

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/03/2023.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS E BIOANALÍTICAS
APLICADAS AO ESTUDO METALOPROTEÔMICO DO
MERCÚRIO**

EMERSON CARLOS DE ALMEIDA

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.**

**BOTUCATU - SP
Setembro – 2022**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS E BIOANALÍTICAS
APLICADAS AO ESTUDO METALOPROTEÔMICO DO
MERCÚRIO**

**EMERSON CARLOS DE ALMEIDA
BIÓLOGO**

Orientador: Prof. Dr. Pedro De Magalhães Padilha

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia**

**BOTUCATU - SP
Setembro – 2022**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Almeida, Emerson Carlos de.

Estratégias analíticas e bioanalíticas aplicadas ao
estudo metaloproteômico do mercúrio / Emerson Carlos de
Almeida. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biotecnologia de
Botucatu

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Capes: 20801009

1. Mercúrio. 2. Bioacumulação. 3. Proteínas metal
ligante. 4. Biomarcadores.

Palavras-chave: Bioacumulação de mercúrio; Biomarcadores;
Espécies mercuriais; GFAAS; Proteínas metal ligante.

AUXÍLIOS FINANCEIROS

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Processo: 2019/025384



Dedico este trabalho a meus pais, DIVAENTE PIOVESAN DE ALMEIDA e CARLOS FABRO DE ALMEIDA, e a minha amada esposa, RENATA DE OLIVEIRA CARNIATO. Eles me deram todo suporte que precisava para concluir este sonho que há muito tempo venho almejando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, nosso Grande Arquiteto do Universo, pois “ as minhas obras, não sou eu quem as reliza, mas a força de Deus-Pai, que permeia os céus e a Terra”. Ele me deu força, coragem, colocou as pessoas certas em minha vida e abriu caminhos que apenas Ele poderia abrir. Obrigado, Deus!!!

A meus pais, Divanete Piovesan de Almeida e Carlos Fabro de Almeida, que muito se sacrificaram para que eu pudesse fazer um curso superior e sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos. Muito obrigado, mãe e pai. Esta conquista é mais suas do que minha.

Agradeço também a meus irmãos, Simone e Diogo, por todo apoio e inspiração que sempre me deram. Vocês sempre acreditaram em mim, muitas vezes mais do que eu mesmo. Minha eterna gratidão a vocês.

Deixo aqui também meus sinceros agradecimentos à minha sogra, Vera, pois sempre me apoiou e ajudou para que muitas portas fossem abertas em minha vida. Meus mais sinceros agradecimentos.

Não posso deixar de agradecer à minha amada esposa, Renata, meu alicerce. Ela me deu total apoio nesta jornada e teve grande paciência nos períodos em que fiquei ausente. A você, meu amor, meu muito obrigado!

Não posso deixar de agradecer à toda equipe da E. E. Coronhel Nhonhô Braga, local onde tenho grandes amigos que também me incentivaram a seguir em frente, em especial minha grande amiga e diretora Mônica Maria Gianetti Amamura Cordoba, a qual sempre me apoiou em meus projetos e me recebe todos os dias na porta da escola com um sorriso, contribuindo para que meus dias comecem da melhor forma possível.

Deixo aqui também meus sinceros agradecimentos aos gestores e grandes amigos das Faculdades Integradas de Taguaí (FIT), Dr. José Guilherme Lança e Ms. Renato Dardes, por terem me dado total apoio na conclusão deste trabalho e me abrirem as portas da FIT para que eu pudesse exercer a docência no ensino superior, trabalho que tanto amo.

Não posso deixar de agradecer a meu grande amigo e colega de trabalho da FIT e de departamento na UNESP, Giliardi Marinho, por ter me apresentado este programa de mestrado, me incentivado na conclusão desta etapa em de minha vida e por ter seguido junto comigo durante esta caminhada. Meu muito obrigado a você, Giliardi.

Este trabalho não teria sido concluído se Deus não tivesse colocado em meu caminho o meu amigo Dr. José Cavalcante Souza Vieira, ele esteve a meu lado durante todo o processo

de realização deste mestrado me ensinando a realizar os processos laboratoriais, a manipular os programas de bioinformática e me auxiliando na realização da parte escrita. Meus eternos agradecimentos a você, José. Se não fosse por você este trabalho não teria sido concretizado.

Deixo também aqui registrado meus sinceros agradecimentos ao meu amigo e colega de laboratório, Victor Diego Faria, ele esteve ao meu lado durante todo o mestrado e ainda abriu as portas de sua república, cujos moradores têm todo meu respeito e gratidão, pois são pessoas maravilhosas e me acolheram da melhor forma possível, fazendo com que me sentisse em casa. Obrigado, Vitor, e a todos de sua república.

