

**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 *electrospray*
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

temperatura ambiente e a 0°C, e também o único elemento, com exceção dos gases nobres, que apresenta na forma monoatômica em estado gasoso [32,33].

A forma mais amplamente distribuída do Hg é o Hg^0 (vapor), predominante na atmosfera; a forma divalente (Hg^{2+}) é a forma predominante em águas naturais e o metilHg é a forma de maior importância ambiental devido sua alta toxicidade [16,34,35,36,37]. O mercúrio elementar é volátil em temperaturas ambiente normais, sendo o suficiente para causar envenenamento, tem baixa solubilidade em água e pode formar amálgas com muitos metais [38].

Além de sua forma elementar, o mercúrio pode apresentar como cátion mono e divalente (Hg^+ , Hg^{2+}), os quais correspondem a compostos mercuriosos e mercúricos, já os compostos minerais inorgânicos pode-se citar: óxido de mercúrio (HgO), sulfeto de mercúrio (HgS), sulfato de mercúrio (HgSO_4), cloretos mercúricos e mercuriosos (HgCl_2 , Hg_2Cl_2), sendo que as três formas de mercúrio podem ser convertidas entre si no ambiente. [33, 34]. Os compostos mercúricos são mais estáveis, sendo então mais abundantes na natureza. Dentre eles, os cloretos, nitratos, sulfatos e hidróxidos são os sais mercúricos mais importantes [33].

Além dos sais inorgânicos, o Hg^{2+} forma vários compostos organometálicos através de ligações covalentes estáveis com o carbono, formando compostos lipossolúveis tóxicos, como o metilHg, os quais são muito estáveis, sendo dificilmente decompostos pela água e ar, pois o mercúrio possui pouca afinidade com o oxigênio e o hidrogênio, tendo inclusive a capacidade de substituir este último em compostos orgânicos. [39].

A variedade de formas químicas do mercúrio fez com que ele pudesse utilizado em diversas aplicações (tabela 1).

Tabela 2: Relação entre a forma química, propriedades características e aplicações do mercúrio.

Forma Química	Propriedades Características	Aplicações
Metal	- Líquido à temperatura ambiente, expansão volumétrica uniforme em ampla faixa de temperatura, alta tensão superficial, não aderência a superfícies vítreas.	- Aparelhos de medição de pressão e temperatura: termômetros, barômetros e manômetros.
	- Baixa resistência elétrica e alta condutividade térmica.	- Materiais elétricos e eletrônicos, agente resfriante.
	- Alto potencial de oxidação em relação ao hidrogênio.	- Operações eletroquímicas: indústrias de cloro e solda.
	- Facilidade de formação de amálgamas com outros metais.	-Metalurgia, odontologia, processos extrativos (garimpo)

Compostos orgânicos	- Poder de assepsia por oxidação da matéria orgânica.	- Inseticidas, bactericidas, fungicidas.
Compostos inorgânicos	- Alta estereoespecificidade.	- Catálise na indústria de polímeros sintéticos.

Fonte: [16].

O mercúrio (Hg) e todos os seus compostos são tóxicos para a biosfera [32,36]. A volatilidade alta do mercúrio metálico e de alguns de seus compostos, assim como a lipossolubilidade de alguns de seus derivados orgânicos e, em menor grau, do mercúrio elementar, são algumas das causas do alto poder de intoxicação deste metal [34].

Como há diferenças significativas nas características físico-químicas dos diversos compostos mercuriais, os efeitos tóxicos das diferentes formas químicas são bastante distintos, assim como os órgãos afetados [33,40]. Para o ser humano, a exposição ao mercúrio metálico ou a sais orgânicos ocorre geralmente no ambiente de trabalho (exposição ocupacional), já a exposição ao metilmercúrio ocorre principalmente pelo consumo de alimentos como organismos aquáticos [33].

Em 2003, o Comité Misto da FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) determinou uma tolerância de ingestão semanal de metilmercúrio de 1,6 µg/kg de peso corporal, a fim de proteger fetos em desenvolvimento de quaisquer efeitos neurotóxicos [41]. Em 2006, foi informado pela JECFA que as fases da vida, com exceção da fase embrionária e fetal, podem ser menos sensíveis aos efeitos do metilmercúrio, sendo que nos adultos, a ingestão de até cerca de dobro da dose semanal tolerável de metilmercúrio não representaria qualquer risco neurotóxico [42]. Entretanto, os dados disponíveis não permitiram concluir os efeitos do metilmercúrio em crianças e adolescentes até 17 anos, sendo que estes podem ser mais sensíveis do que os adultos. Dessa forma, foi estabelecido que a ingestão tolerada estabelecida em 2003 deve-se aplicar também às pessoas de até 17 anos, isso é, com tolerância semanal de 1,6 µg/kg de peso corporal [43].

Em 2010, o JECFA estabeleceu uma ingestão semanal tolerável provisória de mercúrio inorgânico de 4 µg/kg de peso corporal, aplicável à exposição alimentar ao mercúrio total em outros alimentos para além do peixe e marisco [44].

O metilHg é a forma mais tóxica do mercúrio e possui grande interesse em pesquisas devido à capacidade de bioacumulação através da adsorção em corpos superficiais, ingestão de alimentos (principalmente peixes), assim como sua entrada antrópica no ambiente, levando a um acúmulo de até um milhão de vezes ao longo da cadeia alimentar aquática [31,45].

A exposição ao metilHg pode trazer muitas consequências de origem neurológica: distúrbios visuais como visão turva (escotomas), redução do campo visual, baixa coordenação

para andar (ataxia), insensibilidade na pele (parestesia), perda da audição, dor nos nervos (neurestesia), deterioração mental, dificuldade na articulação das palavras (disartria), distúrbio de motilidade, tremor muscular e, nos casos de exposição grave, paralisia e morte [30,45]. Além do mais, os embriões são cinco a dez vezes mais sensíveis ao metilHg do que adultos, levando o metilmercúrio a ser bastante prejudicial ao desenvolvimento embrionário, pois a placenta transporta ativamente esta forma mercurial para o feto [32,40,45].

O processo e adoecimento relacionados à exposição ambiental ao mercúrio é melhor compreendido através de uma matriz causal, a qual agrupa causas distais e proximais em uma cadeia de inferência causal [46]. A Figura 1 exemplifica um modelo de matriz causal para exposição ao mercúrio.

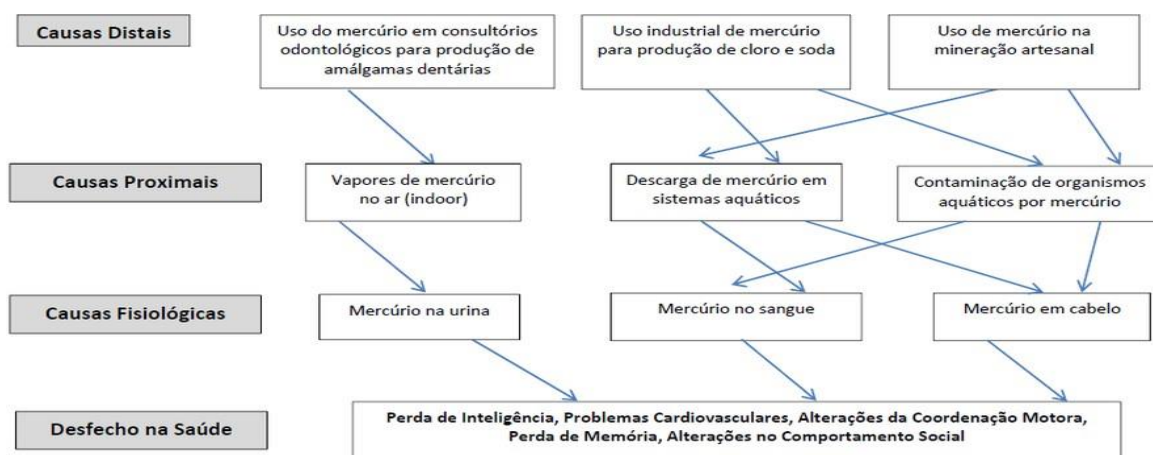


Figura 1: Matriz causal das causas e consequências da exposição humana ao mercúrio. Fonte: [46].

2.2. Ciclo do mercúrio

As principais emissões naturais do mercúrio se devem às atividades vulcânicas, desgaseificação dos solos e corpos d'água, incêndios florestais e emissão de espécies mercuriais voláteis, como na sua forma metálica e o dimetilmercúrio - Hg^0 e $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ – provenientes das reações biológicas, e as principais emissões antropogênicas provêm da queima de combustíveis fósseis, incineração de resíduos, efluentes gasosos e líquidos e da mineração [33,44].

O Hg^0 liberado naturalmente ou de forma antropogênica sofre oxidação através das seguintes formas: interface sólido-líquido (gotículas de chuva, neblina), reações mediadas pelos raios ultravioleta e ozônio e por rompimento de ligações carbono-mercúrio de compostos organomercuriais através de processos químicos e biológicos, tornando-se então divalente

(Hg^{2+}). Este então volta para ambientes aquáticos e terrestre sendo transportado pela água da chuva ou adsorvido a partículas. No ambiente aquático, o Hg^{2+} sofre adsorção principalmente na superfície dos sedimentos, ácidos húmicos, material particulado e argilas, formando então diversas formas de complexos mercuriais e quelantes com a matéria orgânica. O Hg também é metilado por bactérias, transformando-se em metil mercúrio e posteriormente em etil mercúrio na interface água sedimento e também no perifíton sobre as macrófitas aquáticas [44]. O MeHg é então rapidamente absorvido pelos seres aquáticos e assim bioacumulado e biomagnificando [33,36,46,47]. A figura 2 representa de forma resumida o ciclo do mercúrio.

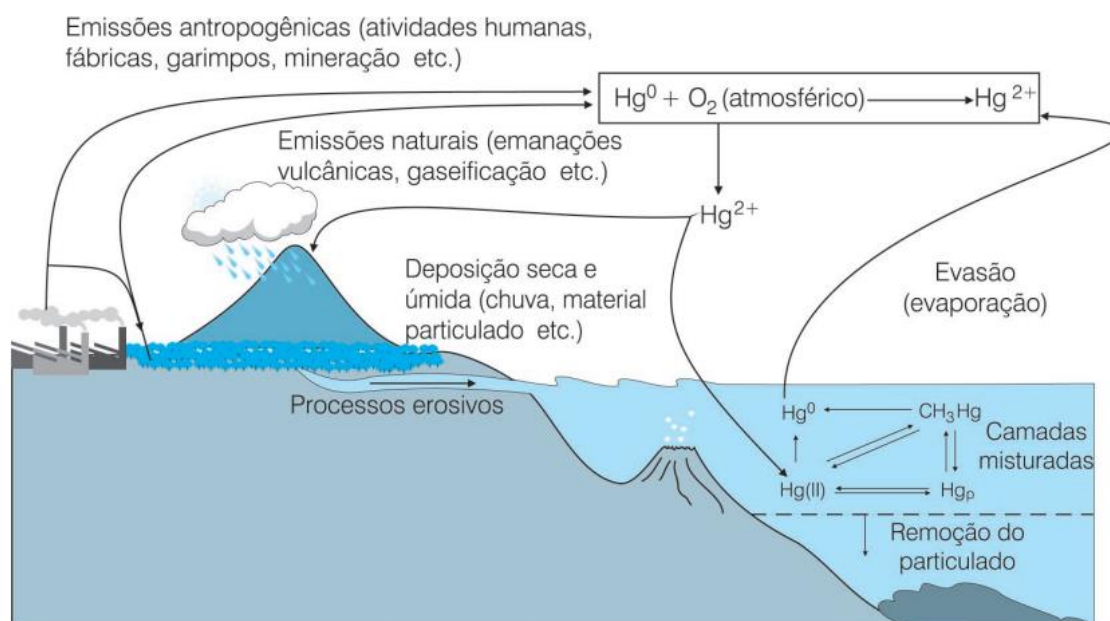


Figura 2: ciclo do mercúrio. Fonte: [48].

2.3. Proteômica e Metalômica

Com o sequenciamento do genoma humano, finalizado em 2003, houve a necessidade de se estudar o sequenciamento de proteínas, pois apenas o sequenciamento do genoma não foi possível solucionar as diversas questões nível molecular, como o funcionamento de doenças ou as reações do organismo quando submetido a diversas situações, e também pelo fato de que genes e proteínas estão relacionados [36].

O termo proteoma, elaborado por Wikins e Willians em 1993, corresponde ao complemento proteico total do genoma [49] enquanto a proteômica corresponde ao estudo das propriedades estruturais e funcionais das proteínas, como as modificações pós-traducionas, nível de expressão e as interações em ampla escala, de forma a conseguir uma visão global dos processos celulares [50,51]. Assim, a proteômica possui muitos campos

de pesquisa envolvendo a identificação de proteínas expressas por um organismo sobre condições específicas (proteômica descritiva), análise de mudanças de expressão proteica associadas com mudanças nas condições ambientais de organismo (proteômica comparativa), estudo de interações proteicas e identificação de proteínas que formam organelas (desenvolvimento de mapa metabólico) [52].

As interações e conexões funcionais de espécies metálicas com proteínas, genes, metabólitos e outras biomoléculas do organismo corresponde à metalômica [53]. A metalômica está relacionada com a genômica e proteômica, pois as funções metabólicas e síntese de genes e proteínas não ocorrem sem a presença de íons metálicos ou metaloenzimas [37].

Os objetivos da metalômica são a análise da distribuição de espécies metálicas e metaloides, assim como o estudo dos aspectos funcionais e fisiológicos das biomoléculas que contenham íons metálicos, como as metaloproteínas e proteínas ligadas a metais [54]. Na metalômica, o termo “metalomas” corresponde aos íons metálicos ou espécies metaloides presentes em um sistema biológico (organismos, fluidos, células ou tecidos) na forma livre ou complexada [55]. Dessa forma, a metalômica é uma importante ferramenta nos estudos de toxicologia ambiental que envolvam metais tóxicos, como o mercúrio [52].

A metalômica, por meio de metodologias analíticas, possui três componentes principais: (i) componente de seletividade: isolamento das espécies alvo da matriz através de técnicas de separação; (ii) componente estrutural: detector específico para moléculas para caracterização; e (iii) componente de sensibilidade: detector sensível para a quantificação dos elementos [36,56].

2.4. Metaloproteômica

Os processos bioquímicos não dependem somente do seu genoma e proteoma, mas também dos metais e metaloides existentes nos diferentes compartimentos celulares, o metaloma [56,57]. Essa distribuição conta com espécies metálicas individuais nas células, sendo inorgânicos (livres e complexados), como também complexos com biomoléculas, especialmente com proteínas, denominado metaloproteoma [56,58]. Assim, a metaloproteômica corresponde à área que procura compreender o papel dos metais em sistemas biológicos, mais especificamente nas proteínas [56,57].

Dessa forma, a metaloproteômica estuda as metaloproteínas e as proteínas ligadas a metais. As primeiras dizem respeito às proteínas cuja função é dependente de metal, o qual

possui alta afinidade na interação metal-proteína. A presença metálica pode estar relacionado à estabilização da estruturas terciária ou quaternária da proteína, ou da dependência do metal para atividades catalíticas, reações redox etc [58-59]. As segundas, dizem respeito à proteínas em que os íons metálicos se ligam a elas através de ligações de baixa-afinidade em ligações não específicas. Em geral, os metais de transição como o cobalto, ferro, zinco, cobre e manganês se ligam mais fortemente às proteínas. De intensidade moderada, estão o cálcio e magnésio. Já os íons monovalentes, como o potássio e sódio, são fracamente ligados [56,57]. Sabe-se que aproximadamente 41% de todas as proteínas/enzimas precisam de um íon metálico para realizarem suas funções [56].

2.5. Técnicas utilizadas na metaloproteômica

2.5.1. Espectrometria de absorção atômica (AAS)

A espectrometria de absorção atômica consiste na absorção de radiação eletromagnética por átomos gasosos livres, produzindo um sinal correspondente mensurável proporcional à concentração de tais átomos presentes no caminho óptico [56].

