicação por Hg em humanos. (Barkay *et al.*, 2003)

Com uma excepção todos os processos bióticos que transformam mercúrio são reacções colaterais acidentais de redução e metilação da fisiologia normal. Essa excepção é o fenómeno amplamente distribuído de especificações de resistência e transformação de compostos de mercúrio com o operão *mer*. (Barkay *et al.*, 2003)

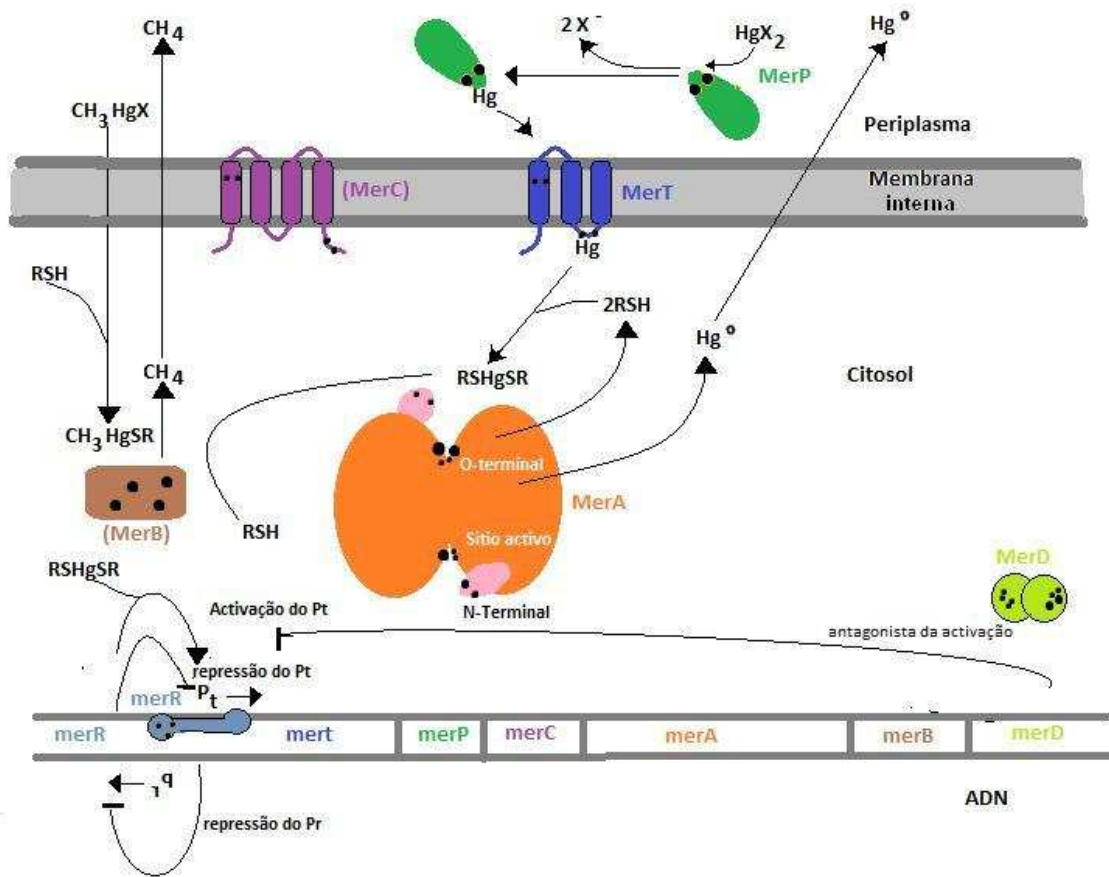


Figura 2 - Funções das Mer

(Adaptado de Barkay *et al.*, 2003)

Na regulação, transporte e resistência do mercúrio há vários intervenientes que tornam possível a destoxificação do dimetilmercúrio. Na regulação intervêm a proteína metal reactiva MerR que se liga a uma região de simetria dupla chamada MerO (operador), logo acima do gene MerT. MerO situa-se entre os sítios de reconhecimento - 10 e - 35 de RNA polimerase para o promotor dos genes estruturais (P_t). O promotor de MerR (P_r) lê divergências do P_t e sobrepõe-se com ele tão amplamente que quando MerR ocupa o lugar de MerO, impede a RNS polimerase de transcrever o gene MerR, portanto MerR é um auto regulador negativo. MerR atrai a RNA polimerase ao promotor P_t mesmo na ausência de indutor de iões metálicos e também dobra o promotor DNA longe da polimerase. Quando o Hg^{2+} está presente, este liga-se a MerR

provocando uma alteração alostérica na proteína que é propagada para o DNA da região do operador. Como consequência há uma melhoria do acesso da RNA polimerase para o início da transcrição. MerD, é uma proteína que também intervém devido a ser um antagonista da função de MerR, podendo substituí-la ao ocupar o lugar de MerO. No transporte actua a MerP, que é uma proteína que funciona como um monómero e liga um único íon Hg^{2+} através dos seus dois resíduos de cisteína nas posições 14 e 17. MerP não é essencial para Hg^{2+} , pois como captação MerT é suficiente, visto que MerT é outro transportador central de Hg^{2+} tanto em bactérias Gram-negativas como Gram-positivas. MerC é uma proteína que está ligada à membrana com quatro hélices transmembranares, o que a torna a maior, também existindo a MerF e MerE, todas assumindo um papel no transporte de Hg^{2+} , do periplasma para o citoplasma. (Barkay *et al.*, 2003)

Por fim existem duas enzimas no mecanismo de resistência do mercúrio, MerA e MerB, ambas muito importantes no ciclo no mercúrio. MerA é uma enzima que catalisa a conversão de Hg^{2+} a Hg^0 , para tal utiliza como fonte de electrões, o NADPH, abundante no citoplasma. A MerA tem propriedades bioquímicas semelhantes á família oxidoreductases de dissulfureto e nucleótidos de pirimidinas (Fox, *et al.*, 1982). Essas semelhanças são sequências peptídicas confirmadas pela presença de um local homólogo altamente activo, que juntamente com duas cisteínas formam um par redox-activo dissulfido/ditiol característico. Alguns membros da família usam este par de cisteínas para catálise e são inibidos quando Hg^{2+} se liga a eles, já MerA tem características estruturais adicionais que ajudam a evitar essa inibição, tal como uma curta extensão C-terminal e uma longa extensão N-terminal. (Barkay *et al.*, 2003)

A MerB tal como a MerA situa-se no citoplasma e tem uma tolerância de substrato muito ampla, tanto a manipulação alquil como mercuriais arila, tendo preferência para os últimos, e como MerB é um catalisador o pH óptimo é superior a 9. Foram feitas análises que declaram MerB como uma enzima única, sem homólogos conhecidos, e com uma evolução em vários grupos distintos. Na estrutura de MerB constam três cisteínas nas posições 96, 117 e 159. Devido à sua alta exigência de tióis, esta é uma enzima citosólica sem ligações dissulfito. Para exercer o papel catalítico são

essenciais as Cys96 e Cys159, enquanto a Cys117 tem um papel estrutural. MerB funciona igualmente com tióis fisiológicos (glutationa e cisteína). (Barkay *et al.*, 2003)