Deus foi muito bom comigo, pois colocou em meu caminho como orientador o prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha. Ele me acolheu sem mesmo me conhecer e teve enorme paciência comigo. O Dr. Pedro é um grande exemplo pra mim, como pessoa e profissional. Muito obrigado, Pedro, por ter sido tão prestativo comigo e me mostrado o fascinante mundo da proteômica e da metaloproteômica. Com o senhor aprendi muito. Foi uma honra ter sido orientado por uma pessoa tão sábia e de bom coração. Minha eterna gratidão ao senhor.

Não posso deixar de citar duas criaturas angelicais que são essenciais em minha vida, meus cachorros Lilica e Lulu, que sempre estão ao meu lado, em qualquer momento me enchem de alegria e felicidade. Eles me animam nos momentos difíceis me dando amor incondicional. Dessa forma, eles são essenciais para que consiga enfrentar qualquer desafio, como este mestrado.

Agradeço também à FAPESP pelo financiamento deste trabalho. Seria impossível a realização desta pesquisa sem a ajuda financeira fornecida por esta respeitada agência de fomento.

Muito obrigado a todos...

"A aparente dificuldade é um degrau para o sucesso. Não devemos desanimar diante de uma situação difícil. Pelo contrário, devemos aproveitá-la de modo a aprender lições valiosas, pois só assim podemos evoluir. Em vez de esmorecer diante das dificuldades, vamos superá-las resolutamente e levemos avante a nossa vida com ânimo e atitude positiva". Masaharu Taniguchi

"Ninguém é digno do oásis se não aprender a atravessar seus desertos". Augusto Cury

RESUMO

O presente trabalho está inserido na recente linha de pesquisa “metaloproteômica do mercúrio”, que tem como principal objetivo a identificação de biomarcadores de exposição às espécies mercuriais. A dissertação foi redigida em três capítulos. **Capítulo I:** Descreve o estado da arte do estudo realizado, pontuando a importância da otimização de estratégias para quantificar/identificar espécies mercuriais e das estratégias bioanalíticas aplicadas na metaloproteômica do mercúrio. **Capítulo II:** Descreve os resultados obtidos na otimização de amostragem de fluídos biológicos utilizando percolação em cartões Noviplex para posterior determinação de mercúrio total. Para isso, estratégias de amostragem de sangue de peixes/humanos e de extratos proteicos de tecido muscular e hepático de peixes por percolação em cartões Noviplex foram ajustados. Na etapa de quantificação do mercúrio nos eluatos das amostras, os parâmetros físico-químicos relacionados a estabilização térmica do mercúrio para posterior determinação por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) foram otimizados. O método foi validado por meio de análise de material certificado. Este capítulo foi redigido na forma de artigo científico, nas normas do periódico *Exposure and Health*. **Capítulo III:** Descreve os resultados obtidos no estudo metaloproteômico de tecido renal de ratos expostos a baixas concentrações de cloreto de mercúrio por trinta e sessenta dias. O perfil proteômico do tecido renal dos ratos foi obtido por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e as determinações de mercúrio total no tecido hepático, *pellets* proteicos e *spots* proteicos foram realizadas por GFAAS. A caracterização dos *spots* proteicos associados ao mercúrio e análise de proteínas diferencialmente expressas foi feita por espectrometria de massa em sequência com ionização por electrospray acoplada com cromatografia líquida (LC-ESI-MS/MS). Análise de bioinformática das proteínas identificadas como diferencialmente expressas foram feitas utilizando o software Blast2GO e permitiram elucidar aspectos fisiológicos e funcionais das *Hg-metal binding protein* e inferir possíveis biomarcadores de exposição ao mercúrio. Este capítulo foi redigido na forma de artigo científico, nas normas do periódico *Biological Trace Element Research*.