Um espectrômetro de absorção atômica possui as seguintes partes: lâmpada de cátodo oco (fonte de radiação), a qual emite o espectro do elemento a ser analisado; um sistema de atomização, onde com a ajuda de um nebulizador que opera com a ajuda de gás comprimido, a amostra é nebulizada na forma de um aerossol e leva a formação de átomos livres do analito; um monocromador, que possibilita a escolha do feixe de interesse emitido pela fonte de radiação; e um detector, que transforma o sinal luminoso em um sinal elétrico e o amplifica (figura 3) [56,60].

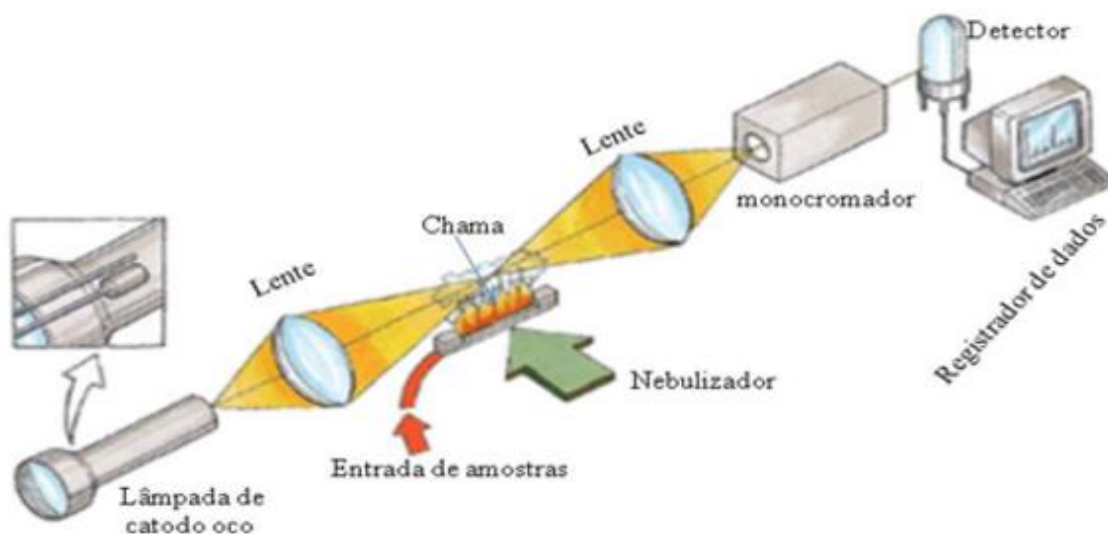


Figura 3: esquema de espectrometria de absorção atômica de chama. Fonte: [adaptado de 61].

A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) é utilizada para análises elementares em níveis de mg L^{-1} . Neste processo, cerca de 95% da amostra é descartada pelo dreno, e a parte que alcança a chama é diluída pelos gases. Já a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno grafite (GFAAS) é utilizado para análises com concentrações em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$, pois todo o analito é aproveitado na análise [56].

2.5.2. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE)

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) consiste em técnica de separação de proteínas em duas dimensões. Na primeira dimensão, as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico, na segunda as proteínas são separadas de acordo com sua massa molecular [56].

Esta técnica possui boa eficácia, podendo ser empregada na caracterização de sistemas biológicos e na seleção de spots proteicos para posterior sequenciamento ou identificação. Ela consiste em um sistema de migração de partículas carregadas em um meio na presença de um campo elétrico contínuo (figura 3) [56,62].

Na primeira dimensão, a amostra de proteína é colocada sobre uma fita de gel de poliacrilamida com um gradiente de pH imobilizado. A fita então é submetida a uma voltagem, fazendo com que haja uma migração proteica pela faixa de pH, até que a carga elétrica das proteínas presentes se iguale a zero, ficando então depositadas em determinada região da fita. O ponto equivalente a uma faixa de pH, onde há equilíbrio entre as cargas positivas e negativas

de uma proteína, é chamado de ponto isoelétrico [32,36,39,47,56,57,63]

Após a focalização por ponto isoelétrico, as fitas são tratadas com tampão contendo SDS (dodecil sulfato de sódio), o qual consiste em um detergente que confere carga negativa às proteínas de forma proporcional à massa molecular delas. Após este procedimento, as fitas são colocadas na região superior dos géis de poliacrilamida, e assim a eletroforese pode ser iniciada (figura 4). Para a separação das proteínas em segunda dimensão, o geis de poliacrilamida são submetidos à alta voltagem e os complexos proteína-SDS migram através do geis [32,36,39,47,57,56,63].

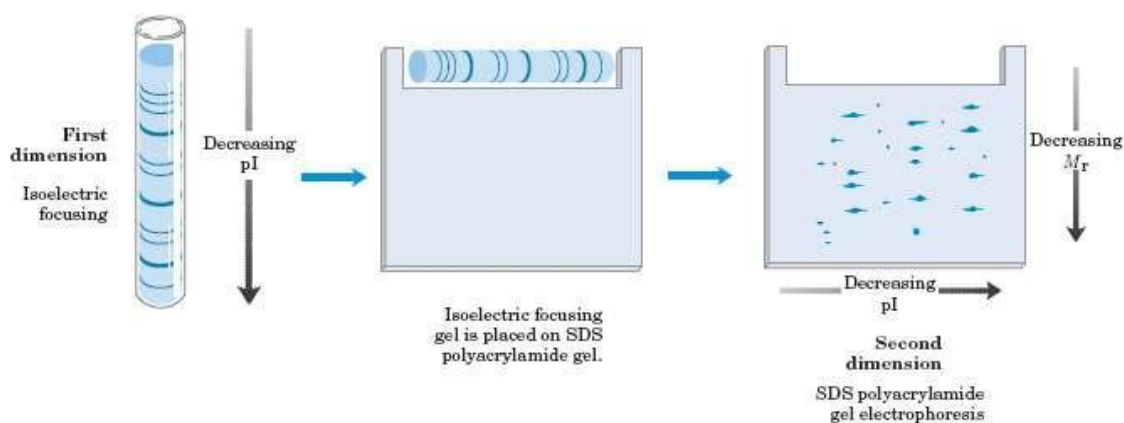


Figura 4: esquema do funcionamento da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE). Fonte: [64].

Após a separação em duas dimensões, os géis precisam passar por processo de fixação e coloração, para que assim os spots, que representarm uma proteína ou conjunto de várias, possam ser melhor detectados e visualizados. Posteriormente, os géis são escaneados e os spots são quantificados de acordo com seu volume, intensidade e área.

Após as análises das imagens, os sptos são retirados do gel, as proteínas passam por processos de eluição e digestão enzimática e em seguida podem ser submetidas à análise de espectrometria de massas para identificação (figura 5).

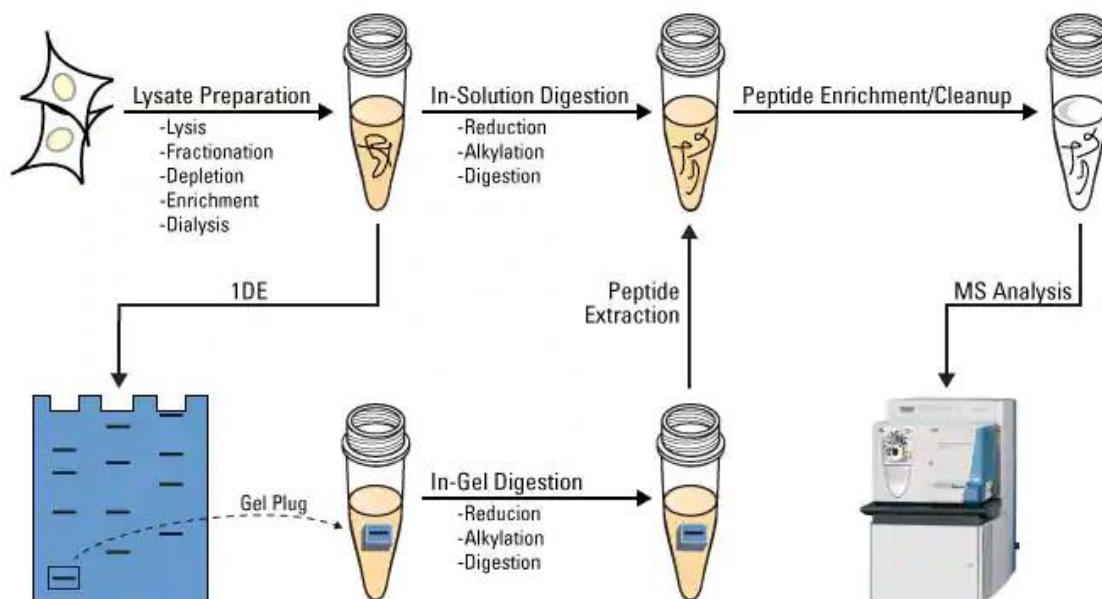


Figura 5: etapas comumente seguidas em análises proteômica: preparação do extrato, digestão e análise por espectrometria de massas. Fonte: [39].

2.5.3. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas permite a detecção, determinação e quantificação de moléculas. Possibilita a detecção de compostos desconhecidos em concentrações muito baixas e em misturas químicas complexas, sendo ela muito eficaz quando se deseja compreender o perfil comparativo entre grupos amostrais, tais como fluidos biológicos [39].

A técnica se baseia na separação de íons positivos ou negativos que são produzidos a partir de átomos ou moléculas, simples ou complexas, de acordo com a razão massa/carga (m/z), e atualmente vem sendo empregada para determinar a composição isotópicas de elementos, análises elementares, estruturas dos compostos orgânicos e análises de misturas orgânicas complexas [56].

Um espectrômetro de massas é composto basicamente por três partes: uma fonte de ionização, um analisador de massas e um sistema de detecção (figura 6).

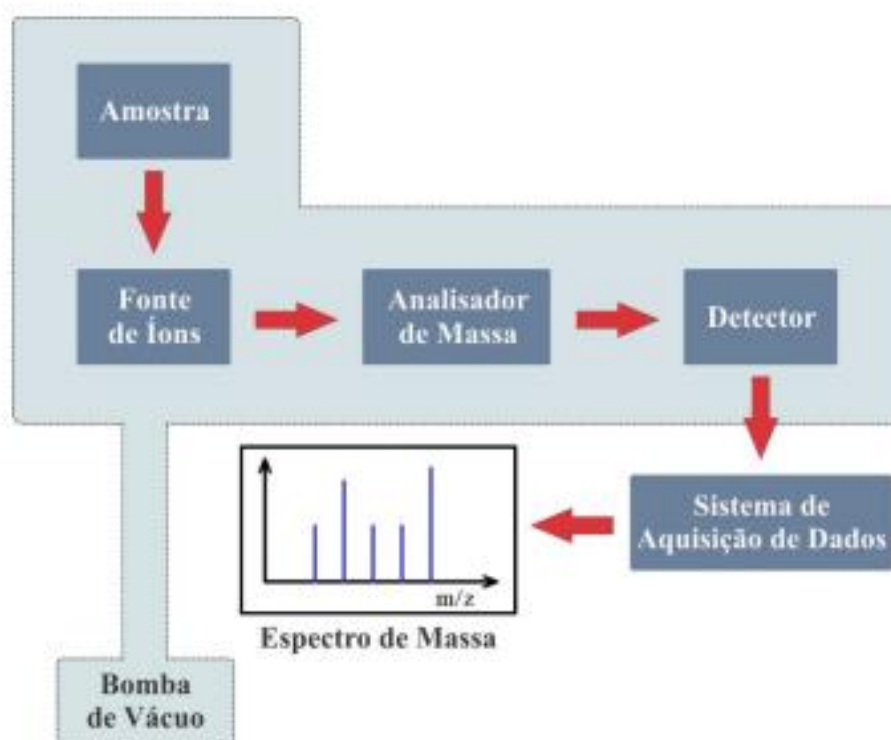


Figura 6: esquema simplificado de um espectrômetro de massas. Fonte: [65].

Entre as técnicas de ionização, destacam-se a Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI) e Ionização por *Electrospray* (ESI). A espectrometria de massas por tempo de voo acoplada à ionização dessortiva da matriz assistida por laser (MALDI-TOF MS) possibilita a obtenção do *fingerprint* de proteínas e peptídeos, assim como a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS MS), que é utilizada para sequenciamento de peptídeos e proteínas correspondentes [58].

A técnica do ESI-MS ocorre através da evaporação do solvente do analito e com a formação de microgotículas em um ponto do campo elétrico, resultando em íons dessolvatados para o interior do analisador de massas. Já a ionização por MALDI depende da co-cristalização do analito com uma matriz em excesso molar. A absorção de energia a laser produz íons carregados em fase gasosa. Dessa forma, surgem inúmeras colisões entre íons e moléculas, formando moléculas monocarregadas que se dirigem ao analisador de massas. [56,65] (figura 7).

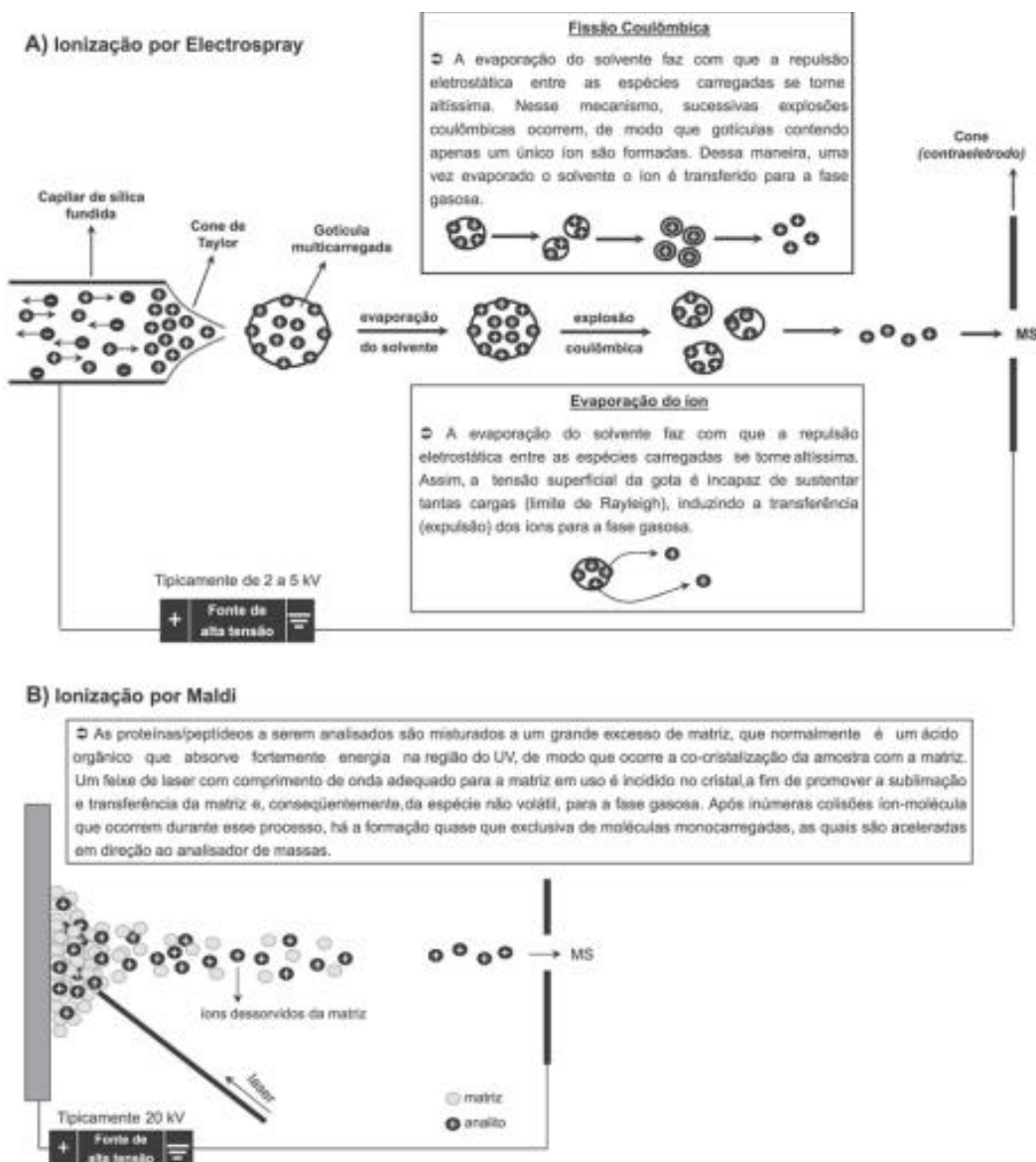


Figura 7: esquema dos modos de ionização largamente empregados aplicados em proteômica. Fonte: [66].