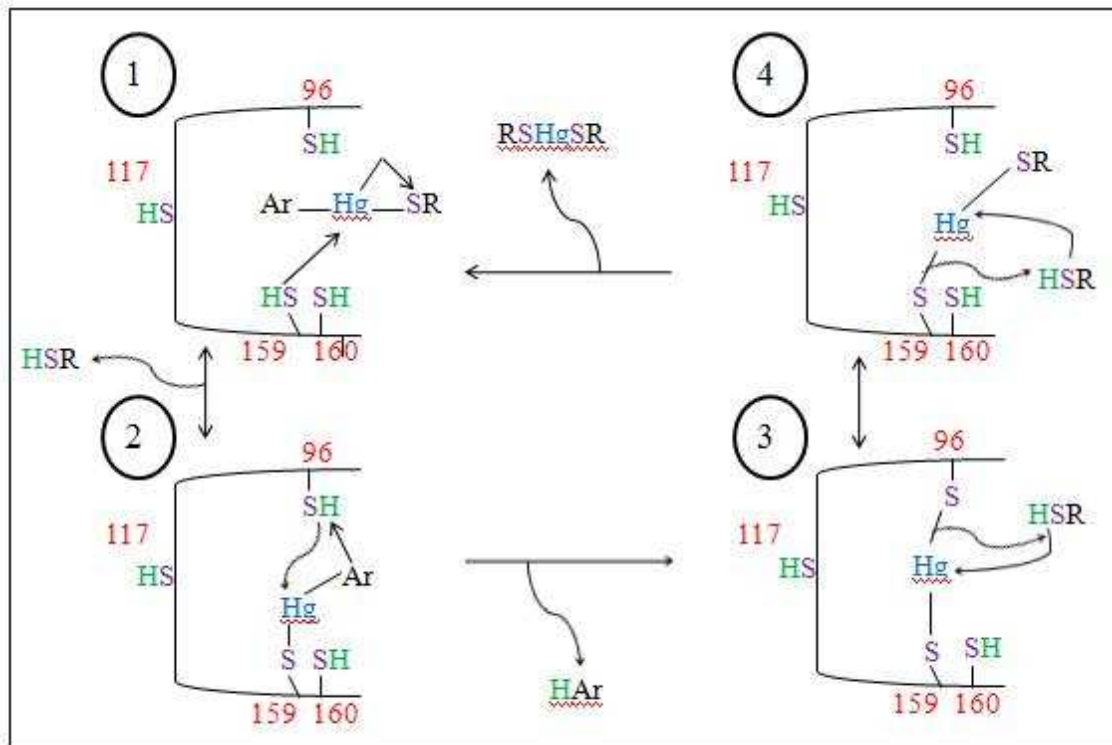


Figura 3 - Mecanismo de MerB

(Adaptado de Barkay *et al.*, 2003)

Na figura acima está descrito o mecanismo de MerB. Na etapa 1 uma cisteína (inicialmente identificada como a Cys159) da enzima totalmente reduzida, ataca o MeHgSR, libertando um tiol e constituindo uma estrutura bi-coordenada com o arilo mercurial (molécula organomercurial composta, como o acetato defenilmercúrio acetato) (intermediário 2). Um próton pode ser doado para esta estrutura bi-coordenada pela Cys96 ou por outros resíduos protonados da MerB, como a Tyr93, que é altamente conservada. MerB fica então ligada ao Hg²⁺ (etapa 3) até dois monotiois poderem removê-lo (etapa 4). Este mecanismo foi já estudado (até ao passo 3) por Parks e colaboradores. (Parks, *et al.*, 2009) O estudo que estes autores realizaram teve como

objectivo comparar dois mecanismos principais para a protonólise de Hg-C catalisada pela liase organomercurial (MerB). Os cálculos sugeriram que a formação inicial do aducto metilmercúrio quer com a Cys96 ou Cys159 é energeticamente viável. Os resultados determinam que a coordenação do R-Hg²⁺ por duas cisteínas é necessária e suficiente para activar a ligação Hg-C para a protonólise. Estes resultados demonstram que a MerB baixa a energia de activação da protonólise Hg-C através de redistribuição de carga em direcção ao grupo abandonante (CH₃⁻) e para longe do protão catalítico. (Barkay *et al.*, 2003)

A MerB é inibida pelo ditiotretol (TDT), provavelmente devido à formação um complexo tri-coordenado estável com o produto Hg²⁺ e uma das cisteínas da MerB. Esta inibição pode ser lentamente revertida por uma cisteína ou glutatona. (Barkay *et al.*, 2003)

Neste trabalho estudaram-se por métodos computacionais as fases seguintes do mecanismo, i.e., a remoção do Hg²⁺ da enzima por tióis provenientes do ambiente celular.

II) Material e métodos

O mecanismo dos passos finais da reacção catalisada pela MerB foram estudados com o funcional de densidade B3PW91 (Becke, 1993 e Perdew, 1991), usando o potencial efectivo de cerne SDD para o átomo de Hg e a base de funções 6-31G(d). A superfície de potencial foi explorada com conveniente caracterização de todos os intermediários, estados de transição e produtos. O modelo usado inclui cadeias das cisteínas 96 e 159, aspartato 99, Hg^{2+} e uma molécula de água. A cisteína 117 não é essencial para a actividade, portanto não é incluída no modelo (Parks, *et al.*, 2009). As cisteínas foram simuladas por $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$ (etanotiol), o aspartato foi representado por CH_2COO^- (acetato) e o tiolato ambiental como CH_3S^- (metano tiolato). Foram utilizadas coordenadas deslocalizadas auto geradas para as optimizações da geometria (Baker, *et al.*, 1996).

As energias mais precisas das geometrias optimizadas foram calculadas com um conjunto de funções de base 6-311+G(d) para todos os átomos excepto o mercúrio, para o qual foi utilizado o potencial efectivo de cerne SDD. (Andrae, 1990). A energia do ponto zero e os efeitos térmicos ($T = 298.15 \text{ K}$ e $P = 1 \text{ bar}$) foram avaliados utilizando um factor de escala de 0,9804 para as frequências calculadas. (Silva, *et al.*, 2008). As energias mencionadas no texto foram calculadas pela aplicação do modelo PCM ($\epsilon=4$) em geometrias optimizadas em fase gasosa. Efeitos de dispersão e repulsão foram avaliados como descrito por Amovilli e Mennucci. (Amovilli, *et al.*, 1997) Cargas atómicas e distribuições de densidade spin foram calculadas com base numa análise populacional de Mulliken (Mulliken, 1995), em orbitais simetricamente ortogonalizados. (Löwdin, 1970) Todos os cálculos foram realizados com o software Firefly (Alex Granovsky, Universidade Estatal de Moscovo).

A partir das energias de activação é possível calcular a constante cinética da reacção (k) utilizando a equação de Eyring:

$$k = \frac{kT}{h} e^{-\Delta G^*/RT}$$

com k (constante de Boltzmann), T (temperatura absoluta), h (constante de Planck), ΔG^* (energia de activação) e R (constante dos gases perfeitos). Geralmente as reacções enzimáticas têm energias de activação inferiores a 25 kcal/mol.

III) Resultados

No estado inicial (Reagente) o Hg encontra-se ligado às cisteína 96 e 159 à mesma distância (2.54 Å). O tiolato encontra-se a 4.93 Å do Hg, enquanto as distâncias à água e ao oxigénio do aspartato são 2.33 e 2.47 Å, respectivamente. (Figura 4)