ABSTRACT

Mercury is a toxic metal that participates in bioaccumulation processes and trophic biomagnification, leading exposed organisms to have several complications in many systems, such as the nervous and renal. This work presents studies to sampling optimize of biological fluids using percolation in Noviplex cards for subsequent total mercury determination. For this, sampling strategies of fish blood, humans and protein extracts from fish muscle and liver tissue, by percolation on Noviplex cards were adjusted. In mercury quantification step in the sample eluates, the physicochemical parameters related to the thermal stabilization of mercury for subsequent determination by atomic absorption spectrometry in graphite furnace (GFAAS) were optimized. The method has been validated for total mercury determinations with extracts from DORM-4 and DOLT-4 reference materials. The calculated LODs and LOQs ranged from 12 to 43 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Metalloproteomic studies were also performed on renal tissue from rats exposed to low concentrations of mercury chloride for thirty and sixty days. The proteomic profile of rats renal tissue was obtained by 2D-PAGE and total mercury determinations in renal tissue, protein *pellets* and protein spots were performed by GFAAS. Characterization of mercury-associated protein spots and differentially expressed proteins analysis were performed by LC-ESI-MS/MS. Bioinformatics analysis of the proteins identified as differentially expressed performed by Blast2GO software and allowed to elucidate physiological and functional aspects of the Hg-metal binding protein and to infer possible biomarkers of exposure to mercury. The metalloproteomic studies indicated that: the isoforms of the enzymes GST Mu and GPx and the heat shock proteins Heat shock 70 kDa protein 1-like and Heat shock protein beta-1 were expressed only in the group exposed to mercury for 60 days; actin isoforms, showed "upregulated" and "downregulated" and the Hemoglobin subunit isoforms showed "downregulated". These results qualifies these enzymes/proteins as potential mercurial species exposure biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Matriz causal das causas e consequências da exposição humana ao mercúrio.....	pág. 22
Figura 2: ciclo do mercúrio.....	pág. 23
Figura 3: esquema de espectrometria de absorção atômica.....	pág. 26
Figura 4: esquema de funcionamento da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D - PAGE)	pág. 27
Figura 5: etapas comumente seguidas em análises proteômica: preparação do extrato, digestão e análise por espectrometria de massas.....	pág. 28
Figura 6: esquema simplificado de um espectrômetro de massas.....	pág. 29
Figura 7: esquema dos modos de ionização largamente empregados aplicados em proteômica.....	pág. 30

Capítulo 2

Figure 1: Pyrolysis (1a) and atomization (1b) curves obtained for acid samples extracted from Noviplex card sampling discs and from a standard solution containing 1.50 µg L-1 mercury.....	pág. 44
--	---------

Capítulo 3

Figura 1 - Figuras representativas das triplicatas de géis obtidos por 2D-PAGE do <i>pool</i> amostras de tecido renal de ratos dos grupos controles (C-60) e expostos ao mercúrio por período de 60 dias (Hg-60)	pág. 62
Figura 2 - Gráficos de análise funcional das proteínas identificadas como únicas (somente no <i>pool</i> de amostras de tecido renal de ratos expostos a dose de 4,60 µg kg ⁻¹ de Hg ²⁺ por 60 dias - grupo Hg-60 - e controle - Controle-60) utilizando o software Blast2GO.....	pág. 72
Figura 3 - Gráficos de análise funcional das proteínas identificadas como “ <i>downregulated</i> ” nas análises de expressão proteica <i>pool</i> de amostras de tecido renal dos grupos controles e expostos ao mercúrio (grupo C-60 x grupo Hg-60) utilizando o software Blast2GO.....	pág. 73

Figura 4 - Gráficos de análise funcional das proteínas identificadas como “*upregulateds*” nas análises de expressão proteica *pool* de amostras de tecido renal dos grupos controles e expostos ao mercúrio (grupo C-60 x grupo Hg-60) utilizando o software Blast2GO.....pág. 74

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Relação entre a forma química, propriedades características e aplicações do mercúrio.....pág. 20

Capítulo 2

Table 1: Graphite tube heating program optimized for determination of mercury in acid extracts obtained from mineralization of sampling disks of Noviplex cards.....pág. 42

Tables 2 and 3: Results of validation of the method was performed with mercury determinations for extracts from the trace metal reference materials DORM 4 – fish protein and DOLT 4 – fish liver.....pág. 46

Capítulo 3

Tabela 1 - Concentração de mercúrio total nas amostras de tecido renal e *pellets* proteicos de ratos expostos ao mercúrio por 30 e 60 dias.....pág. 61

Tabela 2 – Concentração de mercúrio total nos *spots* dos géis do *pool* de amostras de tecido renal de ratos expostos a dose de 4,60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de Hg^{2+} (solução de cloreto de mercúrio) por 60 dias (grupo Hg-60).....pág. 62

Tabela 3 - Proteínas identificadas nos *spots* proteicos associados ao mercúrio dos géis do *pool* de amostras de tecido renal de ratos expostos a dose de 4,60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de Hg^{2+} por 60 dias (grupo Hg-60).....pág. 64

Tabela 4. Proteínas identificadas por *shotgun* no rim de ratos. Hg-60 x Controle-60 dias. Proteínas únicas.....pág. 68

Tabela 5. Proteínas identificadas por *shotgun* no rim de ratos. Hg-60 x Controle-60 dias. Upregulated.....pág. 69