Com base no exposto, os estudos realizados permitiram redigir dois artigos científicos apresentados no capítulo II e III da dissertação. **Capítulo II:** artigo redigido nas normas do periódico Exposure and Health (submetido), apresenta os resultados obtidos na otimização de uma nova metodologia de amostragem de fluídos biológicos utilizando cartões Noviplex para posterior determinação de mercúrio total por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS); **Capítulo III:** artigo redigido nas normas do periódico Biological Trace Element Research (em andamento), apresenta os resultados de estudo metaloproteômico quantitativo do mercúrio em tecido renal de ratos expostos à diferentes tempos de exposição ao cloreto de mercúrio.

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.

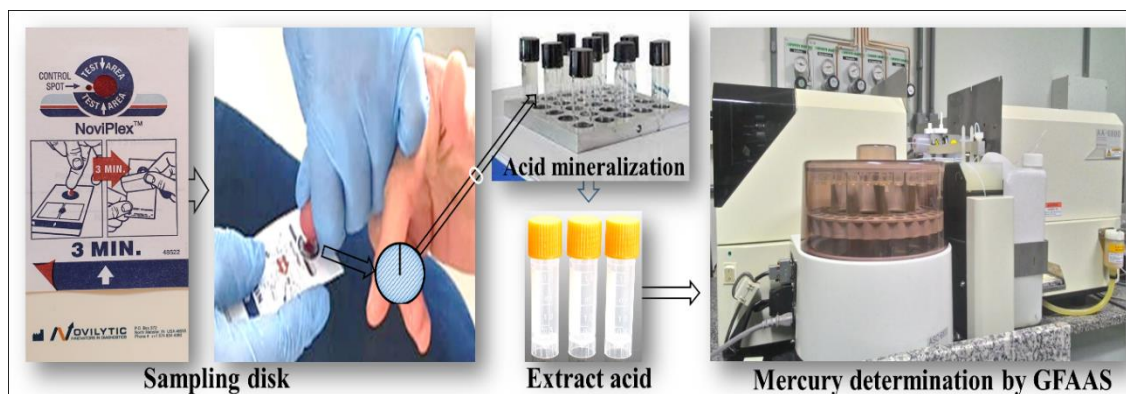
35. GALVÃO, R. C. F. et al. Relação espacial do mercúrio e elementos traços em sedimentos de fundo no Alto Rio Madeira. In: **Seminário de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Paraíba do Sul: o eucalipto e o ciclo hidrológico**. Taubaté: [s.n.], 2007. p. 51 – 57.
36. QUEIROZ, J. V. **Abordagem 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.

CAPÍTULO II - Mercury determinations in biohazard samples by GFAAS using Noviplex card sampling

Graphical Abstract



Abstract

This paper presents a method for sampling biohazardous materials (mercury-contaminated human and fish blood/plasma and muscle and liver tissue homogenates) using percolation on Noviplex cards for total mercury determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). For the sampling process, 50 μL of the biohazardous material was percolated onto the sampling disk of the Noviplex card. Three minutes after percolation of the sample aliquot, the sample adsorbed on the card sampling disk was already dry and showed stability at room temperature for six months. After the sampling process, the card sampling disks with the percolated samples were mineralized in an acidic medium containing 18 mol L^{-1} H_2SO_4 and 0.02 mol L^{-1} KMnO_4 in a 1.0:0.50 (v/v) ratio. Mercury determinations of the acid extracts were performed via GFAAS by injecting 15 μL of sample + 5 μL of zirconium nitrate (chemical modifier) into the graphite tube of the spectrometer, in which the inner wall was coated with tungsten carbide (permanent chemical modifier). The reaction conditions provided thermal stabilization of mercury at atomization temperatures up to 1700 $^{\circ}\text{C}$. The method was 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. The sampling method proved to be quite robust for mercury determinations for samples from blood/plasma, muscle and liver tissue homogenates from fish and for human blood/plasma samples.

Key words: Noviplex cards, mercury in biohazard samples, electrothermal atomization, chemical modifier.

1. INTRODUCTION

Mercury is a highly toxic element that is dangerous, responsible for environmental contamination and human intoxication, and is considered a global pollutant (WHO 2010). It is known that during the colonial period in Spanish America and later in North America, mercury was widely used in amalgamation processes for gold and silver mining (Pfeiffer et al. 1993). Intoxication symptoms related to mercury exposure in humans vary depending on the mercury chemical form to which they are exposed, which can cause serious to irreversible damage to the urinary, respiratory, immune, reproductive and central nervous systems (Bidone et al. 1997; Zahir et al. 2005; Ceccatelli et al. 2010; Syversen and Kaur 2012; Farina et al. 2013; Faial et al. 2015)

Sample collection and preparation is one of the most important steps in the process for monitoring mercury toxicity in biological samples. In recent decades, several strategies for sample preparation and subsequent mercury determinations have been published (Bermejo-Barrera et al. 1994; Gallignani et al. 1998; Bermejo-Barrera et al. 1999; Moreda-Piñeiro et al. 2002; Torres et al. 2005; Zhang et al. 2012; Moraes et al. 2013; Queiroz et al. 2018). However, the difficulties related to sampling of biological materials *in situ* and subsequent determination by manipulating the sample as little as possible have not yet been overcome.

In this context, the *Noviplex*TM card system developed by Kim and collaborators (Kim et al. 2013) is an innovative biological fluid collection device that can be used to collect blood aliquots and/or biological extracts. Its viability lies in the sophisticated collection method, which does not require special bottles, equipment, or refrigeration, and in the ability to transport samples without losing the physical and chemical properties of the material. An absorbent disc is saturated with the sampled biological fluid and percolation occurs within three minutes through capillary action, making it possible to transport the cards economically and with minimal biohazard risk to a central laboratory for further analysis, e.g., for mercury.

To overcome the difficulties of mercury sampling, the present study is designed to optimize and validate sampling processes for blood/plasma and homogenates of muscle and liver tissue from mercury-contaminated fish by using the *Noviplex*TM card system. The card sampling disks are subjected to mineralization by using an acid mixture with chemical modifiers and then used for mercury quantification by GFAAS.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Sampling procedures with Noviplex cards

The Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation and Authorization and Information System on Biodiversity (ICMBio; Ref. SISBIO 43890-1), Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA), protocol number 0186/2017 and National Research Ethics Commission - NREC, under CAAE No. 43167420.7.0000.5411, authorized this research.

2.1.1. Blood

The sampling procedure was utilized with fish species from the Madeira River, Rondônia/Brazil, which is contaminated by mercury, and with volunteers from the riverside population of the Jirau region - Madeira River, Rondônia/Brazil (colocar coordenadas). The fish species studied were captured at six points along the Madeira River, called Abunã (S 09°47'18.3"; W 065°31'12.4"), Cotia (S 09° 40'43.8"; WE 064° 58'51.01"), Mutum (S 09° 41'0.06"; WE 064° 58'43.9"), São Lourenço (S 09°23'26.5"; W 064° 53'05.7") and Rau (S 09°16'12.8"; W 064°41'14.1"), located upstream of the Jirau and Karipunas plant (S 09° 11'16.98"; W 064° 36'44.53") located downstream of the Plant.

After collecting the fish, aliquots of blood were collected from the tails of the animals at the collection site (still on the boat) and percolated onto the sampling disks of the Noviplex cards. The collected aliquots of blood (50 µL) were applied directly to the "test area" on the top layer of the Noviplex card extraction plate. After approximately one minute, a "checkpoint" on the side of the application site changed from white to red, indicating that lateral spreading had occurred and that there was a sufficient volume for the application. After three minutes, the top layer of the extraction plate was peeled off to expose the collection disk, which was adhered to a base plate and contained the stored sample. The sample on the collection disk was dried for approximately 15 minutes and stored at room temperature for further analysis (Kim et al. 2013). In total, 24 blood samples were collected from each fish species and humans (volunteers from the riverside population Madeira River).

2.1.2. Plasma eluates muscle and liver tissue homogenates

Samplings of muscle and liver tissue homogenates were performed by using the

following procedure: Approximately 40 mg samples were collected from muscle and/or liver tissue pools of each fish species and homogenized in 500 μL of buffer NP-40 (50 mmol L^{-1} NaCl – Merck, 50 mmol L^{-1} Tris-HCl - GE Healthcare, pH 8) and centrifuged for 10 minutes at 10,000 rpm and 4 °C, from which the protein extracts were obtained. Subsequently, 50 μL aliquots of protein extract were transferred to the Noviplex card collection disk and allowed to dry for 15 minutes. This procedure was also adopted for plasma elution from the disks of the Noviplex cards used in the collection of blood samples. In total, 12 cards were prepared per pool of protein extracts (muscle and liver) from each fish species (*Semaprochilodus sp.*, *Serrasalmus rhombeus*, *Arapaima gigas*, *Argyrosomus regius*, *Colossoma macropomum*). The cards were stored at room temperature until further analysis. For the plasma samples, of the 24 Noviplex cards used in sampling the blood of fish and humans, 12 were used for plasma elution from the Noviplex card sampling discs. Validation of the sampling methodology using Noviplex cards for determination of total mercury in biological fluid was carried out with extracts from trace metal reference materials DORM 4 - fish protein and DOLT 4 - fish liver, which were certified by the National Research Council Measurement Science and Standards, Ottawa/Canada to contain $0.410 \pm 0.055 \text{ mg kg}^{-1}$ and $2.58 \pm 0.22 \text{ mg kg}^{-1}$ of total mercury, respectively.

2.2. Mineralization process with Noviplex card sampling discs and plasma eluates

For determinations of total mercury in the blood samples, plasma eluates muscle and liver tissue homogenates of the fish were collected on Noviplex cards, acid mineralization of the sampling discs and plasma eluates was carried out with an oxidizing mixture containing 18 mol L^{-1} H_2SO_4 (Merck) + 0.02 mol L^{-1} KMnO_4 (Merck) in a 1.0:0.5 (v/v) ratio while heating in the range 60 °C to 120 °C in a digester block until the extracts were transparent and showed a light purple color. The acid extracts obtained were transferred to 5 mL volumetric flasks, diluted with ultrapure water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtained from a PURELAB Ultra ELGA purification system. Subsequently, the total mercury concentrations in the extracts were determined by GFAAS according to the procedure described in Section 2.3.

2.3. Total mercury determination

Total mercury determinations for acid extracts obtained via mineralization of the sampling disks from the Noviplex cards were carried out by GFAAS using a SHIMADZU model AA-6800 atomic absorption spectrometer equipped with a background absorption corrector with a deuterium lamp, a pyrolytic graphite integrated platform and an ASC-6100 autosampler. A SHIMADZU mercury hollow cathode lamp was used with a current of 12 mA. The wavelength was 253.7 nm, and the spectral resolution was 0.5 nm. Argon was used as the inert gas, and a constant flow of 1 L min⁻¹ was maintained throughout the heating program, except during the atomization step, when the gas flow was interrupted. Absorbance signal peak areas were measured. The pyrolytic graphite tubes with the integrated platforms used for mercury determinations had their internal walls coated with tungsten to increase their useful life according to the procedure described by Silva *et al.* (Silva *et al.* 2007).

2.3.1. Analytical curve preparation

An analytical curve was prepared by using a Merck standard mercury stock solution and subsequent dilutions to obtain total mercury concentrations ranging from 0.25 to 2.00 µg L⁻¹. Zirconium nitrate was added to the standard solutions to give final concentrations of 20 mg L⁻¹ zirconium, which acted as a chemical modifier (Bittarello *et al.* 2019). Then, 20 µL of the standard solution was injected into the graphite tube of the spectrometer coated with tungsten carbide (Silva *et al.* 2007) by using a micropipette of the autosampler. Absorbance measurements were performed in triplicate. The graphite tube heating program optimized for mercury determination is described in Table 1.

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

Steps	Temperature (°C)	Stages		Argon Flow (L min ⁻¹)
		Ramp (s)	Heating (s)	
Drying	90	5	5	1
Drying	120	5	5	1
Pyrolysis	400	6	6	1
Pyrolysis	800	6	10	1
Atomization	1700	3	0	0
Cleaning	1900	5	5	1

2.3.2. Analytical procedures for sample analyses

The total mercury determinations used 20 μL aliquots obtained by mixing 10 μL of the acid extract from the Noviplex card sampling disc with 4 μL of 100 mg L^{-1} zirconium nitrate and 6 μL of ultrapure water. The 20 μL aliquots were injected into the graphite tube coated with tungsten carbide using the spectrometer autosampler (Moraes et al. 2013; Queiroz et al. 2018). Measurements were made with three repetitions and used the graphite tube heating program shown in Table 1.

2.4. Statistical analyses

The results of the mercury determinations were expressed as the mean $\pm$ standard deviation and analyzed with Student's t test and the F test in SAS statistical software version 8 to verify significant differences. The level of significance used was 5% ($P < 0.05$) (Moraes et al. 2013; Queiroz et al. 2018; Bittarello et al. 2019).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Optimization of instrumental parameters

The mercury thermal stabilization temperatures used for pyrolysis of acid extracts obtained from mineralization of the Noviplex card sampling disks and in the mercury atomization process were investigated. For this, the absorbance signals obtained for mercury in a standard solution containing 1.50 $\mu\text{g L}^{-1}$ and in the acid extracts of the samples were compared. The results are shown in figure 1.

Fig. 1a

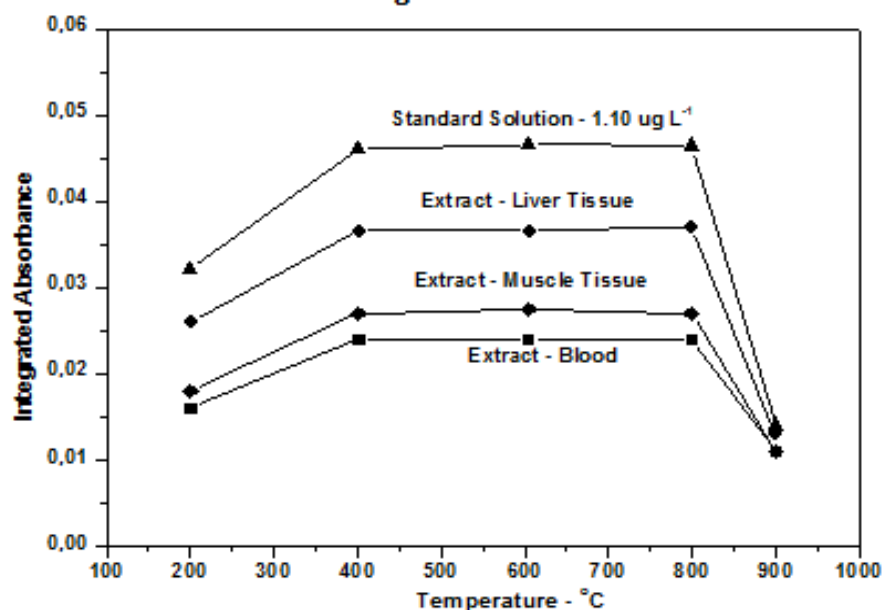


Fig. 1b

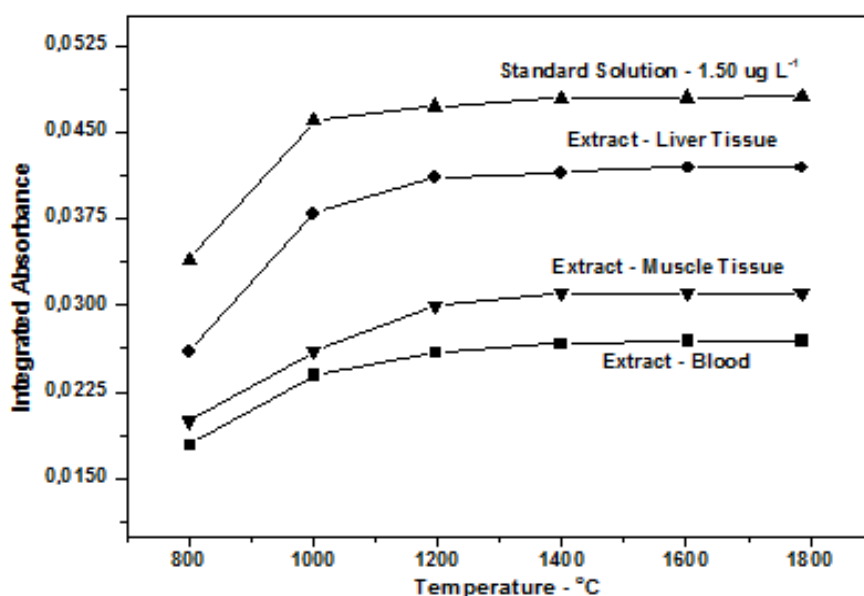


Figure 1: Pyrolysis (1a) and atomization (1b) curves obtained for acid samples extracted from Noviplex card sampling discs and from a standard solution containing 1.50 $\mu\text{g L}^{-1}$ mercury.