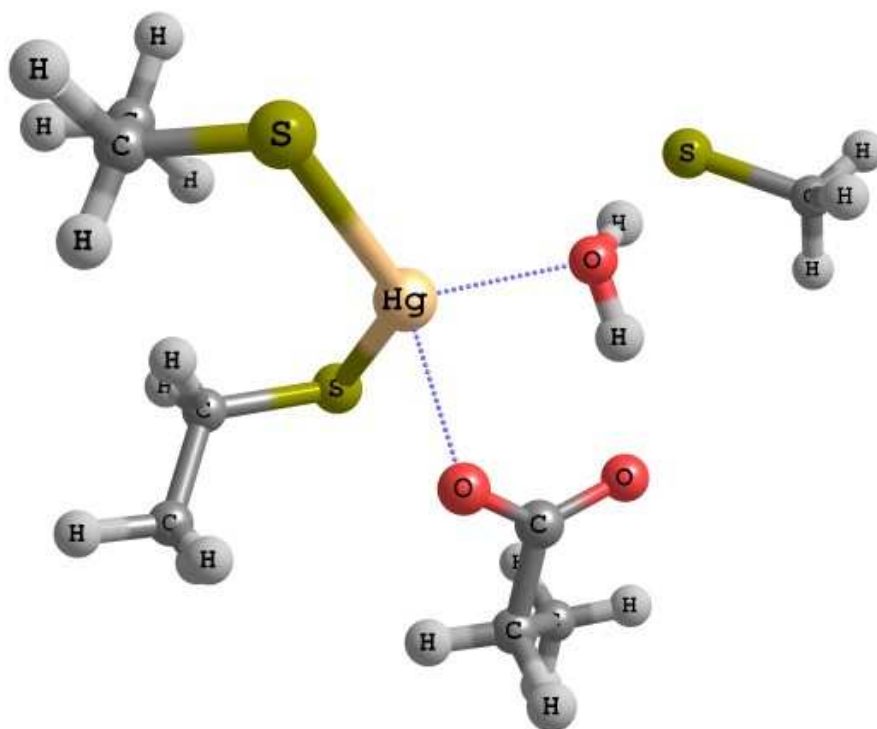


Figura 4 - Estrutura do Reagente

O TS1 não é detectado devido a não existir barreira energética para a adição do tiolato ao mercúrio. No intermediário 1 o tiolato encontra-se ligado ao Hg (2.56 Å), mantendo-se quase inalteráveis as distâncias à cisteína 96 (2.60 Å), 159 (2.62 Å) e ao oxigénio do aspartato (2.52 Å). Com a ligação do tiolato há um afastamento da água que passa a distar 4.41 Å do Hg. Este intermediário encontra-se 8.8 kcal.mol⁻¹ abaixo do reagente em solução e 8.0 kcal.mol⁻¹ em fase gasosa, o que nos indica que a reacção é espontânea. Neste intermediário a carga formal no tiolato é 0,5 cargas electrónicas (C.E.) superior à do reagente. Simultaneamente verifica-se que, quer o Hg quer o oxigénio da água, possuem uma carga 0,2 C.E. inferior à original. (Figura 5)

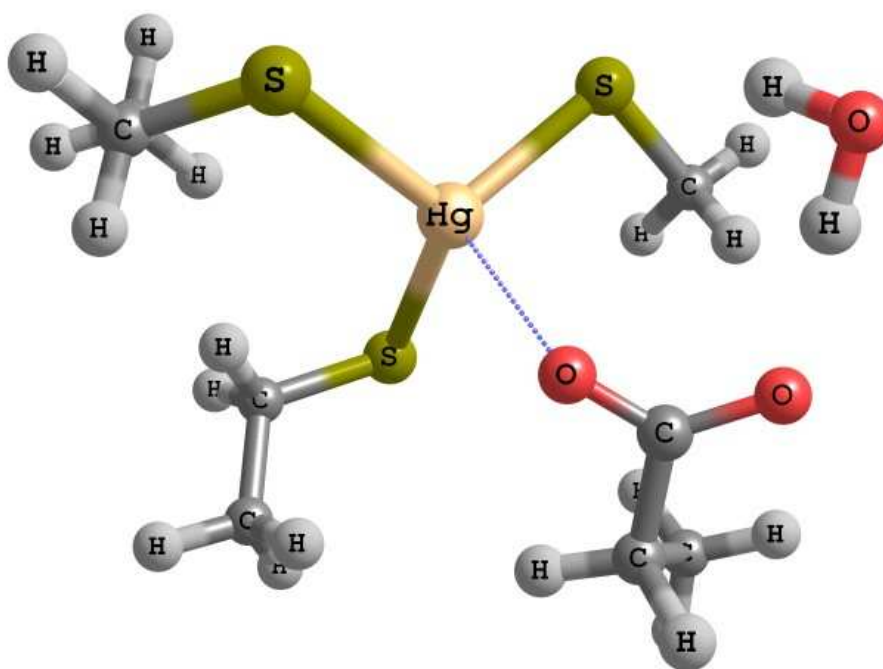


Figura 5 - Estrutura do Intermediário 1

Existem duas possibilidades no seguimento da reacção: o Hg pode-se desligar primeiro da Cys96 ou da Cys159. No TS2 detecta-se a saída da Cys96. Como consequência há um afastamento do enxofre desta ao Hg (3.97 Å). As distâncias à Cys159 (2.53 Å), ao enxofre do tiolato (2.49 Å), à água (3.40 Å) e ao aspartato (2.38 Å) não sofrem alteração significativa. Este estado de transição encontra-se 17.2 kcal.mol⁻¹ acima do intermediário 1 em solução e 17.1 kcal.mol⁻¹ em fase gasosa. Como se encontra abaixo das 25 kcal.mol⁻¹ esta barreira não é demasiado elevada. Neste estado de transição a carga desloca-se principalmente do Hg para a Cys96. (Figura 6)

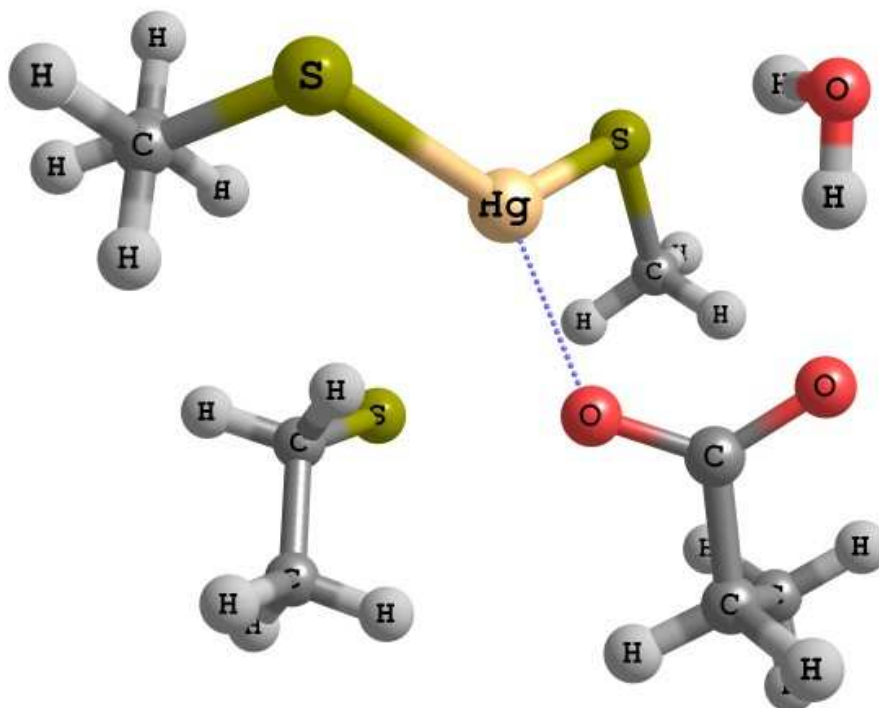


Figura 6 - Estrutura do TS2

No intermediário 2 evidencia-se o afastamento da Cys96, passando a distar 4.68 Å do Hg. As distâncias da Cys159 e do tiolato ao Hg permanecem quase inalteradas, 2.48 Å e 2.50 Å, respectivamente. Há uma diminuição da distância do Hg à água (2.77 Å), enquanto o aspartato se mantém a uma distância próxima da anterior (2.45 Å). Este intermediário encontra-se 14.4 kcal.mol⁻¹ acima do intermediário 1 quer em solução quer em fase gasosa. A reacção não é espontânea. Neste intermediário a distribuição de cargas é bastante semelhante à do TS2, o que indica que o TS2 ocorre numa fase tardia da reacção. (Figura 7)