Tabela 6. Proteínas identificadas por *shotgun* no rim de ratos. Hg-60 x Controle-60 dias. Downregulated.....pág. 70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%Vol – volume normalizado de um spot no gel
1D-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em uma dimensão
2D-PAGE – eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
AAS – espectrometria de absorção atômica
ACET – acetileno
AHE – Aproveitamento Hidrelétrico
BG - background
CHAPS - 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato
DTT - 1,4-ditiotreitol
ESI MS MS – espectrometria de massas em sequência com ionização por *elctrospray*
FAAS – espectrometria de absorção atômica em chama
GFAAS – espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
Hg - mercúrio
IEF - Focalização Isoelétrica
kDa – quilodalton ($1 \text{ Da} = 1,661 \times 10^{-24} \text{ g}$)
kV - quilovolt
mA - miliampere
mM - milimolar
MM - Massa molecular
Pd - paládio
pH – potencial hidrogeniônico
pI - Ponto Isoelétrico
ppb – parte por bilhão
rpm – rotação por minuto
SDS – dodecil-sulfato de sódio
spot – ponto de localização de uma proteína em gel 2D
TEMED - N,N',N,N'-tetrametiletilenodiamina
V - volt
v – volume
Vh – volt-hora
W – watt

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	16
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	17
2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	19
2.1. Problemática do mercúrio.....	19
2.2. Ciclo do mercúrio	22
2.3. Proteômica e Metalômica	23
2.4. Metaloproteômica	24
2.5. Técnicas utilizadas na metaloproteômica	25
2.5.1. Espectrometria de absorção atômica (AAS).....	25
2.5.2. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE).....	26
2.5.3. Espectrometria de massas.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO II - Mercury determinations in biohazard samples by GFAAS using Noviplex card sampling.....	37
Graphical Abstract.....	38
Abstract.....	38
1. INTRODUCTION	39
2. MATERIAL AND METHODS	40
2.1. Sampling procedures with Noviplex cards.....	40
2.1.1. Blood	40
2.1.2. Plasma eluates and muscle and liver tissue homogenates	40
2.2. Mineralization process with Noviplex card sampling discs and plasma eluates.....	41
2.3. Total mercury determination	42
2.3.1. Analytical curve preparation	42
2.3.2. Analytical procedures for sample analyses	43
2.4. Statistical analyses.....	43
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	43
3.1. Optimization of instrumental parameters	43
3.2. Optimization of the analytical curve	45
3.3. Application of the proposed method in determinations of total Mercury	46

4. CONCLUSIONS	47
REFERENCES	48
CAPÍTULO III - Identificação de mercúrio associado à metal binding protein de tecido renal de ratos expostos ao cloreto de mercúrio	51
Resumo.....	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1. Experimentação animal	55
2.2. Coleta e precipitação da fração proteica das amostras de tecido renal.....	56
2.3. Quantificação de proteínas totais.....	56
2.4. Separação dos proteomas por 2D-PAGE	57
2.5. Determinação de mercúrio total nas amostras de tecido renal, pellets e spots proteicos	58
2.6. Caracterização spots proteicos associados ao mercúrio por LC-ESI-MS/MS	59
2.7. Fracionamento do proteomas renal e análise de expressão por <i>Shotgun</i> – LC –MS/MS	59
2.8. Análise Estatística	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1. Determinações de mercúrio total.....	60
3.2. Fracionamento dos proteomas das amostras tecido renal por 2D PAGE e determinação de mercúrio total nos <i>spots</i> proteicos.....	61
3.3. Caracterização dos spots proteicos associados ao mercúrio por LC – MS/MS	63
3.4. Identificação das proteínas diferencialmente expressas por <i>Shotgun</i> – LC –MS/MS	67
4. CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

CAPÍTULO 1

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A exposição a altas concentrações de mercúrio em várias regiões do mundo está geralmente relacionada com incidentes de envenenamento nos quais se observa quadros clínicos na síndrome motora e prejuízos sensoriais associados ao estresse oxidativo no cérebro, sendo o cérebro fetal particularmente vulnerável a esses efeitos [1].