A pyrolysis temperature of 700 °C was chosen because, as shown in Figure 1a, the absorbance signals obtained for mercury remained constant above 400 °C and exhibited rapid decreases after treatment above 800 °C, which indicated that other components of the sample solution and/or standard solution were pyrolyzed (Moraes et al. 2013). Regarding the

atomization temperature (Figure 1.b), it was observed that the absorbance peaks obtained for mercury were constant after heating within the range 1300°C to 1800 °C. Considering this, the atomization temperature chosen was 1700 °C. The good thermal stability of mercury obtained in these experiments demonstrated the efficiency of zirconium nitrate, which acted as a chemical modifier.

It is possible that the gradual increase in temperature (1000-1800 °C) caused formation of intermetallic bonds between mercury and zirconium during reduction of Hg to the elemental state, which would require a significant increase in the temperature of mercury volatilization and, consequently, of the atomization temperature (Silva et al. 2007; Bittarello et al. 2019). In addition, it should be noted that in mineralization of the Noviplex card sampling disks, the extracts showed a slightly purple color, indicating the presence of permanganate ions in the solution. Thus, in the graphite tube heating process, the permanganate ions were reduced to MnO₂, which, together with the tungsten carbide film deposited on the graphite tube wall (permanent chemical modifier), may have contributed to the thermal stabilization of mercury.

3.2. Optimization of the analytical curve

After optimizing the pyrolysis and atomization temperatures, an analytical curve was obtained for concentrations ranging between 0.25 and 2.00 µg L⁻¹. The analytical curve for mercury is shown as Equation 1 (with a linear correlation coefficient of 0.9990):

$$\text{Conc. (Hg - } \mu\text{g L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Abs.} - 0.00086}{0.05106} \quad (1)$$

The absorbance values obtained for the mercury standards (n=3) showed good repeatability and reproducibility (relative standard deviations less than 2%), which reinforced the efficiency of adding zirconium nitrate, manganese dioxide and tungsten carbide as chemical modifiers for thermal stabilization of mercury during pyrolysis and atomization with the heating program used. The characteristic mass calculated for the 1.50 µg L⁻¹ of mercury standard was 1.93 pg, and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for mercury were 0.016 and 0.052 µg L⁻¹, respectively; these were calculated by considering the standard deviation from 10 measurements of the blank and standard solutions and the slope of the analytical curve (LOD = 3σ/slope and LOQ = 10σ/slope) (Currie 1999). The lifetime of the graphite tube was equivalent to 467 burns, which confirmed that the mineralization method used with the disks

of the Noviplex cards and the eluates of the plasma samples was efficient for digestion of organic matter and preserved the analyte contained in the aqueous extract.

3.3. Application of the proposed method in determinations of total Mercury

The sampling method using Noviplex cards was applied to total mercury determinations for a pool of blood samples and extracts from muscle and liver tissue from corvine (*Argyrosomus regius*), jaraqui (*Semaprochilodus sp.*), pirarucu (*Arapaima gigas*), piranha preta (*Serrasalmus rhombeus*) and tambaqui fish (*Colossoma macropomum*) species from the Amazon region and for blood samples from the riverside population of the Jirau/Rondônia region located on the margins of the Madeira River in the Brazilian Amazon, a region highly impacted by mercury due to gold mining (Bittarello et al. 2020). 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. The results are summarized in Tables 2 and 3.

Table 2.

Samples	Jaraqui fish ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Piranha Preta fish ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Pirarucu fish ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Corvina fish ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Tambaqui fish ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Certified materials ^a (mg kg^{-1})
Muscle	66 $\pm$ 1.12	272 $\pm$ 5.20	189 $\pm$ 3,30	72 $\pm$ 1.30	62 $\pm$ 1.11	
Liver	113 $\pm$ 2.03	470 $\pm$ 8,35	341 $\pm$ 6.05	283 $\pm$ 5.10	202 $\pm$ 3.60	
Plasma	4.40 $\pm$ 0.08*	6.60 $\pm$ 0.11*	5.10 $\pm$ 0.08*	5.70 $\pm$ 0.09*	4.60 $\pm$ 0.08*	
Blood	5.46 $\pm$ 0.09*	8.20 $\pm$ 0.14*	6.30 $\pm$ 0.11*	7.10 $\pm$ 0.12*	5.60 $\pm$ 0.10*	
DORM-4	-	-	-	-	-	0.402 $\pm$ 0.007
DOLT-4	-	-	-	-	-	2.54 $\pm$ 0.04

*Concentration - $\mu\text{g kg}^{-1}$; Fish Liver DOLT 4 - Certified Concentration = 2.58 $\pm$ 0.22 mg kg^{-1} .

Table 3.

Riverside population groups	Blood pool samples ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Plasma pool samples ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Group 1	0.84 $\pm$ 0,07	0.64 $\pm$ 0.05
Group 2	1.17 $\pm$ 0,05	0.89 $\pm$ 0.04
Group 3	3.43 $\pm$ 0,20	2.60 $\pm$ 0.14
Group 4	10.0 $\pm$ 0,41	7.60 $\pm$ 0.27

The muscle, liver tissues, the blood and plasma samples of the fish species studied showed mercury concentrations ranging from 63 to 470 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 4.40 to 8.20 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. These results are in agreement with literature values determined using GFAAS and direct acid mineralization of tissue samples (Braga et al. 2015; Vieira et al. 2017; Queiroz et al. 2028; Bataglioli et al. 2019; Bittarello et al. 2020). The results for mercury determinations of blood samples from the riverside population, the Madeira River/Brazilian Amazon (Table 3), were in the range 0.84 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. In the plasma samples eluted from the sampling disks of the Noviplex cards, the concentrations were in the range 0.64 a 7.60 $\mu\text{g L}^{-1}$; these concentrations are approximately 24% lower compared to the results obtained for blood samples. It is noteworthy that the total mercury levels determined for the pooled blood and plasma samples showed a gradual increase with increasing frequency of fish ingestion by the volunteers of the riverside population, who were divided into the following groups: *pool 1* - group of volunteers who eat fish three times a month; *pool 2* - group of volunteers who eat fish three times a week; *pool 3* - group of volunteers who eat fish up to six times a week; *pool 4* - group of volunteers who eat fish daily. Thus, a positive correlation was observed between bioaccumulation of mercury and consumption of fish by the volunteers from the riverside population of the Jirau region – the Madeira River/Brazilian Amazon. The values obtained for total mercury concentration in the DORM-4 and DOLT-4 certified materials (Table 3) showed differences of less than 2% when compared to the certified values. Method precision was determined from the relative standard deviations in mercury concentrations determined for the DORM-4 and DOLT 4 NRCs using the HORRAT parameter (Horwitz and Albert 1997; McClure and Lee 2003), these values were 1.40% and 1.20%, respectively. The LOD and LOQ calculated by using 20 mg of DROM-4 and/or DOLT-4 NRCs were 12 and 39 mg kg^{-1} and 13 and 43 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The mercury values determined for blood/plasma and muscle and liver tissue samples from fish (Table 2) and in human blood/plasma samples (Table 3) were higher than the LOQs of the Noviplex card sampling method, attesting to the viability of the method for sampling biohazardous materials.

4. CONCLUSIONS

The sampling procedure used for biohazardous materials (blood plasma from humans, and blood, plasma and extracts from muscle and liver tissues of fish) proved to be effective for determining total mercury by GFAAS after optimizing the experimental conditions of the analysis. The advantage of the proposed method is that there is no need to refrigerate the

samples because the volume percolated on the card disk is stable at room temperature; this eliminates the need for complicated logistics to preserve frozen samples. The use of zirconium nitrate, tungsten carbide and manganese dioxide as a chemical modifier provided thermal stabilization of mercury up to the atomization temperature of 1700 °C in determinations by GFAAS, which enabled determination of mercury at ppb levels ($\mu\text{g L}^{-1}$ and/or $\mu\text{g kg}^{-1}$) in biohazardous materials contaminated with mercury.

REFERENCES

- BATAGLIOLI, I. C. et al. (2019) Physiological and functional aspects of metal-binding protein associated with mercury in the liver tissue of pirarucu (*Arapaima gigas*) from the Brazilian Amazon. **Chemosphere** 236:124320.
- 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.
- 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.
- BIDONE, E. D. et al (1997) Fish contamination and human exposure to mercury in Tartarugalzinho River, Amapá state, Northern Amazon, Brazil. A screening approach. **Water, Air and Soil Pollution**, 97:9–15.
- Bittarello A. C. et al. (2019) Characterization of molecular biomarkers of mercury exposure to muscle tissue of *Plagioscion squamosissimus* and *Colossoma macropomum* from the Amazon region. **Food Chemistry** 276:247-254.
- BITTARELLO A.C. et al. (2020) 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**. 711:134547.
- Braga C. P. et al. (2015) Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. **Talanta** 132:239-244.
- CECCATELLI, S; DARÉ, E; MOORS, M. (2010) Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chem Biol Interact**. 88:301–8.

- CURRIE L. A. (1999) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Analytica Chimica Acta** 391:105–126.
- FAIAL, K. et al. (2015) 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.** 30:66–76.
- FARINA, M. et al. (2013) Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. **Neurochem Int.** 62(5):575–94.
- 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.
- Horwitz W; Albert R (1997) **The concept of uncertainty as applied to chemical measurements.** *Analyst* 122:615–617.
- KIM J. H. et al. (2013) Simple, miniaturized blood plasma extraction method. **Analytical Chemistry** 85(23):11501-11508.
- MCCLURE F.D; LEE J-K. (2003) Computation of HORRAT Values. **Journal of AOAC International** 86:1056-1058.
- 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.
- MORAES, P. M. et al. (2013) GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. **Food Chemistry** 141:2614–2617.
- 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.
- PFEIFFER, W. C. et al (1993) Environment fate of mercury from gold mining in the Brazilian **Amazon Environmental Reviews** 1:26–37.
- QUEIROZ, J. et al. (2018) Total mercury determination in muscle and liver tissue samples from Brazilian Amazon fish using slurry. **Biological Trace Element Research**, 184:517-522.
- SILVA F.A. et al. (2007) Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. **Chemosphere** 68:1542–1547.

SYVERSEN, T; KAUR, P. (2012) The toxicology of mercury and its compounds. **J Trace Elem Med Biol.** 26:215–26.

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.

VIEIRA, J. C. S. et al (2017) Identification of protein biomarkers of mercury toxicity in fish. **Environmental Chemistry Letters** 15:717-724.

World Health Organization. Children's Exposure to Mercury Compounds. World Health [Internet]. 2010;1–112.

ZAHIR, F. et al. (2005) Low dose mercury toxicity and human health. **Environ Toxicol Pharmacol.** 20(2):351–60.

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.

CAPÍTULO III – Abordagem metaloproteômica na investigação do tecido renal de ratos expostos ao mercúrio

Resumo

Os objetivos do presente estudo foram identificar proteínas associadas ao mercúrio e diferencialmente expressas em tecido renal de ratos expostos a baixas concentrações de mercúrio e elucidar os aspectos fisiológicos e funcionais das Hg-metal binding protein. Para isso, foi realizada análise metaloproteômica do tecido renal de ratos Wistar expostos ao cloreto de mercúrio (concentração = $4,60 \mu\text{g kg}^{-1}$ em Hg^{2+}) durante trinta dias (grupo Hg-30) e sessenta dias (grupo Hg-60). O perfil proteômico do tecido renal dos ratos foi obtido por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e as determinações de mercúrio total no tecido renal, *pellets* e *spots* proteicos, foram realizadas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). Os *spots* proteicos associados ao mercúrio foram caracterizados por espectrometria de massa em sequência acoplada à cromatografia líquida (LC-MS/MS). As determinações por GFAAS indicaram uma bioacumulação de mercúrio total de 852 % no grupo Hg-30 e 1.313 % no grupo Hg-60, e 11 *spots* proteicos associados ao mercúrio com faixa de concentração de 79 ± 1 a $750 \pm 9 \text{ mg kg}^{-1}$ nos géis 2D PAGE do tecido renal do grupo Hg-60. Análises de expressão por programas de bioinformática após a Shotgun - LC-MS/MS permitiram a identificação de 53 proteínas que se expressaram somente no grupo Hg-60, 13 proteínas “upregulated” (“p” > 0,95) e 47 proteínas “downregulated” (“p” < 0,05). Das proteínas únicas, com “upregulated” e “downregulated” identificadas, observou-se que: isoformas 2, 4 e 7 da *GST Mu*, a *GPx*, a *Heat shock 70 kDa protein 1-like*, a *Heat shock protein beta-1*, a *actin_ alpha cardiac muscle 1*, as isoformas 1 e 2 da *Actin_ cytoplasmic*, a *Actin_ gamma-enteric smooth muscle*, a *Actin_ aortic smooth muscle*, a *Actin_ alpha skeletal muscle*, as isoformas beta 1, 2 e alfa $\frac{1}{2}$ da *Hemoglobin subunit*, apresentam características de potenciais biomarcadores de exposição ao mercúrio. Destaca-se que isoformas da *actin* e as isoformas da *Hemoglobin subunit* foram também identificadas em *spots* proteicos do grupo Hg-60 com concentrações da ordem de 138 a 750 mg kg^{-1} , o que reforça a qualificação dessas proteínas como potencial de biomarcador de exposição às espécies mercuriais.

Palavras-chave: análise de expressão, bioacumulação de mercúrio, biomarcadores de exposição ao mercúrio, espécies mercuriais.

1. INTRODUÇÃO

Os metais tóxicos como chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio estão presentes em várias formas no meio ambiente. Os seres humanos e animais podem ser intoxicados por esses xenobióticos principalmente por meio do consumo de alimentos e água contaminada (Rana et al., 2018). No caso do mercúrio, seus compostos ou espécies mercuriais provocam efeitos deletérios à saúde humana e animal por diferentes mecanismos, tais como: interrupção da formação de microtúbulos, alterando o equilíbrio de cálcio intracelular e o potencial de membrana, alterando a integridade da membrana celular, perturbando ou inibindo enzimas, induzindo estresse oxidativo, inibição da síntese de proteínas e DNA e perturbando as funções imunológicas (Rafati-Rahimzadeh et al., 2014). Ao serem absorvidas pelo organismo, as espécies mercuriais se ligam principalmente a grupos sulfidrilas, mas também a grupos fosforil, carboxil e amida em moléculas biológicas (Rana et al., 2018; Rafati-Rahimzadeh et al., 2014; Nelson et al., 2011).

As espécies mercuriais orgânicas (metil/dimetilmercúrio) apresentam maior toxicidade ao organismo, podendo induzir estresse oxidativo e consequentemente gerar radicais livres cansando neurotoxicidade. Existe também relatos que o metilmercúrio promove o acúmulo neurotóxico de aspartato, serotonina e glutamato (Rafati-Rahimzadeh et al., 2014; Yee and Choi, 1996).

Em relação ao sistema nervoso central (SNC), um provável mecanismo de atuação das espécies mercuriais seria a conversão de metilmercúrio a forma inorgânica, que posteriormente se ligariam a moléculas dos grupos sulfidrilas. No entanto, as formas orgânicas e inorgânicas apresentam alta afinidade por grupos sulfidrilas de proteínas, como por exemplo a albumina, cisteína, metionina entre outras (Davidson et al., 2004, Braga et al., 2015). Exposições leves por longos períodos ou alta exposição dos organismos aos compostos e/ou espécies mercuriais causam sintomas agudos no Trato Gastrointestinal (TGI), neurotoxicidade tardia e destruição das células nervosas (Yee and Choi, 1996; Davidson et al., 2004; Nelson et al., 2011; Rafati-Rahimzadeh et al., 2014).