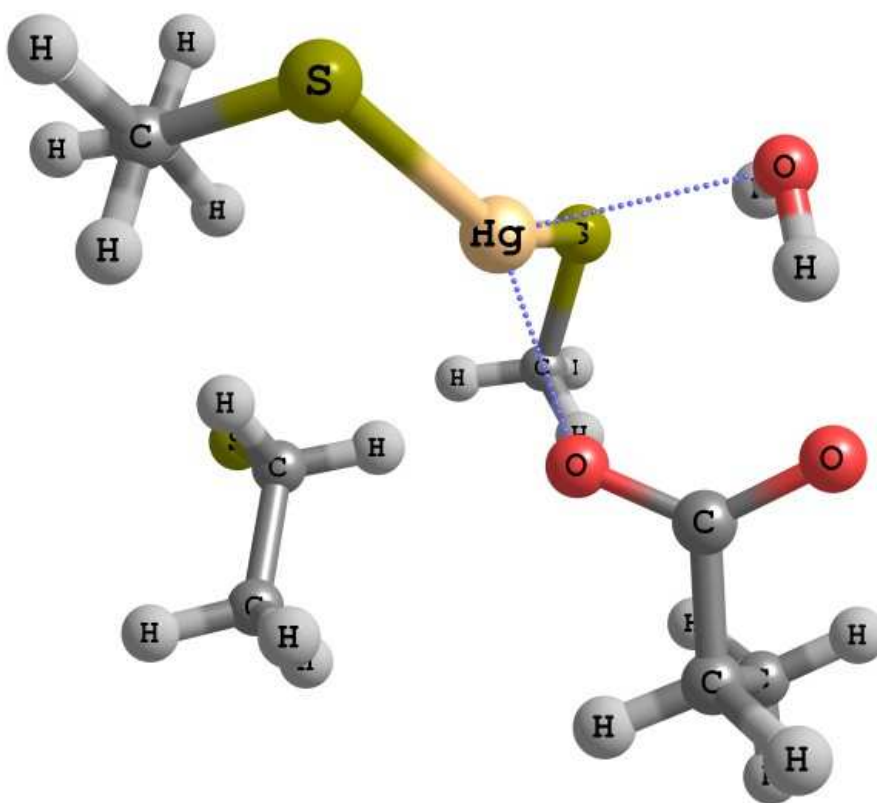


Figura 7 - Estrutura do intermediário 2

No TS3 quando outro tiolato ataca o mercúrio fica a distar do mesmo 4.21 Å. Com a aproximação deste tiolato ao mercúrio há um afastamento evidente da Cys96 (6.23 Å) e uma aproximação expressiva da Cys159 (2.54 Å). As distâncias ao tiolato já existente (2.58 Å), à água (4.58 Å) e ao aspartato (2.34 Å) mantêm-se muito próximas das anteriores. Este estado de transição encontra-se 38.75 kcal.mol⁻¹ acima do

intermediário 2, em solução, e $95.85 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em fase gasosa, o que demonstra claramente que não é uma reacção rápida, pelo contrário, devido a possuir uma barreira energética muito elevada ($> 25 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Verifica-se que a barreira energética é muito superior em fase gasosa, devido a existir uma constante dieléctrica superior em solução, portanto as interacções electrostáticas entre as cargas negativas presentes na Cys96 e no tiolato são menos desfavoráveis em solução. O ataque de um tiolato ao mercúrio já foi avaliado quando passámos do reagente para o intermediário 1 e foi uma reacção espontânea, enquanto neste passo o mesmo ataque tem uma barreira energética muito elevada. Esta diferença nas reacções deve-se à existência da Cys96 livre (com carga negativa). O tiolato que ataca também tem carga negativa, o que leva a uma maior dificuldade na aproximação do tiolato ao mercúrio devido à repulsão que existe entre as cargas negativas. (Figura 8)

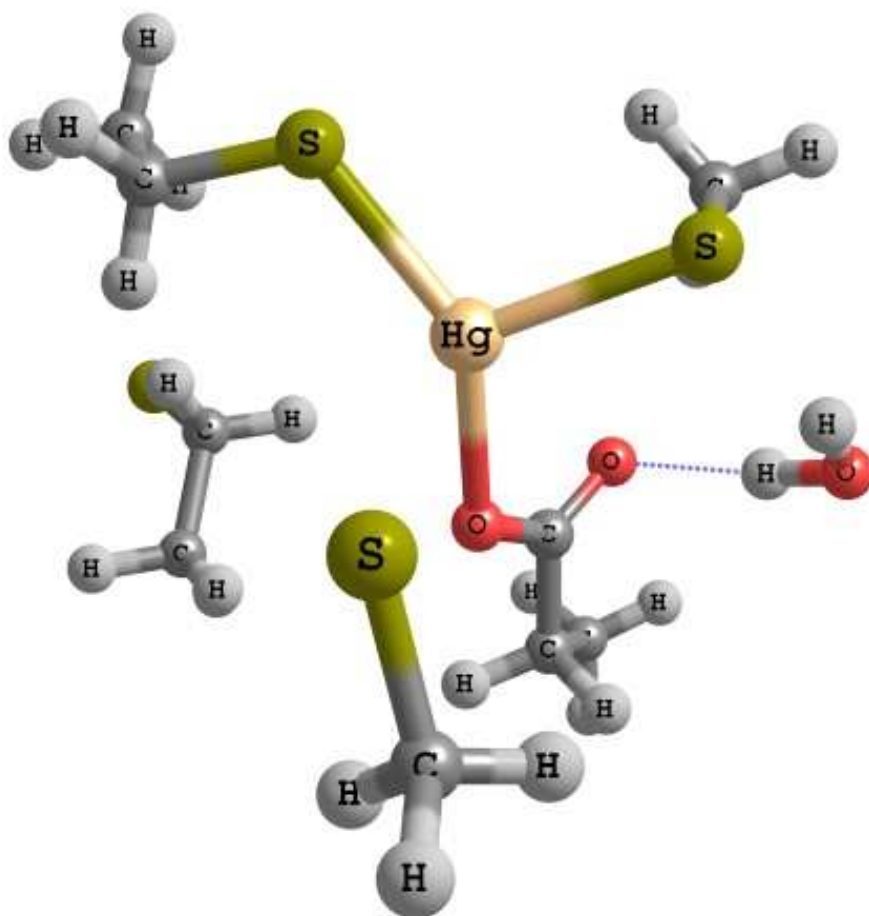


Figura 8 - Estrutura do TS3

No intermediário 3 o novo tiolato liga-se ao Hg (2.56 Å) enquanto a Cys96 mantém o afastamento ao Hg (6.53 Å). A água aproxima-se do Hg (3.82 Å). As distâncias da Cys159 (2.66 Å), do tiolato já existente (2.64 Å) e do aspartato (2.48 Å) ao Hg não variam significativamente. Este intermediário encontra-se 26.4 kcal.mol⁻¹ acima do intermediário 2 em solução e 86.8 kcal.mol⁻¹ em fase gasosa. A reacção não é espontânea. (Figura 9)