Os sintomas de intoxicação relacionados à exposição ao mercúrio nos seres humanos variam dependendo da forma química à que são expostos, que pode causar desde danos sérios até irreversíveis no sistema urinário, respiratório, imunológico, reprodutor e nervoso central [2,3]. Por exemplo, a toxicidade das espécies mercuriais, como o metil mercúrio (MetHg) se deve a sua capacidade de bioacumulação e biomagnificação principalmente em organismos aquáticos, através dos quais pode chegar até o homem, principalmente por meio do consumo de peixe [4,5,6]. No trato gastrointestinal do ser humano cerca de 90% das espécies mercuriais são absorvidas e alcançam a corrente sanguínea onde são distribuídas para o corpo. A distribuição corporal ocorre principalmente pela ligação das espécies mercuriais aos grupos sulfidril de proteínas, como a cisteína e glutathione, ou ainda por difusão passiva. A partir do sangue até outros tecidos do corpo, decorre-se um tempo de aproximadamente quatro dias pós exposição para os sintomas começarem a aparecerem [7], e as alterações patológicas estão relacionadas ao sistema nervoso, sendo os principais sintomas a ataxia, neurestenia, disartria, distúrbios visuais, tremores musculares, parestesia, e em casos mais extremos, cegueira, coma e morte [8, 9]. As espécies mercuriais podem também afetar o sistema imunológico, causando sua debilidade, o sistema renal, desestabilizando o nível de creatinina, e o sistema cardiovascular, alterando a homeostase [10].

Em camundongos, já foi constatado que pode haver a indução de metalotneínas nos tecidos renal, cerebral e hepático quando são expostos ao mercúrio tanto na forma orgânica (MeHg) como em formas inorgânicas (Hg^0 e Hg^{2+}) [11].

Em estudo realizado sobre os efeitos da exposição crônica em baixas concentrações do mercúrio em ratos machos foi demonstrado que o sistema reprodutor sofre efeitos tóxicos, aumento do estresse oxidativo e aumento da expressão proteica da isoforma GPx4 nos testículos [12].

Um dos primeiros sistemas a serem intoxicados por metilmercúrio é o sistema nervoso [13]. Em camundongos, também foi observado que a exposição ao mercúrio pode provocar déficit neuromotor [14,15], e em filhotes, a exposição lactacional ao mercúrio inorgânico

aumenta significativamente a lipoperoxidação cerebelar, bem como a atividade da glutathione redutase cerebelar, além de provocar alterações bioquímicas no cerebelo de camundongos desmamados quando submetidos à exposição ao mercúrio inorgânico através do leite materno [15].

Vários estudos reportam a associação entre doença cardiovascular e exposição ao mercúrio [12,16]. A ação do mercúrio no sistema cardiovascular em camundongos pode ser constatada em estudo em exposição ao Hg^{2+} , o qual resultou em indução significativa dos marcadores de hipertrofia cardíaca, peptídeo natriurético atrial (ANP) e peptídeo natriurético cerebral (BNP), além do aumento da expressão gênica Cyp1a1, Cyp1b1, Cyp2b9, Cyp2b10, Cyp2b19, Cyp2c29, Cyp2c38, Cyp4a10, Cyp4a12, Cyp4a14, Cyp4f13, Cyp4f15, Cyp4f16 e Cyp4f18. Além disso, o Hg^{2+} aumentou significativamente a expressão e os níveis de atividade da proteína sEH em corações de camundongos tratados com mercúrio, com conseqüente diminuição nos níveis de ácidos 14,15- e 11,12-epoxieicosatrienoico (EETs) [16]. O mesmo estudo também verificou aumento na formação dos ácidos 14,15-, 11,12-, 8,9-diidroieicosatrienoico (DHETs), e a modulação de expressão de várias enzimas Cyp e sEH com conseqüente diminuição dos EETs cardioprotetores, o que poderia representar um novo mecanismo pelo qual o mercúrio causa cardiotoxicidade progressiva.

Vários estudos tem associado a ação tóxica do mercúrio no sistema renal, em especial na forma inorgânica [13]. Em estudo realizado com camundongos machos em exposição aguda ao cloreto de mercúrio teve como resultados estresse oxidativo; disfunção renal temporária-dependente; aumento de enzimas dependentes de glutathione envolvidas no processo de bioacumulação de mercúrio; aumento da expressão de IRE1 α e ATF6, que são sensores de detecção de proteínas não dobradas, demonstrando que houve ativação da via Unfold Protein Response (UPR), e ativação de resposta de morte celular através do GADD-153 (promotor de morte celular) e caspases 12 e 3 (proteases), ocasionando disfunção renal [17].

A ativação da UPR ocorre quando o retículo endoplasmático (ER) sofre estresse pelo excesso de proteínas não enoveladas através da indução da transcrição de chaperonas do retículo endoplasmático, afim de aumentar o dobramento de proteínas; diminuição da tradução proteica, diminuindo a sobrecarga do retículo endoplasmático; regulação da transcrição de genes associados ao ERAD (ER-associated protein degradation), levando ao aumento da degradação proteica; e ativação de sistema de apoptose, como a ativação de GADD-153 e caspases 12 e 3 caso os meios anteriores falhem [17].