A mudança de cor das mucosas, dor orofaríngea, náuseas, vômitos, diarreia sanguinolenta, cólica abdominal e disfunção renal são os principais sintomas de intoxicação por compostos inorgânicos de mercúrio (Asano et al., 2000; Rafati-Rahimzadeh et al., 2014). Ao serem absorvidos pela corrente sanguínea, cerca de 90% das espécies inorgânicas de mercúrio

são acumuladas no tecido renal, no caso, são absorvidos e acumulados nos túbulos proximais dos rins (Verma et al., 2010; Park and Zheng, 2012; Rafati-Rahimzadeh et al., 2014). Os principais sintomas da intoxicação são poliúria e proteinúria, que indicam dano tubular nos rins. No caso de intoxicação grave, pode ocorrer síndrome nefrótica e anúria, e em intoxicações crônicas pode ocorrer nefropatia membranosa (Li et al., 2010; Rafati-Rahimzadeh et al., 2014).

O rim, por ser a principal via de excreção dos organismos, é mais suscetível à toxicidade de metais tóxicos, principalmente ao chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio. Além disso, dependendo da dose e do tempo de exposição, os metais tóxicos podem potencializar a toxicidade em sítios intracelulares do fígado e rim (Rana et al., 2018). Estudo de exposição de cloreto de mercúrio em ratos demonstrou uma distribuição não uniforme após a absorção dos íons Hg^{2+} que se acumulam principalmente nos rins, causando insuficiência renal aguda. No caso, os íons Hg^{2+} se acumulam nas células tubulares proximais renais e induzem lesão celular por ligação e inibição de enzimas contendo grupos sulfidril (Hazelhoff et al., 2012). O acesso as células tubulares pelos íons Hg^{2+} ocorre principalmente por meio de aminoácidos transportadores na membrana plasmática luminal e por ânions orgânicos transportadores (Oat1 e Oat3) na membrana plasmática basolateral (Hazelhoff et al., 2012; Rana et al., 2018). A ligação do Hg^{2+} aos grupos sulfidrilas das enzimas provoca a inativação destas devido a oxidação dos grupos sulfidrilas, resultando na depleção do conteúdo total de grupos sulfidrilas e estresse oxidativo (Zalups, 2000; Rana et al., 2018). A inativação de enzimas com grupos sulfidrilas afeta a integridade celular e consequentemente interrompe o potencial de membrana e o volume das células e organelas celulares (Kade and Joseph, 2012; Boroushaki et al., 2014; Rana et al. 2018).

De forma geral, os estudos de absorção e toxicidade de espécies mercuriais por organismo humano e animal em sua maior parte são centrados em monitoramento das concentrações das espécies mercuriais e a correlação com estudo histoquímicos e de expressão gênica. Estudos utilizando ferramentas proteômicas e bioanalíticas, que podem permitir a obtenção de informações pós-traducionais relacionadas com a toxicidade de espécies mercuriais, ainda são poucos. Nesse contexto, a metaloproteômica, linha de pesquisa que consiste na integração de estudos analíticos e bioquímicos, tem contribuído no esclarecimento dos aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas e/ou *metal binding proteins* responsáveis por inúmeros processos biológicos e funções moleculares (Lima et al, 2010; Moraes et al., 2012; Braga et al., 2015; Vieira et al., 2017; Vieira et al., 2018). Em estudos relacionados com a toxicidade de espécies mercuriais, a proteômica permite a identificação de

proteínas diferencialmente expressas em *spots* e pools proteicos, frente a exposição humana e animal às espécies de mercúrio, fornecendo informações em relação à elucidação dos mecanismos de absorção do mercúrio por organismos vivos (Bataglioli et al., 2019; Bittarello et al., 2020).

Com base no exposto, o presente trabalho tem como objetivo fracionar e analisar o proteoma do tecido renal de ratos Wistar expostos a baixas concentrações de cloreto de mercúrio para posteriormente caracterizar possíveis biomarcadores associados à frequência de exposição ao mercúrio utilizando estratégias metaloproteômicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Experimentação animal

A experimentação animal foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) conforme o processo de número do protocolo 1179-CEUA. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UNESP - Câmpus de Botucatu e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas/IBB-UNESP Câmpus de Botucatu.

A etapa consistiu na criação de 36 ratos (*Rattus norvegicus*) machos da raça Wistar, com aproximadamente 40 dias de idade e com peso médio de 250 g. Os animais foram mantidos em um ambiente em temperatura e fotoperíodo controlados, 25 ± 2 °C e ciclos de 12:12 horas de claro/escuro, respectivamente. A ração administrada foi comercial e água filtrada, ambas *ad libitum*. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle 30 dias (C30, n = 8), controle 60 dias (C60, n = 8), mercúrio 30 dias (M30, n = 10) e mercúrio 60 dias (M60, n = 10). Os grupos controles (30 e 60 dias) receberam dose inicial de $4,60 \mu\text{g kg}^{-1}$ de solução salina a 1% (m/v) durante 30 e 60 dias respectivamente e doses semanais de $0,49 \mu\text{g kg}^{-1}$ para reposição de perdas diárias. Os grupos expostos ao mercúrio (30 e 60 dias) receberam dose de $4,60 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cloreto de mercúrio (no caso, $4,60 \mu\text{g kg}^{-1}$ em Hg^{2+}) na primeira semana e doses semanais subsequentes de $0,49 \mu\text{g kg}^{-1}$ para reposição de eventuais perdas diárias (3 doses de $0,49 \mu\text{g kg}^{-1}$ nas semanas posteriores para grupo de 30 dias, e 7 doses de $0,49 \mu\text{g kg}^{-1}$ nas semanas posteriores para grupo de 60 dias). Ambas as soluções, salina e de cloreto de mercúrio, foram aplicadas uma vez por semana via intraperitoneal.

2.2. Coleta e precipitação da fração proteica das amostras de tecido renal

Ao final do experimento, os respectivos grupos foram pesados e em seguida anestesiados (cloridrato de cetamina 10%, 0,10 mL/100g de peso corporal, i.p.) e eutanasiados. As amostras de tecido renal foram coletadas em frascos polipropileno de 5 mL e armazenadas em freezer a -80 °C. O processo de extração proteica das amostras de tecido renal foi realizado utilizando 400 mg de um *pool* dos tratamentos controle e experimentais (C-60 e Hg-60). A extração foi feita com água ultrapura em disruptor de células automatizado. A suspensão obtida no processo de extração foi centrifugada a 10.000 rpm (4560m/s^2) a 4 °C, por 15 minutos para separação dos concomitantes sólidos da amostra. Em seguida, o sobrenadante foi separado e centrifugado novamente por mais 5 minutos. Posteriormente, 200 µL de extrato proteico do *pool* das amostras de tecido renal foram transferidos para *vials* de 2 mL e adicionou-se 400 µL de acetona gelada a 80% (v/v) para a precipitação da fração proteica (Lima et al., 2010). A precipitação foi refrigerada em geladeira por duas horas. O precipitado proteico foi separado do sobrenadante por centrifugação durante 15 minutos, 10.000 rpm (4560m/s^2) a 4 °C. Na etapa seguinte, parte dos *pellets* foi solubilizado com NaOH a 0,50 mol L⁻¹ para a quantificação de proteína total e outra parte foi armazenada em freezer à -20 °C para os experimentos metaloproteômicos.

2.3. Quantificação de proteínas totais

O extrato proteico obtido por meio da solubilização de parte dos *pellets* foi utilizado para determinação de proteína total pelo método de Biureto, utilizando albumina do soro bovino como padrão (Braga et. al., 2015). Para isso, uma curva analítica foi construída a partir de solução padrão de albumina (100 g L⁻¹) com concentrações de 10 a 100 g L⁻¹. Em tubos de ensaio foram adicionados 50 µL de extrato de amostra e/ou solução padrão e 2,5 mL de reativo Biureto. Foi preparado um branco utilizando 50 µL de água e 2,5 mL de reativo de Biureto. Os tubos foram levados ao banho maria a 32 °C por 10 minutos. Em seguida, os padrões e amostras foram transferidos para cubetas de vidro de 1 cm de largura para posterior leitura das absorvâncias em espectrofotômetro UV/Visível no comprimento de onda de 545 nm. Por meio da concentração de proteínas total determinada, foi calculado o volume de extrato proteico necessária para se obter 375 µg de proteínas no volume 250 µL para ser aplicado nas fitas IEF,

as quais são utilizadas na etapa de primeira dimensão do processo de fracionamento do proteoma por 2D PAGE.

2.4. Separação dos proteomas por 2D-PAGE

Para a etapa de focalização isoeletrica (IEF) que consiste na separação por ponto isoeletrico (pI), alíquotas dos extratos proteicos diluídas em solução contendo ureia a 7 mol L⁻¹, tiourea a 2 mol L⁻¹, CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v), azul de bromofenol a 0,002% e 2,8 mg de DTT, de forma que a concentração de proteína total ficasse igual a 1,50 µg µL⁻¹ (Braga et. al, 2015). Três fitas de IEF de 13 cm com pH 3 a 10 foram hidratadas com 250 µL de extrato proteico contendo 1,50 µg µL⁻¹ de proteína total (o que corresponde a 375 µg de proteína) em suas respectivas canaletas, na caixa de hidratação, e cobertas com óleo mineral para evitar a evaporação da solução de amostra. A caixa de hidratação foi fechada e mantida por 12 horas em temperatura ambiente (Lima et. al., 2010; Moraes et al., 2012; Braga et. al., 2015). Após serem devidamente hidratadas, as fitas foram transferidas para o sistema de focalização isoeletrica para a corrida eletroforética de primeira dimensão. O tempo de corrida foi de 4,5 horas.

Após a primeira dimensão do processo, caracterizado pelo fracionamento das proteínas em função do seu ponto isoeletrico, as fitas de IEF foram reidratadas por duas soluções. Primeiramente, se utilizou 12 mL de uma solução contendo ureia 6 mol L⁻¹, SDS 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8.8), azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 2% (m/v), para quebrar as pontes dissulfeto e manter as proteínas na forma reduzida. O tempo de contato das fitas com essa solução foi de 15 minutos sobre mesa agitadora. Em seguida, para evitar a reoxidação das proteínas e promover a alquilação dos grupos tióis, uma solução semelhante a anterior, diferenciando-se pela substituição do DTT por iodoacetamida 2,5 % (m/v), foi adicionada. O tempo de contato com a segunda solução foi também de 15 minutos sobre mesa agitadora (Lima et. al., 2010; Moraes et al., 2012; Braga et. al., 2015).

Na segunda parte do processo de fracionamento das proteínas, baseado na separação das proteínas por massa molecular utilizando SDS-PAGE, foi usado um gel de poliacrilamida de 12,5 % (m/v). O respectivo gel foi previamente preparado a partir de Acrilamida, N, N'-metilenobisacrilamida, Tris-hidroximetil amino metano, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Persulfato de Amônio, N,N',N,N'tetrametilenodiamina (TEMED) e água ultrapura. As fitas foram aplicadas sobre a superfície do gel juntamente com um papel filtro contendo 7 µL de

solução de proteínas com massa molecular conhecida: β -fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). O sistema foi selado com agarose 0,5 % (m/v) para garantir o contato do gel com a fita na corrida eletroforética (Lima et. al., 2010; Moraes et al., 2012; Braga et. al., 2015). O tempo de corrida foi de 2,50 horas.

Após o término das corridas, as proteínas foram fixadas nos géis com solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) durante 1 hora em mesa agitadora. Em seguida, para visualização dos *spots* proteicos, foi feita adição do corante Coomassie coloidal contendo sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), azul de Coomassie G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v), que permaneceu em contato com o gel durante 72 horas (Lima et. al., 2010; Moraes et al., 2012; Braga et. al., 2015). Para a remoção do corante foram necessárias lavagens com água ultrapura por 30 minutos durante 5 horas. Após o término da etapa de revelação dos *spots* proteicos, os géis foram escaneados utilizando o programa *ImageMaster 2D Platinum* para o tratamento das imagens (Moraes et.al., 2012).

2.5. Determinação de mercúrio total nas amostras de tecido renal, pellets e spots proteicos

As determinações de mercúrio total nas amostras de tecido renal, *pellets* e spots proteicos foram feitas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) conforme procedimento descrito por Moraes et al., 2013 e Braga et al., 2015. Resumidamente, o procedimento consiste em mineralizar as amostras utilizando mistura de ácido sulfúrico concentrado com peróxido de hidrogênio 30% (m/m) e aquecimento brando em bloco digestor. Os extratos ácidos obtidos foram avolumados para 5,00 mL em balões volumétricos. Na etapa de quantificação de mercúrio total por GFAAS, para manter a estabilização térmica do mercúrio na temperatura de atomização, foi utilizada a combinação de tungstênio como modificador químico permanente e zircônio como modificador químico coinjetado junto com amostra na etapa de injeção no tubo de grafite. As determinações foram feitas utilizando espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU AA-6800 equipado com corretor de *background* com sistema *self-reverse* (SR) e lâmpada de deutério, tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático AS6100. Todas as determinações foram validadas por análise de material de referência certificado DOLT 4 do National Research Council of Canada (NRC).

2.6. Caracterização spots proteicos associados ao mercúrio por LC-ESI-MS/MS

Os *spots* proteicos associados ao mercúrio, foram recortados dos géis com bisturi em segmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos para microtubos contendo 1 mL de ácido acético 5% (v/v). Em seguida foram realizadas as seguintes etapas: remoção do corante, redução e alquilação das proteínas e digestão triptica com solução de tripsina 10 ng mL⁻¹, conforme descrito por Vieira et al., 2015. As sequências peptídicas foram caracterizadas por espectrometria de massas em sequência com ionização por electrospray acoplada à cromatografia líquida (LC-ESI-MS/MS) de acordo com o procedimento descrito por Shevchenko et al., 2006. A identificação das proteínas foi feita utilizando o software Protein Lynx Global Server (PLGS) e o banco de dados UniProt para espécie *Ratus norvegicus* (Bittencourt et al., 2021).

2.7. Fracionamento do proteoma renal e análise de expressão por Shotgun – LC –MS/MS

A estratégia Shotgun – LC-MS/MS foi utilizada para obtenção do proteoma das amostras do tecido renal dos grupos controle – C-60 e experimentais – Hg-60. Para isso, extratos dos *pellets* proteicos das amostras de tecido renal contendo 50 µg de proteína foram diluídos em 50 µL de bicarbonato de amônio 50 mmol L⁻¹, e divididas em cinco porções 10 µL, as quais foram misturadas com 25 µL Rapigest 0,2% (v/v) (Waters Co., Manchester, Reino Unido). As misturas foram incubadas a 37 °C por 30 minutos, e posteriormente foram adicionados 2,5 µL de ditiotreitol 100 mmol L⁻¹ incubadas novamente a 37 °C por 60 minutos. Após a segunda etapa de incubação, 2,5 µL de iodoacetamida 300 mmol L⁻¹ (BioRad, Hercules, CA, EUA) foi adicionado e as misturas mais uma vez foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Após a terceira etapa de incubação, a digestão das proteínas foi feita pela adição de 10 µL de tripsina (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) por 14 h a 37 °C. No dia seguinte, 10 µL de ácido trifluoroacético a 5% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados e as misturas incubadas por 90 min a 37 °C, finalizando a etapa de clivagem proteolítica. Após o processo de digestão triptica, os extratos foram centrifugados a 14.000 rpm (28538 m/s²) a 6 °C por 30 minutos. Terminado o processo, os sobrenadantes foram coletados e purificados usando colunas de spin C18 (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). Os extratos foram em seguida ressuspensos em 12 µL de ADH 1 pmol µL⁻¹ + 108 µL de acetonitrila 3% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e ácido fórmico 3% (v/v) (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). Os extratos contendo

os peptídeos foram analisados em sistema nanoAcquity UPLC Xevo QToF MS (Waters, Manchester, UK). O software Proteinlynx Global Server (PLGS) foi utilizado na análise dos peptídeos e análises de expressão. Na identificação dos peptídeos foi aplicado o algoritmo de Monte-Carlo e pesquisa no banco de dados Uniprot para espécie *Ratus norvegicus* (Shevchenko et al., 2006, Bittencourt et al., 2021). Para as análises de expressão (grupo C-60 x grupo Hg-60) foi considerado $p < 0,05$ para proteínas reguladas negativamente e $1 - p > 0,95$ para proteínas reguladas positivamente. Após a compilação dos resultados, foi realizada a análise funcional das proteínas diferencialmente expressas, utilizando-se os softwares *Blas2Go* para determinar as categorias funcionais de proteínas com base em anotações de ontologia gênica de processos biológicos (Braga et al., 2016).