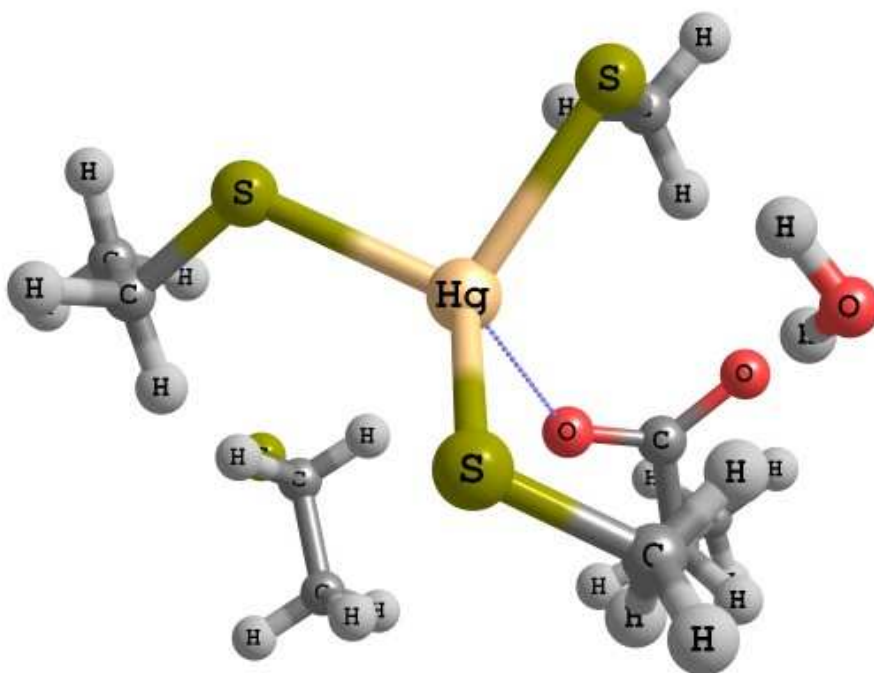


Figura 9 - Estrutura do intermediário 3

Tabela 1 - Energias calculadas para todas as espécies intervenientes no processo em que a Cys96 é a primeira a desligar-se

Passo	Energia final em fase gasosa (hartree)	Energia em Solvente (kcal.mol ⁻¹)	Energia do ponto zero e Energia vibracional (kcal.mol ⁻¹)	Energia total (fase gasosa) (kcal.mol ⁻¹) vs. reagentes	Energia total (em solução) (kcal.mol ⁻¹) vs. reagentes
Reagente	-1890.351904	-1186329.45	132.223	0	0
TS1				indetectado	indetectado
Intermediário 1	-1890.366115	-1186339.18	133.1	-8.04	-8.853
TS2	-1890.342345	-1186324.21	135.315	9.09	8.332
Intermediário 2	-1890.346409	-1186326.83	135.155	6.38	5.552
TS3	-2328.301388	-1461257.51	151.211	102.23	44.30
Intermediário 3	-2328.320627	-1461272.86	154.205	93.16	31.94

Como foi referido anteriormente existem duas possibilidades no seguimento da reacção após o intermediário 1. O TS2a é a segunda possibilidade em que o Hg se desliga primeiro da Cys159. Neste estado de transição a Cys159 afasta-se do Hg (5.12 Å). Distam do Hg a Cys96 (2.47 Å), a água (4.84 Å), o tiolato (2.47 Å) e o aspartato (2.33 Å). Em relação ao intermediário 1, o TS2a encontra-se acima 20.1 kcal.mol⁻¹ em solução e 19.0 kcal.mol⁻¹ em fase gasosa. Comparando o TS2a com o TS2 a diferença evidente é o afastamento da Cys96 no caso no TS2, e da Cys159 no TS2a. A barreira energética no TS2a é ligeiramente superior à do TS2, portanto a reacção do intermediário 1 para o TS2 parece ser mais rápida do que para o TS2a. (Figura 10)

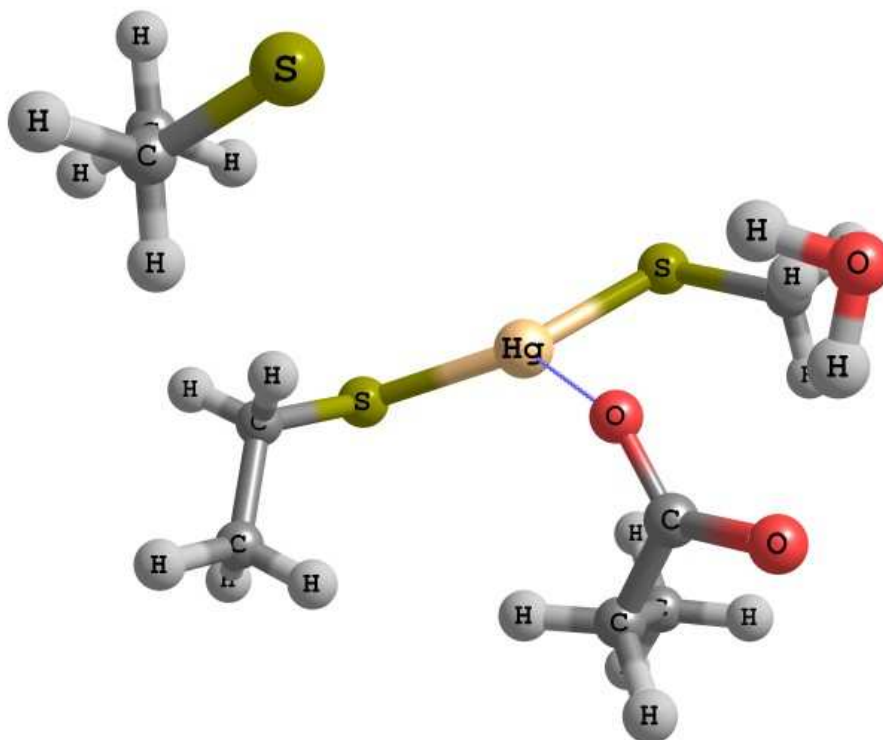


Figura 10 - Estrutura do TS2a

No intermediário 2a evidencia-se o afastamento da Cys159 do Hg (7.45 Å). Os restantes: Cys96 (2.44 Å), tiolato (2.45 Å), água (4.66 Å) e aspartato (2.36 Å), não alteram significativamente a sua distância ao Hg, em relação ao TS2a. Este intermediário encontra-se 11.9 kcal.mol⁻¹ acima do intermediário 1 em solução e 9.9 kcal.mol⁻¹ em fase gasosa. Esta reacção não é espontânea. Comparando o intermediário 2a com o intermediário 2 uma das diferenças marcantes é o afastamento da Cys96 no caso do intermediário 2 e da Cys159 no intermediário 2a. (Figura 11)

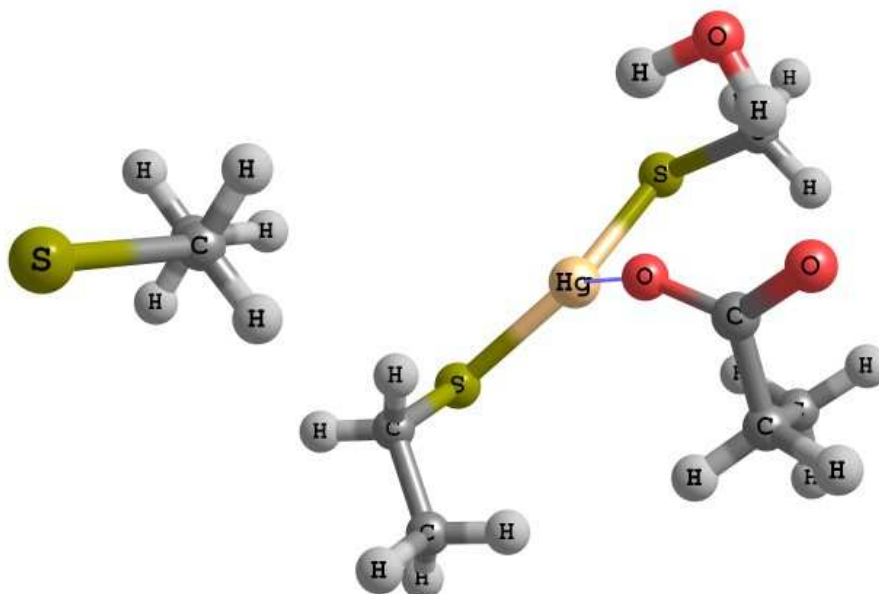


Figura 11 - Estrutura do intermediário 2a

Tabela 2 - Energias calculadas para todas as espécies intervenientes no processo em que a Cys159 é a primeira a desligar-se