Assim, a determinação de espécies mercuriais em amostras biológicas é de fundamental

importância para o processo de monitoramento da toxicidade em organismos vivos. No entanto, a determinação tanto de mercúrio total como a especiação do mercúrio no material biológico apresentam dificuldades devido às baixas concentrações que essas espécies apresentam nessas amostras e também porque a toxicidade depende da espécie mercurial analisada. Na literatura, diversas estratégias de preparo de amostras e posterior determinação de espécies químicas por espectrometria atômica foram descritas nos últimos vinte anos [18-26]. No entanto, dificuldades relacionada ao processo de amostragem de material biológico *in situ* e posterior determinação manipulando-se o mínimo possível a amostra ainda não foi superada.

No mesmo contexto, estudos relacionados à elucidação dos mecanismos de toxicidade do mercúrio em nível molecular são fundamentais para entender os diferentes processos dos efeitos deletérios do mercúrio aos seres vivos. Nessa vertente de pesquisa, a identificação de biomarcadores de exposição às espécies mercuriais poderá indicar previamente possíveis riscos de contaminação dos organismos vivos expostos às diferentes fontes de contaminação desse xenobiótico, como através da alimentação ou pelo contato de organismos aquáticos com água contaminada com mercúrio [27].

Assim, a metalômica, recente linha de pesquisa, permite a integração de estudos analíticos e bioquímicos, tem contribuído no esclarecimento dos aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas e/ou *metal binding proteins* responsáveis pelo transporte de íons metálicos nos organismos vivos [28, 29]. A metalômica permite a caracterização de *spots* e *pellets* proteicos associados com espécies mercuriais [27], assim como a identificação de proteínas presentes nos *spots* e *pellets* que estão diferencialmente expressas, frente às alterações das características limnológicas e disponibilidades das espécies de mercúrio no ambiente, fornecendo assim informações em relação à elucidação dos mecanismos de absorção do mercúrio por organismos vivos [28-30].

2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

2.1. Problemática do mercúrio

O (Hg) existe em três formas: metálico ou elementar, orgânico e inorgânico [16]. Em sua forma metálica se apresenta na forma de um branco brilhante, prateado, denso e móvel [31]. É um metal inodoro, sendo o único conhecido por se apresentar em estado líquido em

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLARKSON, T. W; LASZLO, M. (2006). The toxicology of mercury and Its chemical compounds. **Critical Review in Toxicology**, 36(8):609-62.
2. FAIAL, K. et al. Mercury levels assessment in hair of riverside inhabitants of the Tapajós River, Pará State, Amazon, Brazil: fish consumption as a possible route of exposure. **J Trace Elem Med Biol**. 2015; 30:66–76.
3. FARINA, M. et al. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. **Neurochem Int**. 2013; 62(5):575–94.
4. SANTOS-FRANCÉS, F. et al. Distribution and mobility of mercury in soils of a gold mining region, Cuyuni river basin, Venezuela. **J Environ Manage**. 2011; 92(4):1268–76.
5. CHAO, H-H. et al. Arsenic, cadmium, lead, and aluminium concentrations in human milk at early stages of lactation. **Pediatr Neonatol**. 2014; 55(2):127–34.
6. BASTOS, W. R. et al. A description of mercury in fishes from the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Acta Amaz**. 2008;38(3):431–8.
7. SYVERSEN, T; KAUR P. The toxicology of mercury and its compounds. **J Trace Elem Med Biol**. 2012; 26:215–26.
8. KHOURY, E. D. T. et al. Manifestações neurológicas em ribeirinhos de áreas expostas ao mercúrio na Amazônia brasileira. **Cad Saude Publica**. 2013;29(11):2307–18.
9. CECCATELLI, S; DARÉ, E; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chem Biol Interact**. 2010;188:301–8.
10. ZAHIR, F. et al. Low dose mercury toxicity and human health. **Environ Toxicol Pharmacol**. 2005;20(2):351–60.
11. YASUTAKE, A; NAKAMURA, M. Induction by mercury compounds of metallothioneins in mouse tissues: inorganic mercury accumulation is not a dominant factor for metallothionein induction in the liver. *J Toxicol Sci*. 2011 Jun;36(3):365-72. doi: 10.2131/jts.36.365. PMID: 21628964.
12. MARTINEZ, C. S. **Efeito da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl₂) no sistema reprodutor de ratos machos**. 111 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, Uruguaiana, 2013.
13. PEÇANHA, G. A. W. **Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl₂) sobre a reatividade vascular e propriedades mecânicas e estruturais de artérias de**

resistência de ratos. 2008. Tese de Doutorado. Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

14. DAY, J. J.; REED, M. N.; NEWLAND, C. Neuromotor deficits and mercury concentrations in rats exposed to methyl mercury and fish oil. **Neurol and Teratol.** 2005; 27:629-41.