2.8. Análise Estatística

As imagens de três géis obtidas no fracionamento do proteoma dos *pools* de amostras de tecido renal (grupos C-60 e Hg-60) foram analisadas com o *software ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare), o qual fornece correlações entre as imagens dos géis (*matching*) por meio de análise de equivalência entre os *spots* em cada corrida 2D PAGE (Braga et al., 2017). Nessa análise, os *spots* foram comparados em termos de distribuição, volume, intensidade relativa, ponto isoelétrico e massa molecular. Os resultados das determinações de mercúrio foram expressos como $M \pm SD$, submetidos a teste *t de Student* e teste *F* para identificar quaisquer diferenças significativas usando o software SAS (versão 8). A significância foi definida em 5%, ou seja, $p < 0,05$ (Bittarello et al., 2020). Para os dados de expressão proteica, a análise estatística foi feita usando o software Protein Lynx Global Server do equipamento nanoAcquity UPLC Xevo QToF MS conforme descrito no item 2.7 (Bittencourt et al., 2021).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinações de mercúrio total

Os resultados obtidos nas determinações de mercúrio total nas amostras de tecido renal e *pellets* proteicos (grupos Hg-30 e Hg-60) por GFAAS estão sumarizados na Tabela 1. A validação dos resultados foi feita por meio de análise de padrão certificado *Fish Liver DOLT 4*

do *National Research Council of Canada (NRC)*. Nas amostras dos grupos controle (C-30 e C-60) as determinações por GFAAS não detectou concentrações de mercúrio.

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

Identificação das amostras	Conc. média de Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Rim Hg-30	39,20 $\pm$ 0,71*
Rim Hg-60	60,40 $\pm$ 1,10*
<i>Pellets</i> de Rim Hg-30	36,50 $\pm$ 0,62*
<i>Pellets</i> de Rim Hg-60	55,60 $\pm$ 0,98*
Fish Liver DOLT 4	2,53 $\pm$ 0,06**

*Concentração - $\mu\text{g kg}^{-1}$; **Concentração - mg kg^{-1} ; Fish Liver DOLT 4 - Concentração Certificada = 2,58 $\pm$ 0,22 mg kg^{-1} ; Hg-30 - ratos tratados com mercúrio por 30 dias, Hg60 - ratos tratados com mercúrio por 60 dias.

Os valores apresentados na Tabela 1 indicam que houve aumento da concentração de mercúrio total com o aumento da frequência de exposição dos ratos ao mercúrio, conforme demonstrado pela diferença entre as concentrações médias determinadas no grupo Hg-30 (39,20 $\pm$ 0,71 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e no grupo Hg-60 (60,40 $\pm$ 1,10 $\mu\text{g kg}^{-1}$). O mesmo comportamento foi observado em relação aos *pellets* proteicos (36,50 $\pm$ 0,62 $\mu\text{g kg}^{-1}$ – grupo Hg-30; 55,60 $\pm$ 0,98 $\mu\text{g kg}^{-1}$ – grupo Hg-60).

O peso médio dos ratos foi de 250,5 g, e a massa de mercúrio injetada nos ratos foi de 1,152 μg (concentração = 1,152 $\mu\text{g}/0,2505 \text{ kg} \cong 4,60 \mu\text{g kg}^{-1}$). No tratamento Hg-30, a concentração de mercúrio determinada foi de 39,20 $\pm$ 0,71 $\mu\text{g kg}^{-1}$, indicando uma bioacumulação de mercúrio de 852% no tecido renal dos ratos. Em relação ao tratamento com Hg-60, considerando que o peso médio dos ratos foi de 257 g, a massa de mercúrio injetada nos ratos foi de 1,182 μg (concentração = 1,182 $\mu\text{g}/0,2570 \text{ kg} \cong 4,60 \mu\text{g kg}^{-1}$). Nessas condições, a concentração de mercúrio determinada foi de 60,40 $\pm$ 0,80 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o que representa uma bioacumulação de mercúrio de 1313 % no tecido renal dos ratos. Assim, observa-se que o efeito da frequência de exposição afeta diretamente a bioacumulação de mercúrio no tecido renal dos ratos.

3.2. Fracionamento dos proteomas das amostras tecido renal por 2D PAGE e determinação de mercúrio total nos *spots* proteicos

As determinações GFAAS indicaram maior porcentagem de mercúrio bioacumulado nas amostras de tecido renal do grupo Hg-60. Assim, o proteoma do tecido renal dos Grupos

C-60 e Hg-60 foi fracionado por 2D PAGE utilizando três réplicas de géis. A Figura 1 mostra como exemplo, dois géis, um do grupo C-60 e outro do grupo Hg-60, obtidos no processo de fracionamento do proteoma por 2D PAGE.

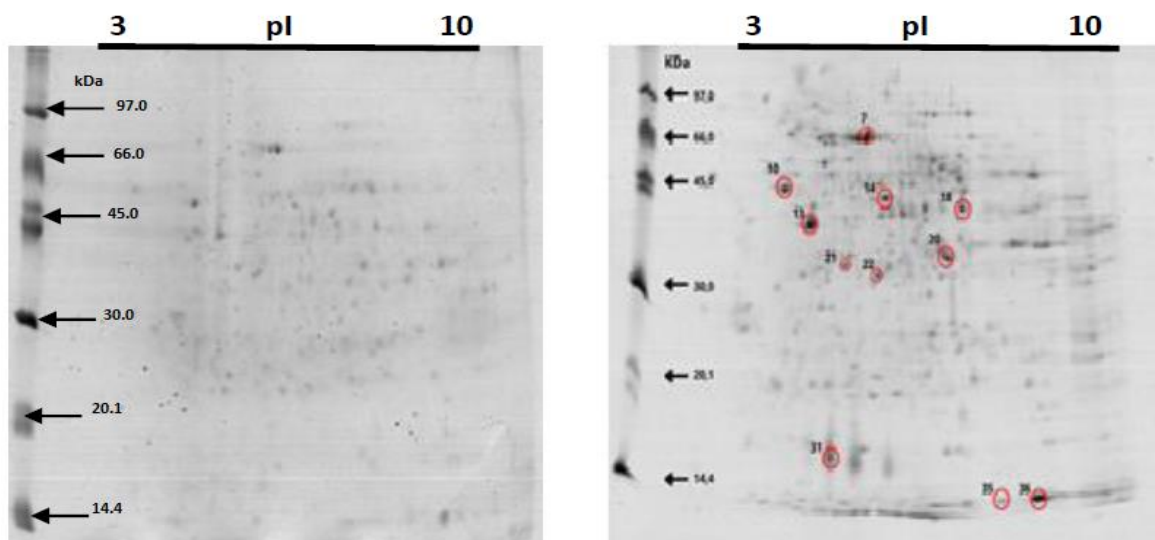


Figura 1 - Figuras representativas das triplicatas de géis obtidos por 2D-PAGE do *pool* amostras de tecido renal de ratos dos grupos controles (C-60) e expostos ao mercúrio por período de 60 dias (Hg-60). Os *spots* sinalizados com círculos vermelhos são aqueles nos quais as determinações por GFAAS indicaram a presença de mercúrio.

A análise de correlação entre triplicatas de géis 2D PAGE de *pools* de amostras de tecido renal indicaram que os géis apresentam 190 ± 8 *spots* - *Matching* (%) = 95 ± 5 (grupo C-60) e 253 ± 8 *spots* - *Matching* (%) = 99 ± 1 (Hg -60 grupo). O mapeamento de mercúrio nos *spots* proteicos por GFAAS após o processo de mineralização indicaram concentrações na faixa de 79 ± 1 a 750 ± 9 mg kg⁻¹ em 11 *spots* (destacados em vermelho na Figura 1). Os resultados estão sumarizados na Tabela 2.

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 Hg²⁺ (solução de cloreto de mercúrio) por 60 dias (grupo Hg-60).

<i>Spots</i> Proteicos	Conc. média de Hg (mg kg ⁻¹)
7	120±2
10	113±2
13	138±2
14	293±4
18	302±5
20	316±5
21	417±6
22	750±9
31	349±5
35	79±1
36	84±1

3.3. Caracterização dos spots proteicos associados ao mercúrio por LC – MS/MS

As análises de caracterização dos 11 spots proteicos associados ao mercúrio por LC – MS/MS identificaram 13 proteínas nos *spots* 7, 13, 22, 31 e 36. As proteínas e/ou enzimas identificadas são mostradas na Tabela 3.

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 µg kg⁻¹ de Hg²⁺ por 60 dias (grupo Hg-60).

<i>Spots</i> tecido renal de ratos – grupo Hg-60						
<i>Spots</i> ID	Acesso	<i>Símbolo do gene</i>	Proteínas	Escore	pI/MM teórica (kDa)	Sequência Peptídica
7	P00689	<i>Amy2</i>	Pancreatic alpha-amylase	93.3152	8.34/57.177	GHGAGGASILTFWDAR
	P02770	<i>Alb</i>	Albumin	58.669	6.09/68.731	LVQEVTDFAKAPQVSTPTLVEAARR PCFSALTVDETYVPKAAADKDNCFAT EGPNLVAR
10	-	-	-	-	-	-
13	P11517	-	Hemoglobin subunit beta-2	272.2158	8.91/15.982	LLVVYPWTQR
	P02091	<i>Hbb</i>	Hemoglobin subunit beta-1	272.2158	7.87/15.979	LLVVYPWTQR
14	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-
22	P63259	<i>Actg1</i>	Actin_ cytoplasmic 2	510.8116	5.31/41.793	VAPEEHPVLLTEAPLNPK
	P60711	<i>Actb</i>	Actin_ cytoplasmic 1	510.8116	5.29/41.737	SYELPDGQVITIGNER
	P68136	<i>Acta1</i>	Actin_ alpha skeletal muscle	142.5171	5.23/42.051	TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALP HAILR
	P68035	<i>Actc1</i>	Actin_ alpha cardiac muscle 1	142.5171	5.23/42.019	SYELPDGQVITIGNER
	P63269	<i>Actg2</i>	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	142.5171	5.31/41.877	SYELPDGQVITIGNER
	P62738	<i>Acta2</i>	Actin_ aortic smooth muscle	142.5171	5.24/42.009	SYELPDGQVITIGNER
31	P02761	-	Major urinary protein	212.1593	5.85/20.737	DNIIDLTKEYLVAYK
36	P02091	<i>Hbb</i>	Hemoglobin subunit beta-1	333.9544	7.87/15.979	LLVVYPWTQRVINAFNDGLK
	P11517	-	Hemoglobin subunit beta-2	272.685	8.91/15.982	LLVVYPWTQRVINAFNDGLK

No *spot* 7 foi identificada a albumina, proteína que tem como principal função a regulação da pressão osmótica coloidal do sangue (Uniprot, 2022). A albumina também é a principal proteína responsável pelo transporte de zinco plasmático, sendo que, cerca de 80% de todo o zinco do plasma encontra-se ligado a albumina. O *spot* 7 apresentou 120 mg kg⁻¹ de mercúrio total. Trabalho desenvolvido por Li et al. (Li et al., 2007) utilizando eletroforese capilar on-line acoplada à espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (CE-ETAAS) e com informação estrutural de dicroísmo circular e espectroscopia Raman, confirmou a ligação de mercúrio inorgânico (Hg²⁺), metilmercúrio (MeHg⁺), etilmercúrio (EtHg⁺) e fenilmercúrio (PhHg⁺) com albumina sérica humana (HSA). A estequiometria entre as espécies Hg²⁺, MeHg⁺, EtHg⁺ e PhHg⁺ com HSA foram de 6:1, 4:1, 4:1 e 3:1, respectivamente. Entre as quatro espécies mercuriais examinadas, apenas Hg²⁺ induz a transição da estrutura secundária de HSA. Os adutos de mercúrio-HSA são formados principalmente por meio de ligação metal-enxofre com participação de grupos CO e/ou C-N de resíduos de aminoácidos nas moléculas de HSA. Considerando a alta concentração de mercúrio total determinada no *spot* 7, pode-se inferir que a albumina identificada no tecido renal dos ratos expostos ao mercúrio apresenta potencial característica de biomarcador de exposição às espécies mercuriais.

As isoformas beta 1 e 2 da hemoglobina foram identificadas no *spot* 13 e 36, *spot* que apresentaram 138±2 e 84±1 mg kg⁻¹ de mercúrio total, respectivamente. As subunidades beta 1 e 2 da hemoglobina são responsáveis pelo transporte de oxigênio do pulmão para os vários tecidos periféricos (Uniprot, 2022). A literatura relata, que em função do resíduo de cisteína encontrado em nas isoformas da hemoglobina, espécies mercuriais podem formar ligações coordenativas com essa proteína (Vieira et al., 2017). Estudos desenvolvidos por Park e Lee (Park et al, 2013) demonstraram que os níveis de hemoglobina apresentam correlação positiva com a exposição ao chumbo, cádmio e mercúrio considerando as concentrações desses metais no organismo. Considerando a alta concentração de mercúrio total determinada nos *spots* 13 e 36, nos quais foram identificadas as subunidades beta 1 e 2 da hemoglobina, pode-se inferir que essas isoformas da hemoglobina podem atuar como biomarcador de exposição do mercúrio.

No *spot* 22 as determinações por GFAAS indicaram concentração de 750±9 mg kg⁻¹ de mercúrio total, que foi a maior concentração de mercúrio determinada nos *spots* proteicos. No *spot* 22 foram identificadas seis isoformas da actina, no caso: Actina citoplasmática 1 e 2, actina do músculo esquelético alfa, Actina do músculo cardíaco alfa 1, actina do músculo liso gama-entérico e actina do músculo liso aórtico. As actinas são proteínas altamente conservadas, estão

envolvidas em vários tipos de motilidade celular e são expressas de forma ubíqua em todas as células eucarióticas (Uniprot, 2022). Em vertebrados foram identificados 3 grupos principais de isoformas de actina, alfa, beta e gama (Pollard & Earnshaw, 2006). As alfa actinas são encontradas nos tecidos musculares e são um dos principais constituintes do aparelho contrátil. As actinas beta e gama coexistem na maioria células como componentes do citoesqueleto e como mediadores da motilidade celular interna (Pollard & Earnshaw, 2006). Estudo desenvolvido por Kutscher et al. (Kutscher et al., 2012) utilizando cromatografia de exclusão (SEC), espectrometria de massas com plasma de argônio acoplada indutivamente (ICP-MS) e espectrometria de massas em sequência com ionização por electrospray (ESI – MS/MS) identificou isoformas de miosina do músculo esquelético como metal binding protein de mercúrio em amostras de músculo de atum. Recentemente, estudo desenvolvido por Nong et al. (2021) utilizando cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) acoplada ao espectrômetro de massa de plasma indutivamente acoplamento (ICP-MS) comprovou a beta-actina como uma nova *metal binding protein* de Hg em tecido muscular de peixes, sendo que, 30 – 37% do Hg total presente no tecido muscular dos peixes estão ligados à beta-actina. A alta concentração de mercúrio determinada no *spot* 22 e os resultados do trabalho recente de Nong et al., corroboram para inferir que a actina e suas isoformas apresentam características potencial de biomarcador de exposição às espécies mercuriais.