Passo	Energia final em fase gasosa (hartree)	Energia em Solvente (kcal.mol ⁻¹)	Energia do ponto zero e Energia vibracional (kcal.mol ⁻¹)	Energia total (fase gasosa) (kcal.mol ⁻¹) vs. reagentes	Energia total (em solução) (kcal.mol ⁻¹) vs. reagentes
Reagente	-1890.351904	-1186329.45	132.223	0	0
TS1				indetectado	indetectado
Intermediário 1	-1890.366115	-1186339.18	133.1	-8.04	-8.853
TS2a	-1890.340733	-1186322.14	136.17	10.96	11.257
Intermediário 2a	-1890.352476	-1186328.64	134.462	1.88	3.049

Não se calculou o passo Int.2a→TS3a→Int.3a pois já sabemos pelo cálculo Int.2→TS3→Int.3 que a entrada do tiolato possui uma elevadíssima barreira energética, devido à aproximação de duas cargas negativas (tiolato e Cys159). Por insuficiência de tempo não foi possível continuar o estudo do mecanismo e avaliar o desempenho deste na presença de um tiol externo em substituição do segundo tiolato.

Analisando a localização das orbitais ocupadas de maior energia, verifica-se que no reagente estas se distribuem no tiolato e na água. Com a passagem para o intermediário1, o tiolato liga-se ao Hg e os electrões passam a distribuir-se pelas ligações ao Hg. Quando se passa do intermediário 1 para o estado de transição 2 (TS2), verifica-se que os electrões que estavam na ligação ao Hg passam a ficar retidos na cisteína 96, sendo que esta se afasta do Hg

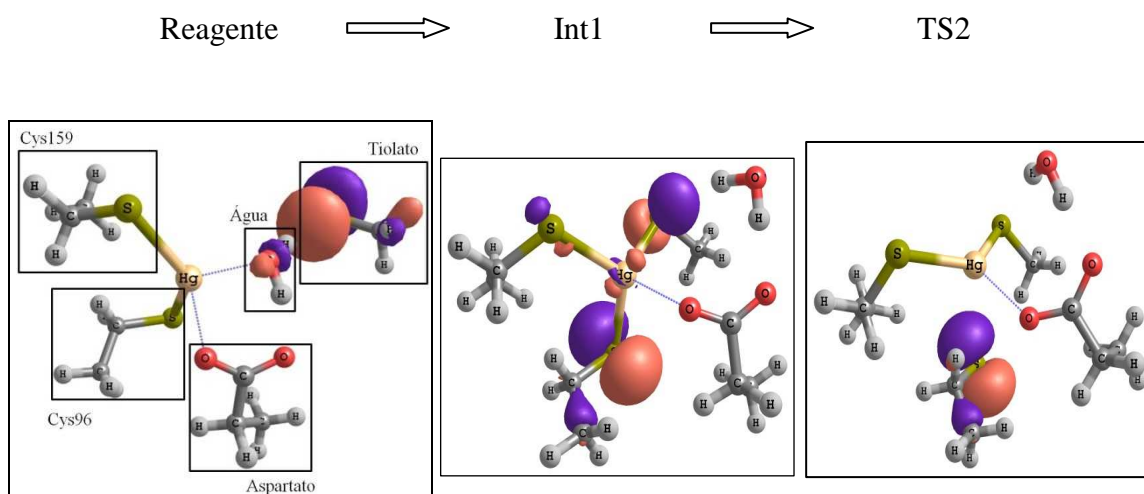


Figura 12 - Variação da orbital ocupada de mais alta energia do Reagente até ao TS2

Do TS2 até ao Int3 não há alteração na distribuição dos electrões, sendo que se mantêm retidos na Cys96.

Em relação à passagem para o TS2a, em que o Hg se desliga primeiro da Cys159 também há alteração significativa no deslocamento das orbitais. Tal como anteriormente, do reagente para o Int1 os electrões passam a distribuir-se nas ligações ao Hg. Na passagem do Int1 para o TS2a, em que há um afastamento da Cys159, os electrões passam a ficar retidos na Cys159.

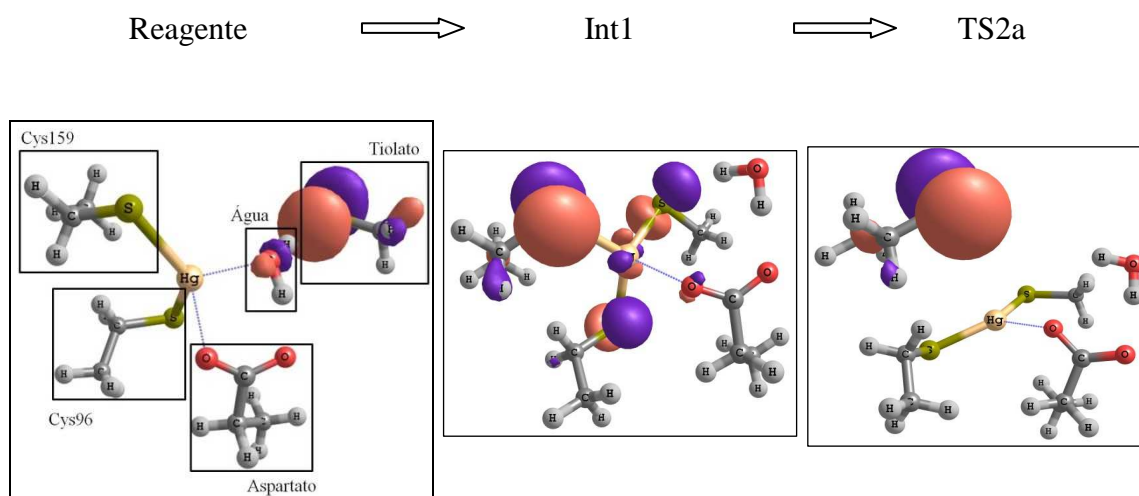


Figura 13 - Variação da orbital ocupada de mais alta energia do Reagente até ao TS2a

Do TS2a para o Int2a não há alteração na distribuição dos electrões, sendo que se mantêm retidos na Cys159.

IV) Discussão

Segundo Clarkson *et al.*, (2006), a biometilação de Hg^{2+} por bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato em sedimentos marinhos, é um exemplo de um processo biótico, em que o catião metilmercúrio é formado. O metilmercúrio entra na cadeia alimentar através de plâncton e a bioacumulação extrema leva a concentrações até 4 ppm, sendo encontrado no final da cadeia alimentar, por exemplo em tubarões. O risco para a saúde humana ocorre principalmente devido ao consumo de peixes de água salgada. Devido a esta preocupação Barkay *et al.*, (2003), evidenciaram a importância da desmetilação do metilmercúrio para a saúde global. Essa desmetilação envolve a acção da MerA e MerB que foi estudada neste trabalho.