15. FRANCO J. L. et al. Lactational exposure to inorganic mercury: evidence of neurotoxic effects. **Neurotoxicol Teratol.** 2007 May-Jun;29(3):360-7. doi: 10.1016/j.ntt.2006.11.009. Epub 2006 Dec 6. PMID: 17222531.

16. MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova** [online]. 2000, v. 23, n. 4, pp. 487-495.

17. ROJAS-FRANCO, P. et al. Endoplasmic reticulum stress participates in the pathophysiology of mercury-caused acute kidney injury. **Ren Fail.** 2019 Nov;41(1):1001-1010. doi: 10.1080/0886022X.2019.1686019. PMID: 31736398; PMCID: PMC6882499.

18. GALLIGNANI, M. et al. (1998). A time-based flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry system with on-line microwave sample pre-treatment for the determination of inorganic and total mercury in urine. **Analytica Chimica Acta**, 369, 57–67.

19. MONDAL, B. C., & DAS, A. K. (2003). Determination of mercury species with a resin functionalised with a 1,2-bis(o-aminophenylthio)ethane moiety. **Analytica Chimica Acta**, 477, 73–80.

20. BERMEJO-BARRERA, P. et al. (1999). Rapid acid leaching and slurry sampling procedures for the determination of methyl-mercury and total mercury in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 398, 263–272.

21. TORRES, A. P. et al (2005). Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 20, 289–294.

22. BERMEJO-BARRERA, P. et al. (1994). Palladium as a chemical modifier for the determination of mercury in marine sediment slurries by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 296, 181–193.

23. MOREDA-PIÑEIRO, L. et al. (2002). Direct mercury determination in aqueous slurries of environmental and biological samples by cold vapour generation–electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 460, 111–122.

24. ZHANG, Y., & ADELOJU, S. B. (2012). Speciation of mercury in fish samples by flow injection catalytic cold vapour atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 721, 22–27.
25. MORAES, P. M. et al. (2013). GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. **Food Chemistry** 141:2614–2617.
26. QUEIROZ, J. V. et al. Total mercury determination in muscle and liver tissue samples from Brazilian Amazon fish using slurry. **Biological Trace Element Research**, v. 184, p. 517-522, 2018.
27. MORAES, P. M. et al. A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. **Biological Trace Element Research**, v.150, p. 195-199, 2012.
28. BRAGA, C. P. et al. Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. **Talanta**, v. 132, p. 239-244, 2015.
29. BATAGLIOLI, I. C. et al. Physiological and functional aspects of metal-binding protein associated with mercury in the liver tissue of pirarucu (*Arapaima gigas*) from the Brazilian Amazon. **Chemosphere**, v. 236, p. 124320, 2019.
30. BITTARELLO, A. C. et al. Metalloproteomic approach of mercury-binding proteins in liver and kidney tissues of *Plagioscion squamosissimus* (corvina) and *Colossoma macropomum* (tambaqui) from Amazon region: Possible identification of mercury contamination biomarkers. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 134547, 2020.
31. BATAGLIOLI, I. C. **Elucidação de aspectos fisiológicos e funcionais de proteínas associadas ao mercúrio em pirarucu (*Arapaima gigas*)**. 2019. 40 p. Dissertação (Pós-graduação em Zootecnia) — Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho.
32. FARIAS, L. A. **Avaliação do conteúdo de mercúrio, metilmercúrio e outros elementos de interesse em peixes e em amostras de cabelos e dietas de pré-escolares da Região Amazônica**. 2006. 226 p. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo.
33. SISINNO, C. L., & OLIVEIRA-FILHO, E. C. (2013). **Princípios de Toxicologia Ambiental**. Rio de Janeiro: Interciência.
34. BENSEFA-COLAS, L.; ANDUJAR, P.; DESCATHA, A. Intoxication par le mercure. La Revue de médecine interne, **Elsevier Masson**, Créteil, v. 32, n. 3, p. 416 – 424, julho 2011. ISSN 0248-8663.