A Major urinary protein (Mups) foi identificada no *spot* 31, *spot* que apresenta 349 ± 5 mg kg⁻¹ de mercúrio total. A Mups se ligam e liberam feromônios, e também podem proteger os feromônios da oxidação. Assim, as Mups podem atuar na regulação de comportamentos sociais, como agressão, acasalamento, amamentação, estabelecimento de território e dominação. As Mups apresentam metionina terminal na sua sequência FASTA (Uniprot, 2022). As Mups apresentam estrutura com oito folhas beta dispostas em um barril beta antiparalelo aberto em uma face, com hélices alfa em ambas as extremidades (Flower, 1996). Dessa forma, as Mups apresentam a forma de luva característica, englobando uma bolsa em forma de taça que liga pequenos produtos químicos com alta afinidade (Ganfornina et al., 2000). As Mups de camundongo formam ligações com compostos como 2-sec-butil-4,5-di- hidrotiazol, 6-hidroxi-6-metil-3- heptanona e 2,3 di-hidro-exo-brevicomina Timm et al., 2001). A literatura não relata trabalhos relacionados com a ligação de espécies mercuriais com a estrutura das Mups. No entanto, considerando a reatividade que os sítios de ligação da Mups apresentam em relação a compostos orgânicos, e principalmente a presença de metionina terminal na sua Mups, pode-se inferir a possível ligação de espécies mercuriais sítios básicos

das Mups. A metionina apresenta grupos sulfidrilas, base mole, o que pode explicar a alta concentração de mercúrio total, ácido mole, determinada no spot 31 (Pearson, 1963). Assim, pode-se inferir que as Mups, com base nos resultados do presente trabalho, apresentam características de biomarcador de exposição às espécies mercuriais.

3.4. Identificação das proteínas diferencialmente expressas por Shotgun – LC –MS/MS

A estratégia por Shotgun – LC –MS/MS foi utilizada para identificar as proteínas diferencialmente expressas na comparação do grupo controle (C-60) com o grupo exposto ao mercúrio por 60 dias (Hg-60). Os resultados obtidos estão sumarizados nas Tabelas 4 - 6. Análises funcionais utilizando o software Blast2GO e as sequências FASTA das proteínas identificadas como “únicas” e/ou diferencialmente expressas em relação aos grupos C-60 x Hg-60 foram realizadas para elucidar os aspectos funcionais dessas proteínas, os resultados obtidos estão sumarizados nas Figuras 2 – 4.

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

Accession	Description	Score PLGS	Unique
P11442	Clathrin heavy chain 1	43.63	CT
P19629	L-lactate dehydrogenase C chain	52.85	CT
Q8CGX0	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	53.18	CT
Q63041	Alpha-1-macroglobulin	54.3	CT
Q3SWS9	Janus kinase and microtubule-interacting protein 1	54.33	CT
Q5XI58	Calicin	59.57	CT
P30904	Macrophage migration inhibitory factor	60.28	CT
Q68FT1	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9_ mitochondrial	65.66	CT
P27139	Carbonic anhydrase 2	79.33	CT
P07335	Creatine kinase B-type	79.96	CT
P13086	Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha_ mitochondrial	82.08	CT
P60705	DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC3	91.07	CT
P08010	Glutathione S-transferase Mu 2	94.04	CT
Q5BK56	Glutathione S-transferase Mu 4	94.04	CT
P08009	Glutathione S-transferase Mu 7	94.04	CT
P02680	Fibrinogen gamma chain	104.28	CT
Q5PQL7	Integral membrane protein 2C	109.58	CT
P20761	Ig gamma-2B chain C region	131.31	CT
P62260	14-3-3 protein epsilon	136.57	CT
P35467	Protein S100-A1	137.54	CT
O54912	Potassium channel subfamily K member 3	138.52	CT
P97700	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	179.15	CT
P04041	Glutathione peroxidase 1	209.48	CT
Q6LED0	Histone H3.1	258.18	CT
P84245	Histone H3.3	258.18	CT
P11762	Galectin-1	292.97	CT
P01835	Ig kappa chain C region_ B allele	342.74	CT
P63031	Mitochondrial pyruvate carrier 1	399.01	CT
Q9JJW3	ATP synthase membrane subunit K_ mitochondrial	463.77	CT
Q7TQ16	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	752.47	CT
P29418	ATP synthase subunit epsilon_ mitochondrial	773.57	CT
P61016	Cardiac phospholamban	1378.75	CT
P0C6P7	Protein fem-1 homolog B	28.2	Hg60
Q66X93	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	28.7	Hg60
Q6IG04	Keratin_ type II cytoskeletal 72	33.77	Hg60

Q9ESV			
1	Leucine zipper protein 1	36.86	Hg60
P15387	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1	37.29	Hg60
P06761	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	45.4	Hg60
P70627	Glutamate carboxypeptidase 2	49.65	Hg60
Q63099	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 2	52.6	Hg60
Q8CF97	Deubiquitinating protein VCIPI1	56.26	Hg60
P55063	Heat shock 70 kDa protein 1-like	58.37	Hg60
Q4G061	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	59.1	Hg60
Q03346	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	70.67	Hg60
P42930	Heat shock protein beta-1	82.52	Hg60
Q9QZC			
4	Choline-phosphate cytidyltransferase B	90.76	Hg60
P11661	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	93.42	Hg60
P29266	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase_ mitochondrial	96.81	Hg60
P07943	Aldo-keto reductase family 1 member B1	106.68	Hg60
P09117	Fructose-bisphosphate aldolase C	185.48	Hg60
P70623	Fatty acid-binding protein_ adipocyte	358.89	Hg60
Q5M9I5	Cytochrome b-c1 complex subunit 6_ mitochondrial	614.64	Hg60

Proteínas que se expressaram em apenas um tratamento.

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

Accession	Description	Score PLGS	Hg60 x CT_Ratio	Hg60 x CT_P
P48500	Triosephosphate isomerase	883.08	1.094174288	0.96
P20759	Ig gamma-1 chain C region	30.14	1.786038401	0.97
P17764	Acetyl-CoA acetyltransferase_ mitochondrial	400.61	1.083287066	0.98
P02600	Myosin light chain 1/3_ skeletal muscle isoform	831.88	1.246076729	0.98
Q01205	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex_ mitochondrial	84.42	1.271249144	0.99
P51868	Calsequestrin-2	258.94	1.221402762	0.99
P56571	ES1 protein homolog_ mitochondrial	245.35	1.363425117	1
P10817	Cytochrome c oxidase subunit 6A2_ mitochondrial (Fragment)	418.33	1.390968147	1
Q64119	Myosin light polypeptide 6	945.5	1.258600015	1
P23928	Alpha-crystallin B chain	2935.82	1.094174288	1

P565	Isocitrate dehydrogenase [NADP]_		1.1388283	
74	mitochondrial	3019.73	78	1
P025			1.1274968	
64	Myosin-7	9904.11	49	1
P680			1.1735108	
35	Actin_ alpha cardiac muscle 1	15574.29	67	1

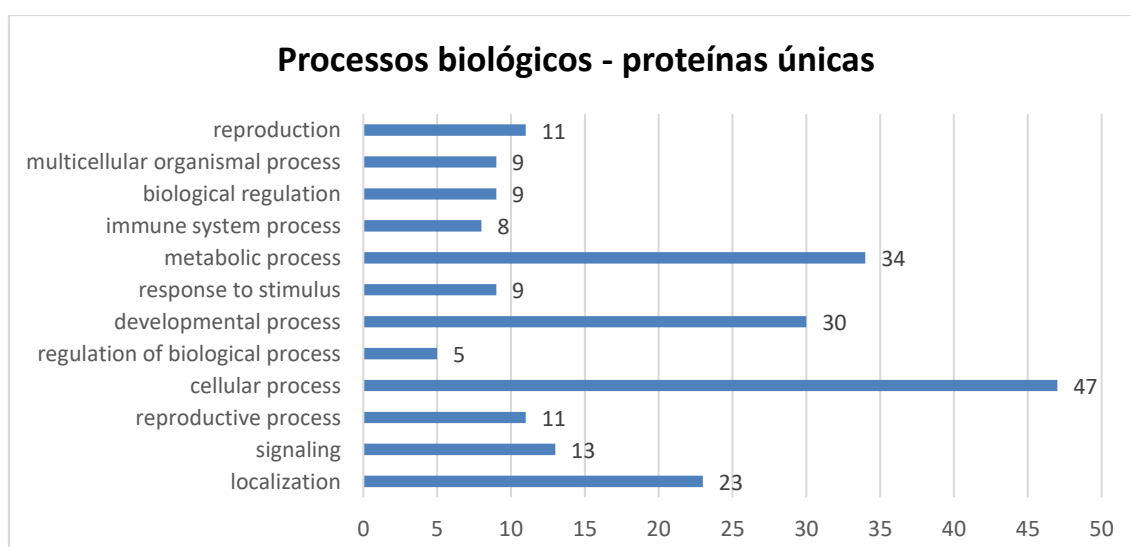
Up = Proteínas com valor de 'p' acima de 0.95

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

Accession	Description	Score PLGS	Hg60 x CT_Ratio	Hg60 x CT_P
P09811	Glycogen phosphorylase_ liver form	53.91	0.778800783	0
P48721	Stress-70 protein_ mitochondrial	71.86	0.748263574	0
P85834	Elongation factor Tu_ mitochondrial	91.21	0.612626388	0
Q6457	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum			
8	calcium ATPase 1	139.31	0.835270205	0
P17209	Myosin light chain 4	234.32	0.763379486	0
P09812	Glycogen phosphorylase_ muscle form	249.52	0.886920439	0
	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum			
P11507	calcium ATPase 2	272.57	0.852143792	0
Q68FU				
3	Electron transfer flavoprotein subunit beta	360.5	0.869358235	0
P04764	Alpha-enolase	503.99	0.835270205	0
Q68FY	Cytochrome b-c1 complex subunit 1_			
0	mitochondrial	686.57	0.852143792	0
P04642	L-lactate dehydrogenase A chain	1034.95	0.869358235	0
P16036	Phosphate carrier protein_ mitochondrial	1048.55	0.771051593	0
	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1_			
P10888	mitochondrial	1068.03	0.748263574	0
P62804	Histone H4	1544.51	0.852143792	0
D3ZAF				
6	ATP synthase subunit f_ mitochondrial	1651.57	0.843664815	0
Q0664				
7	ATP synthase subunit O_ mitochondrial	2620.75	0.886920439	0
P23693	Troponin I_ cardiac muscle	4084.66	0.826959136	0
Q29R				
W1	Myosin-4	5297.91	0.826959136	0
P60711	Actin_ cytoplasmic 1	8304.34	0.740818212	0
P63259	Actin_ cytoplasmic 2	8330.96	0.740818212	0
P63269	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	12264.11	0.740818212	0
P62738	Actin_ aortic smooth muscle	13364.2	0.755783741	0
Q9QZ7				
6	Myoglobin	13819.06	0.923116348	0
P68136	Actin_ alpha skeletal muscle	14669.85	0.755783741	0
P11517	Hemoglobin subunit beta-2	17600.93	0.740818212	0
P16409	Myosin light chain 3	22870.06	0.904837417	0

P02091	Hemoglobin subunit beta-1	25672.54	0.786627865	0
P01946	Hemoglobin subunit alpha-1/2	31159.12	0.71177032	0
P53534	Glycogen phosphorylase_ brain form (Fragment)	125.57	0.810584251	0.01
P16617	Phosphoglycerate kinase 1	157.06	0.852143792	0.01
P07632	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	159.66	0.637628159	0.01
P00507	Aspartate aminotransferase_ mitochondrial	1740.83	0.913931182	0.01
P15999	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial	8218.37	0.951229424	0.01
P10719	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	11155.46	0.941764535	0.01
P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein	133.72	0.878095435	0.02
B0BN				
N3	Carbonic anhydrase 1	238.38	0.58274824	0.03
P12346	Serotransferrin	353.39	0.886920439	0.03
P48675	Desmin	764.48	0.923116348	0.03
O8898				
9	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic	1362.02	0.923116348	0.03
P19511	ATP synthase F(0) complex subunit B1_ mitochondrial	1545.46	0.895834136	0.03
P42123	L-lactate dehydrogenase B chain	4618.54	0.93239382	0.03
P18596	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	25.58	0.860707971	0.04
P0CG5				
1	Polyubiquitin-B	126.25	0.733446954	0.04
P62986	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	140.04	0.771051593	0.04
P31399	ATP synthase subunit d_ mitochondrial	591.86	0.895834136	0.04
Q6PD				
U7	ATP synthase subunit g_ mitochondrial	1347.26	0.886920439	0.04
Q9ER3				
4	Aconitate hydratase_ mitochondrial	2861.81	0.96078944	0.04

Down = Proteínas com valor de 'p' menor que 0.05.