Vários estudos químicos em modelos sintéticos permitiram já obter dados essenciais para a compreensão do mecanismo enzimático da MerB. Melnick e Parkin, (2007), usaram o ligando tridentado tris(1-tert-butil-2,3-dihidroimidazol-2-tion-1-il) hidridoborato e sintetizaram os complexos de mercúrio alquila $[(\text{Tm}^{\text{tBu}})\text{HgMe}]$, $[(\text{Tm}^{\text{tBu}})\text{HgEt}]$ e $[(\text{Tm}^{\text{tBu}})\text{HgCH}_2\text{CN}]$, este último é um dos poucos complexos alquil mercúrio pseudotetraédrico conhecidos. Estes complexos sintéticos catalisam a remoção de grupos alquila ligados a mercúrio, e segundo Henry Strasdeit, (2008), podem ser considerados um grande avanço na busca de modelos funcionais de MerB. Os complexos descritos podem também ser usados como modelos estruturais. Outras pesquisas mostraram conclusivamente que o aumento do número de coordenações ao mercúrio é um princípio geral para a activação das ligações alquil-mercúrio para protonólise (Ni *et al.*, 2006), que se torna progressivamente mais favorável à medida que se adicionam grupos tiol ao Hg. Na enzima, este papel importante é atribuído aos grupos cisteína, ou seja, a tióis (Parks *et al.*, 2009).

A estrutura tridimensional da MerB foi determinada em solução por espectroscopia de RMN, tendo-se observado que as regiões flexíveis no centro activo são bastante hidrofóbicas, o que poderia acomodar a fracção de hidrocarbonetos do substrato. (Lello *et al.*, 2004). Estes autores referiram também que é provável que o dador de protões na reacção catalisada pela MerB seja uma cadeia lateral de aminoácidos no centro activo da enzima. Parks *et al.*, (2009), estudaram a variação de

energias quanto à saída de um grupo metilo do Hg-C em forma de metano através da acção da MerB. Analisaram dois mecanismos, com duas variações em cada mecanismo (Mecanismo I-a e I-b e mecanismo II-a e II-b). No mecanismo I-a a Cys96 encontra-se ligada ao Hg, e a Cys159 tal como o Aspartato 99 vão ligar-se ao Hg o que provoca a saída do CH_3^- que remove um H^+ da Cys 159, saindo assim em forma de metano (CH_4). Este passo necessita de uma energia livre de activação de $20.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (valor calculado usando a teoria do estado de transição). No mecanismo I-b (em que os papéis de Cys 96 e Cys 159 se encontram trocados) a energia de activação era de $36.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$, demasiado alta e incompatível com os dados experimentais. No segundo mecanismo II-a existem duas etapas: na primeira etapa a Cys96 doa um protão ao Aspartato formando um intermediário, de seguida a Cys96 coordena com R-Hg(II) e o Aspartato transfere um H^+ para o grupo metilo que está a abandonar o mercúrio dando origem a metano, tendo como energia de activação $20.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$. No mecanismo II-b a Cys159 doa um protão ao Aspartato 99 antes de se ligar ao Hg(II), de seguida o Aspartato liga-se ao Hg e o grupo metilo juntamente com o protão doado ao Aspartato sai em forma de metano, e a energia de activação é $22.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Estes autores concluem que a formação de um metilmercúrio inicial quer por Cys96 ou Cys159 é energeticamente viável. A coordenação do R-Hg(II) por duas cisteínas e um tiolato é suficiente para a activação da quebra da ligação Hg-C. Além disso mostram que a coordenação bis do R-Hg(II) induz a redistribuição da densidade de electrões em Hg(II) em direcção ao grupo abandonante e para longe do protão catalisador proveniente do Aspartato 99.

No estudo referido em Parks *et al.*, (2009), verifica-se que para remover o grupo metilo do Hg são suficientes as duas cisteínas e o aspartato. No presente trabalho em que o objectivo é remover um tiolato da proteína (Cys96 ou Cys159) com um tiolato novo (Int1- TS2 ou Int1-TS2a), a barreira energética da saída do tiolato ($17.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e 19 kcal.mol^{-1} , respectivamente) é sempre inferior à observada na saída do metilo por Parks *et al.*. Em ambos os estudos se verifica que o ataque pela Cys96 tem uma barreira energética inferior ao ataque realizado pela Cys159. As elevadas barreiras observadas para o ataque do segundo tiolato sugerem fortemente que esse ataque seja feito pela forma neutra (tiol). Estes resultados podem explicar o elevado pH óptimo de actuação da enzima (pH=9). De facto uma investigação recente (Ledwidge *et al.*, 2010) revelou

que na MerA (a enzima responsável por remover o mercúrio da MerB) esta função é desempenhada por duas cisteínas com pKa de 6.4 e 9.0. Ao pH óptimo de actuação da enzima apenas uma delas está de facto protonada, o que está de acordo com as previsões deste estudo.

V) Conclusão

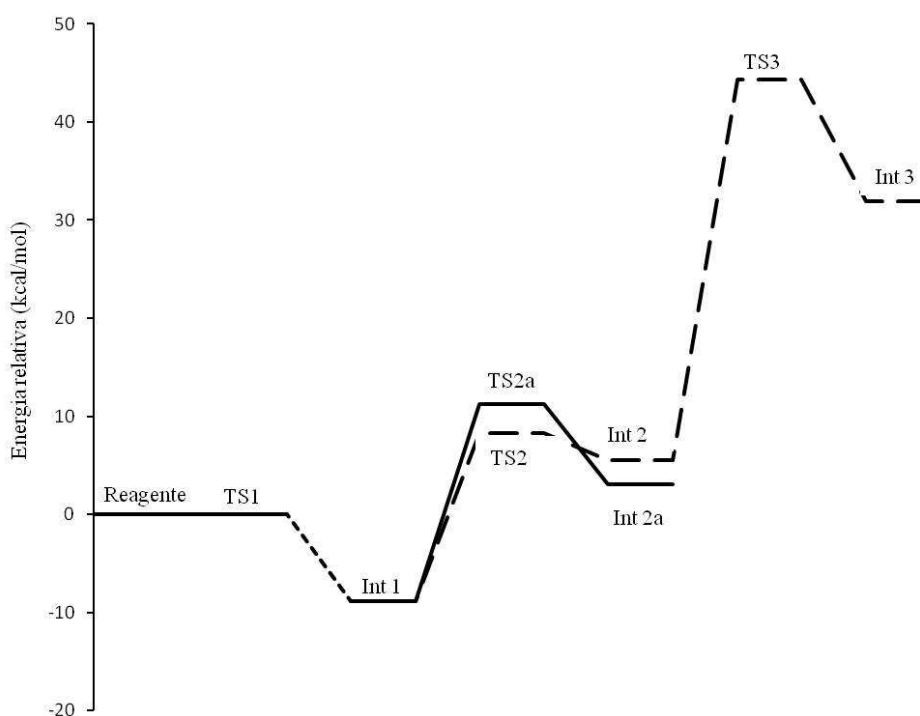


Figura 14 - Perfil de superfície de energia potencial em solução

Na investigação computacional realizada para os dois tipos de mecanismo possíveis, pode-se concluir que o passo Reagente→Int.1, onde se adicionou um tiolato, é limitado por difusão, isto é, se os reagentes estiverem próximos esta ocorre instantaneamente, sem barreiras energéticas devidas à distorção molecular. Os resultados no passo Int.1→Int.2 e Int.1→Int.2a não permitem concluir qual dos ataques nucleofílicos (por Cys 96 ou Cys 159) é o mais eficaz, devido à margem de erro do nível de teoria utilizado (2 a 3 kcal/mol). No passo do Int.2→Int.3 obteve-se uma barreira energética muito elevada, através da qual se conclui que a entrada do segundo tiolato não é possível a velocidades compatíveis com as observadas na enzima. Portanto a remoção do Hg não pode ser efectuada por dois tiolatos, o que leva a crer que esta ocorra através da intervenção de um tiolato e um tiol. Estes dados concordam com o perfil de actividade da enzima em função do pH, e com estudos recentes na proteína responsável pela remoção do Hg da MerB.