35. GALVÃO, R. C. F. et al. Relação espacial do mercúrio e elementos traços em sedimentos de fundo no Alto Rio Madeira. In: **Seminário de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Paraíba do Sul: o eucalipto e o ciclo hidrológico**. Taubaté: [s.n.], 2007. p. 51 – 57.
36. QUEIROZ, J. V. **Abordagem metalômica quantitativa de mercúrio em peixes da região amazônica**. 2015. Dissertação (mestrado) – Curso de Zootecnia. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.
37. CHOE, L. H.; LEE, K. H. Quantitative and qualitative of infralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis. **Electrophoresis**, v. 24, p. 3500-3507, 2003.
38. BENSEFA-COLAS, L.; ANDUJAR, P.; DESCATHA, A. Intoxication par le mercure. La Revue de médecine interne, **Elsevier Masson**, Créteil, v. 32, n. 3, p. 416 — 424, julho 2011. ISSN 0248-8663.
39. BORÉM, A., & FRITSCHÉ-NETO, R. (2013). *Ômicas 360: aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas*. Visconde do Rio Branco: Suprema.
40. VASCONCELLOS, A. C. S. **Carga de doença atribuída ao metilmercúrio: estimativas nacional, regional e local**. 2015. 155 p. Tese (Doutorado) — Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ens-33269>. Acesso em: 10 dez. 2021.
41. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Roma e Genebra: Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação e Organização Mundial da Saúde; 2004. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42849>, acesso em 28 out. 2022.
42. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Roma e Genebra: Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação e Organização Mundial da Saúde; 2006.
43. Organization, 2010. **Preventing disease through healthy environments. Exposure to Mercury: A Major Public Health Concern**. WHO Publishers, Geneva.
44. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain contaminants in food, prepared by the seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2010.

45. BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. O comportamento do metil mercúrio (metilHg) no ambiente. **Química Nova**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 593 – 600, 05 2004. ISSN 16787064.
46. SOARES, J. L. F. et al. Bioacumulação de mercúrio total (HgT) e hábitos alimentares de peixes da bacia do Rio Negro, Amazônia, Brasil. **Biota Amazônia** (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota), v. 6, n. 1, p. 102-106, 2016.
47. MENDONÇA, B. C. **Estudo de proteínas associadas ao mercúrio em peixes da região amazônica**. 2017. Tese (doutorado) – Curso de Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.
48. SOUZA, J. R.; BARBOSA, A. C. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. **Química nova na escola**, v. 12, p. 3-7, 2000.
49. ERAVCI, M. et al. Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gelelectrophoresis. **Proteomics**, v. 7, p. 213 – 523, 2007.
50. GARCIA, J. S.; Magalhães, C. S.; Arruda, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v. 69, p. 1-15, 2006.
51. FLACK, C. P.; WOOLLEN, J. W. Prevention of interference by dextran with biuret-type assay of serum proteins. **Clinical Chemistry**, v. 30, p. 559-561, 1984.
52. BITARELLO, A. C. **Estudo de biomarcadores de mercúrio em peixes da Amazônia por meio da metalômica e análise do estresse oxidativo**. 2017. 124 p. Tese (Pós-graduação em Zootecnia) — Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
53. MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concepts and methodology. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 1119-1138, 2009.
54. Ge Healthcare, Manual do usuário, ImageMaster 2D Platinum 7.0 Edition AA, 2007.
55. CANDIANO, G. et al. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.
56. VIEIRA, J. C. S. **Investigação de metalotneínas em peixes da região do Jirau – bacia do rio Madeira – Rondônia**. 2017. Tese (doutorado) – Curso de Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.
57. POZZI, C. M. C. **Análise metaloproteômica de cálcio, ferro e zinco em colostro, leite de transição e leite maduro humanos**. 2013. 65 f. Dissertacao (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biotecnologia de Botucatu, 2013.
58. SZPUNAR, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. **Analyst**, v. 130, n. 4, p. 442-465, 2005.

59. GÓMEZ-ARIZ, J. L. et al. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, n.1-2, p. 15-22, 2004.
60. SARAN, L.M. (2010) Fcva/ Unesp Jaboticabal. **Espectroscopia de absorção atômica**. Disponível em: <<https://www.fcav.unesp.br>>. Acesso em 25 out. 2022.
61. APPLIED BIOSYSTEMS (Org.). Espectrometria de massas e suas aplicações. São Paulo: **Abi Expert Training Center**, 2005. p. 40.
62. VILLAR L. S. (2006) VILLAR, L. S. **Otimização De Metodologia Para Extração E Determinação De Metalotioneínas Por Eletroforese Em Gel De Poliacrilamida De Ostras Crassostrea Rhizophorae (Guilding, 1828) Para Aplicação Em Estudos Ambientais**. 2006. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal Fluminense.
63. RIBEIRO, C. M. **Estudo proteômico de vermes adultos machos e fêmeas de Schistosoma mansoni**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
64. GE HEALTHCARE. **2D Electrophoresis – principles and methods**. Uppsala, Sweden: GE Healthcare, 2004.
65. CUNHA, J. A. **Espectrometria de massa por tempo de voo com fonte MALDI acoplada a um acelerador de partículas**. 2011. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo.
66. CANTÚ, M. D., et al. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.