VI) Referências bibliográficas

- Amovilli, C., Mennucci, B. (1997). *J. Phys. Chem. B*, 101, pp. 1051-1057.
- Andrae, D., Haeussermann, U., Dolg, M., Stoll, H. and Preuss, H. (1990). *Theor. Chem. Acc.*, 77, pp. 123-141.
- Baker, J., Kessi, A., Delley, B. (1996). *J. Chem. Phys.*, 105, pp. 192-212.
- Barkay, T., Miller, S. M. e Summers, A. O. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, pp. 355-384.
- Becke, A. D. (1993). *J. Chem. Phys. I*, 98, pp. 5648-5652.
- Benesch, R. E., and Benesch, R. (1955). The acid strength of the –SH group in cysteine and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, pp. 5877–5881.
- Ben-Ozer, E.Y., Rosenspire, A.J. , McCabe Jr, M.J. , Worth, R.G. , Kindzelskii, A.L., Warra, N.S. e Petty, H.R. (2000). Mercuric chloride damages cellular DNA by a non-apoptotic mechanism. *Mutation Research*, 470, pp. 19-27.
- Boening, D. W. (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40, pp. 1335-1351.
- Bucio L., García C., Souza V., Hernández E., González C., Betancourt M. e Gutiérrez-Ruiz M. C. (1999). Uptake, cellular distribution and DNA damage produced by mercuric chloride in a human fetal hepatic cell line. *Mutation Research*, 423, pp. 65-72.

- Cerrati, G., Bernhard, M. and Weber, J.H. (1992). Model reactions for abiotic mercury(II) methylation: kinetics of methylation of mercury(II) by mono-, di-, and tri methylation in seawater. *Appl. Organomet. Chem.*, 6, pp. 587-595.
- Cheesman, B. V., Arnold, A. P., Rabenstein, D. L. (1988). Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. 25. Hg(thiol)₃ complexes and Hg(II)-thiol ligand exchange kinetics. *J. Am. Chem. Soc.*, 110, pp. 6359–6364.
- Clarkson, T.W., Magos, L. (2006). *Crit. Rev. Toxicol.*, 36, pp. 609 – 662.
- Devars, S., Aviles, C., Cervantes, C. and Moreno-Sanchez, R. (2000). Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.*, 174, pp. 175-180.
- Fernandes, P. A., Ramos, M. J. (2003). *J. Am. Chem. Soc.*, 125, pp. 6311-6322.
- Fernandes, P. A., Ramos, M. J.(2004). *Chemistry*, 10, pp. 257-266.
- Fox, B. and Walsh, C.T. (1982). Mercuric reductase. Purification and characterization of a transposon-encoded flavoprotein containing an oxidation-reduction-active disulfide. *J. Biol. Chem.*, 257, pp. 2498-2503.
- Gerhard I, Waldbrenner P, Thura H, Runnebaum B. (1992). Diagnostik von Schwermetallbelastungen mit dem peroralen DMPS-Test und dem Kaugummitest. *Zeitschr Klin Labor*, 9, pp. 404-411.
- Graminski, G. F., Kubo, Y., and Armstrong, R. N. (1989). Spectroscopic and kinetic evidence for the thiolate anion of glutathione at the active site of glutathione S-transferase. *Biochemistry*, 28, pp. 3562–3568.

- Guo, T. L., Miller, M. A., Shapiro, I. M. e Shenker, B. J. (1998). Mercuric Chloride Induces Apoptosis in Human T Lymphocytes: Evidence of Mitochondrial Dysfunction. *Toxicology and applied pharmacology*, 153, pp. 250-257.
- Guzzi, G., La Porta C. A. M. (2008). Molecular mechanisms triggered by mercury. *Toxicology*, 244, pp. 1-12.
- Jeng, M. F., Holmgren, A., and Dyson, H. J. (1995). Proton sharing between cysteine thiols in Escherichia coli thioredoxin: Implications for the mechanism of protein disulfide reduction. *Biochemistry*, 34, pp. 10101–10105.
- Kim, J.P. and Fitzgerald, W.F. (1986). Sea-air partitioning of mercury in the equatorial Pacific Ocean. *Science*, 231, pp. 1131-1133.
- Ledwidge, R., Hong, B., Dötsch, V., Miller, S. (2010). NmerA of Tn501 Mercuric Ion Reductase: Structural Modulation of the pKa Values of the Metal Binding Cysteine Thiols. *Biochemistry*, 49 (41), pp. 8988–8998.
- Lello, P. Di, Benison, G. C., Valafar, Pitts, H., K. E., Summers, A. O., Legault, P., Omichinski, J. G. (2004) *Biochemistry*, 43, pp. 8322 – 8332.
- Lin, C.J. e Pehkonen, S. O. (1999). The chemistry of atmospheric mercury: a review. *Atmospheric Environment*, 33, pp. 2067-2079.
- Löwdin, P. O. (1970). *Adv. Chem. Phys.*, 5, pp. 185-199.
- Marcelo, O., Dietricha, C.E., Mantesea, G.A., Diogo, O.S., Marcelo, F. (2005). Motor impairment induced by oral exposure to methylmercury in adult mice. *Environ. Toxicology Pharmacol.*, 19 (1), pp. 169-175.

- Marvin-Diapsquale, M.C. and Oremland, R.S. (1998). Bacterial methylmercury degradation in Florida Everglades peat sediment. *Environ. Sci. Technol.*, 32, pp. 2556-2563.
- Mason, R.P. and Sullivan, K.A. (1999). The distribution and speciation of mercury in the South and Equatorial Atlantic: Biogeochemical cycling on trace substances in the Atlantic Ocean; results from the Intergovernmental Oceanographic Commission baseline surveys in August 1993 and May/June 1996. *Deep-Sea Res. II*, 46, pp. 937-956.
- Melnick, J. G., Parkin, G. (2007). *Science*, 317, pp. 225 – 227.
- Mulliken, R. S. (1995). *J. Chem. Phys.* 23, pp. 1833.
- Ni, B., Kramer, J. R., Bell, R.A., Werstiuk, N.H. (2006). *J. Phys. Chem. A*, 110, pp. 9451-9458.
- Oremland, R.S., Culbertson, C.W. and Winfrey, M.R. (1991). Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, pp. 130-137.
- Parks, J. M., Guo, H., Momany C., Liang L., Miller S., Summers A., Smith G. (2009). Mechanism of Hg-C Protonolysis in the Organomercurial Lyase MerB. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, pp. 3278-3285.
- Perdew, J. P. (1991). “Unified Theory of Exchange and Correlation Beyond the Local Density Approximation.” In *Electronic Structure of Solids*, 91, pp. 11-20; Ziesche, P., Eschig, H., Eds.; Akademie Verlag: Berlin, Germany, 1991.

- Schuurs, A. H. B. (1999). Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. *Journal of Dentistry*, 27, pp. 249-256.
- Shenker, B. J., Guo, T. L. e Shapiro, I. M. (2000). Mercury-Induced Apoptosis in Human Lymphoid Cells: Evidence That the Apoptotic Pathway Is Mercurial Species Dependent. *Environmental Research*, 84, pp. 89-99.
- Silva, P. J., Ramos, M. J. (2008). Comparative Density Functional Study of Models for the Reaction Mechanism of Uroporphyrinogen III Synthase. *J. Phys.Chem. B*, 112, pp. 3144-3148.
- Smith, T., Pitts, K., McGarvey, J.A. and Summers, A.O. (1998). Bacterial oxidation of mercury metal vapor, Hg(0). *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, pp. 1328-1332.
- Suda, I., Suda, M. and Hirayama, K. (1993). Degradation of methyl and ethyl mercury by singlet oxygen generated from sea water exposed to sunlight or ultraviolet light. *Arch. Toxicol.*, 67, pp. 365-368.
- World Health Organization. (2003). Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects.
- Zahir, F., Rizwi S. J., Haq S. K., Khan R. H. (2005). Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, pp. 351-360.