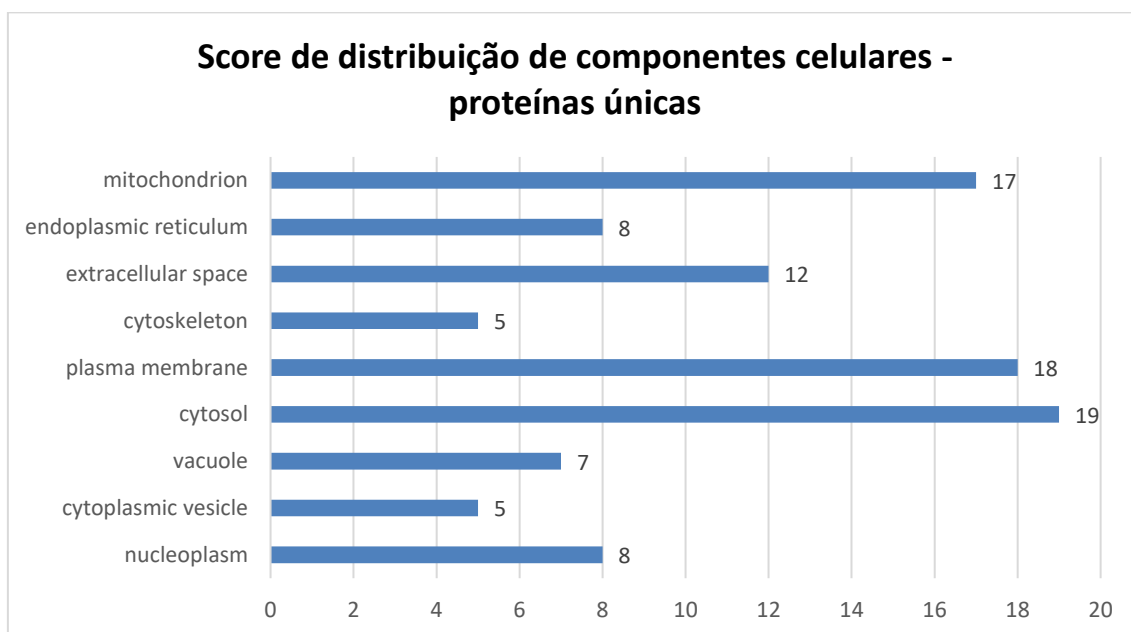
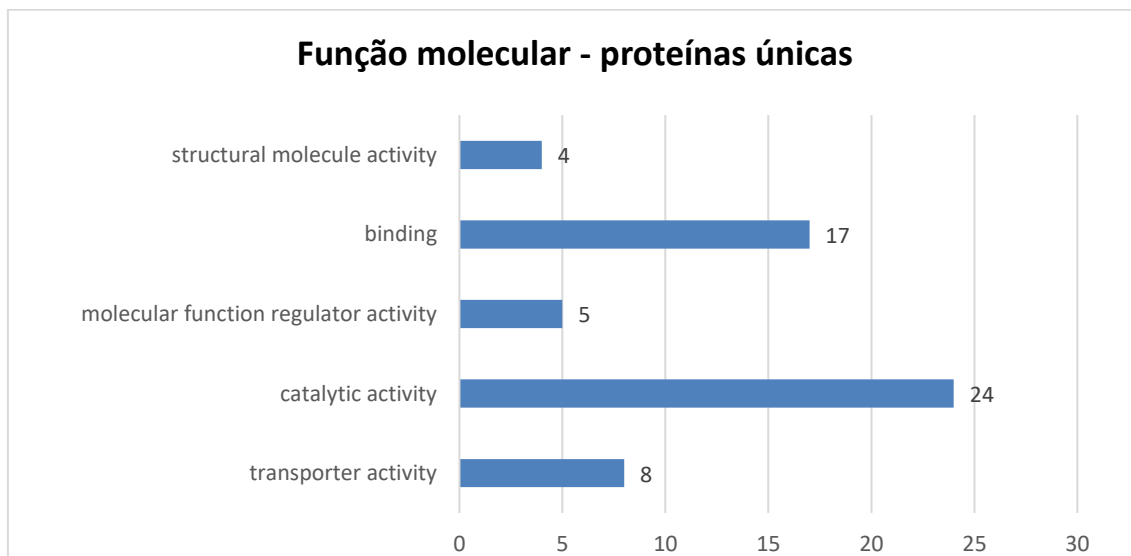
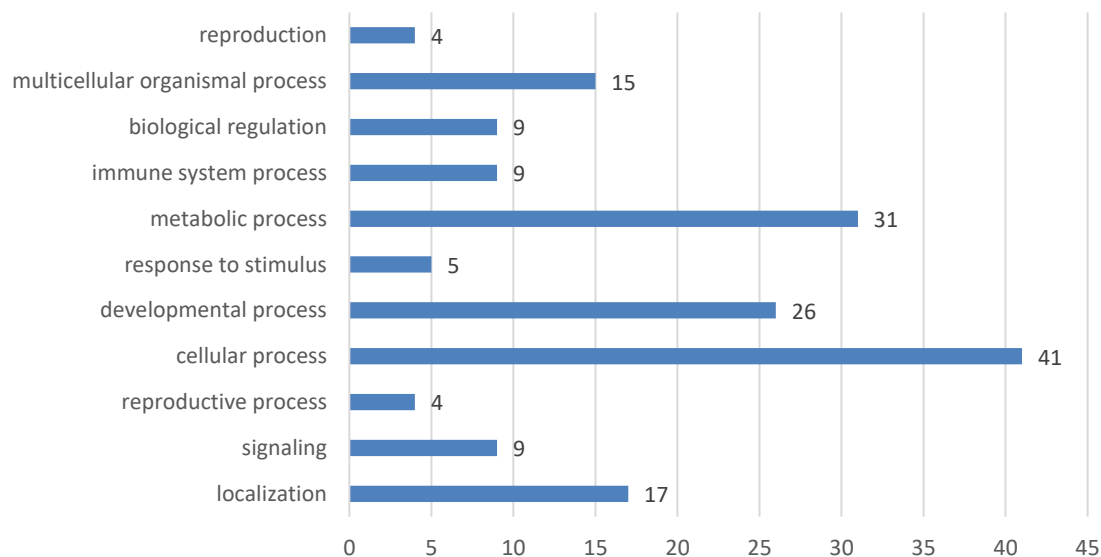
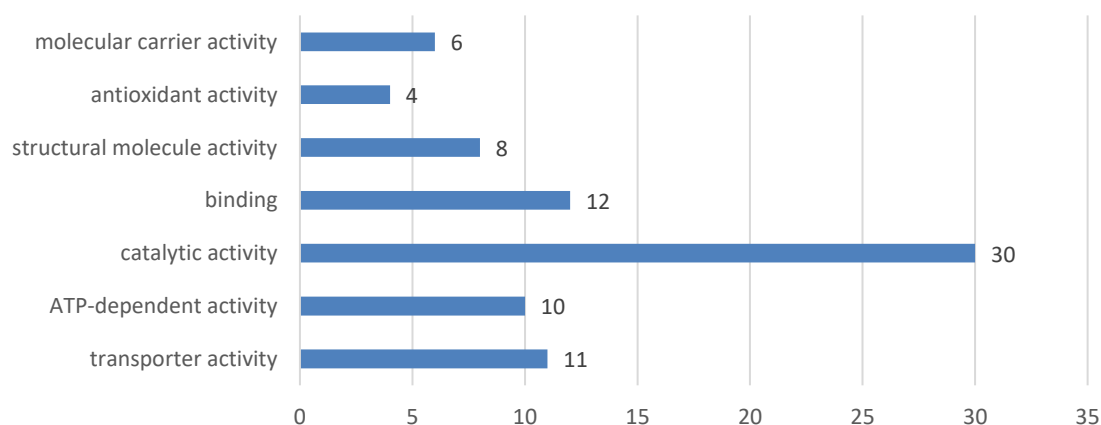


Figura 2. Gráficos de análise funcional das proteínas identificadas como únicas (somente no *pool* de amostras de tecido renal de ratos expostos a dose de 4,60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de Hg^{2+} por 60 dias - grupo Hg-60 - e controle – Controle-60) utilizando o software Blast2GO.

Processos biológicos - proteínas "down regulateds"



Função molecular - proteínas "down regulateds"



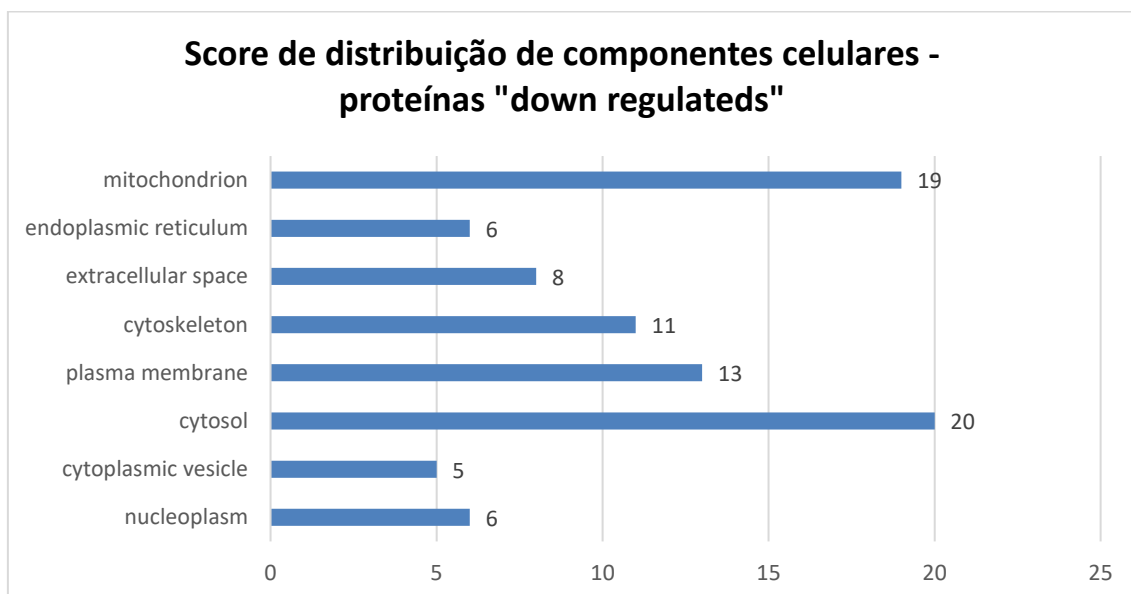
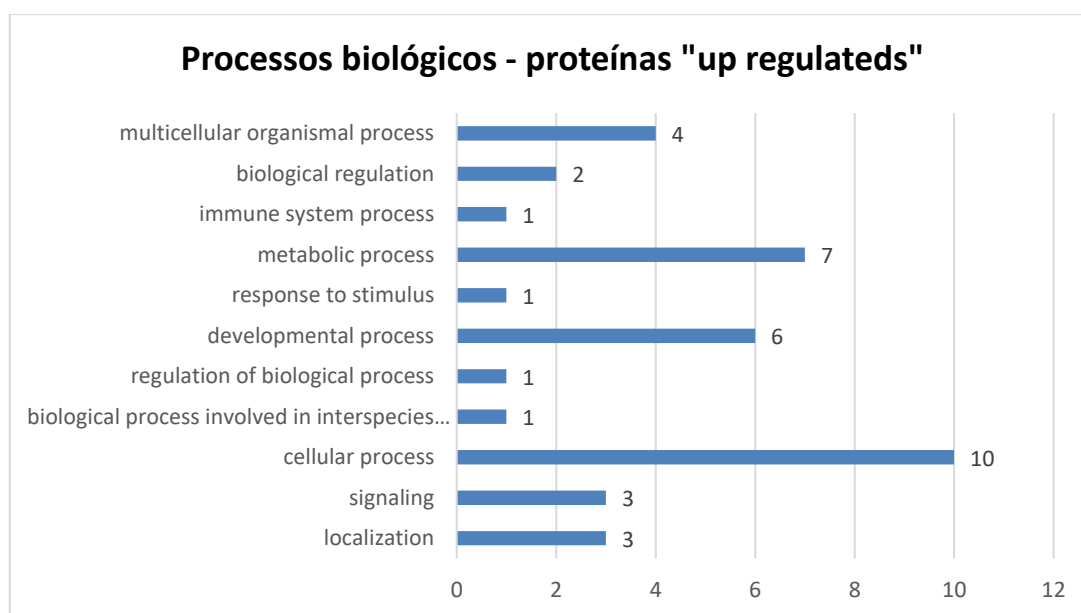


Figura 3. Gráficos de análise funcional das proteínas identificadas como “*downregulateds*” nas análises de expressão proteica *pool* de amostras de tecido renal dos grupos controles e expostos ao mercúrio (grupo C-60 x grupo Hg-60) utilizando o software Blast2GO.



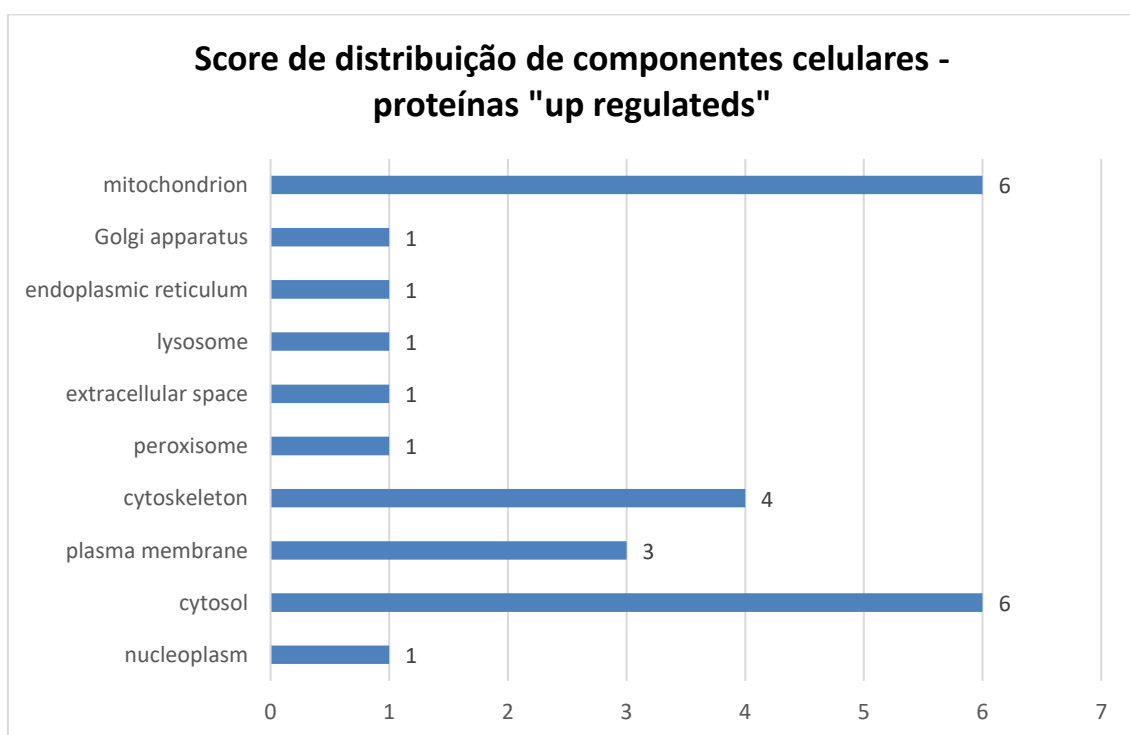
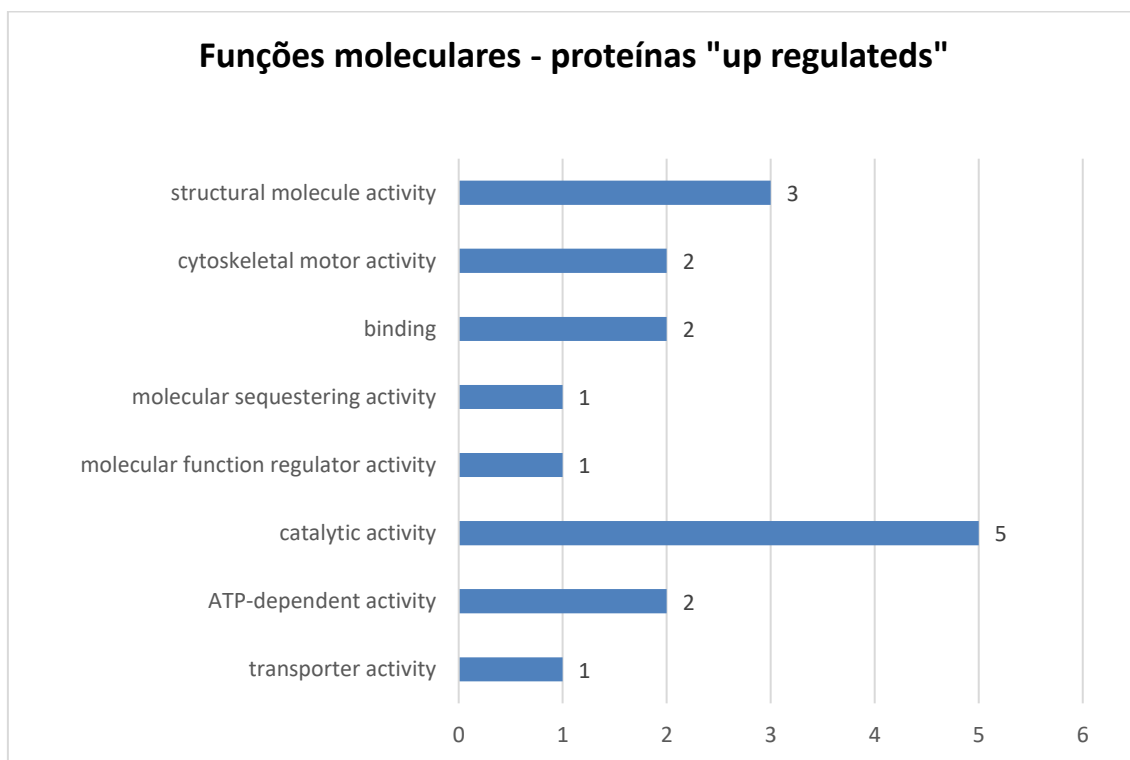


Figura 4. Gráficos de análise funcional das proteínas identificadas como “*upregulateds*” nas análises de expressão proteica *pool* de amostras de tecido renal dos grupos controles e expostos ao mercúrio (grupo C-60 x grupo Hg-60) utilizando o software Blast2GO.

As análises de expressão por Shotgun – LC-MS/MS permitiram identificar 52 proteínas únicas (30 proteínas que se expressaram somente no grupo controle e 20 no grupo Hg-60), 13 proteínas “upregulated” (“ p ” > 0,95) e 47 proteínas “downregulated”

("p" < 0,05). Em relação a análise funcional (Figuras 2-4) das proteínas e/ou enzimas identificadas como únicas, com "upregulated" e "downregulated" (grupo C-60 x Grupo Hg-60), os resultados indicam que essas proteínas/enzimas participam de importantes processos biológicos, de componentes celulares e de funções moleculares. Resumidamente, pode-se destacar nas Figuras 2-4, em relação às proteínas que se expressaram somente no grupo Hg-60 e controle, apresentam: *Processos biológicos* – 11 de reprodução; 9 de processo de organismo multicelular; 9 de regulação biológica; 8 de processo do sistema imunológico; 34 de processo metabólico; 9 de resposta ao estímulo; 30 de processo de desenvolvimento; 5 de regulação de processo biológico; 47 de processo celular; 11 de processo reprodutivo; 13 de sinalização e 23 de localização. *Função Molecular*: 4 de atividade molécula estrutural; 17 de ligação; 5 de atividade reguladora de função molecular; 24 de atividade catalítica e 8 de atividade de transporte. *Componente celular*: 51 sequências de entidade anatômica, sendo assim distribuídas: 17 de mitocôndria; 8 de retículo endoplasmático; 12 de espaço extracelular; 5 de citoesqueleto; 18 de membrana plasmática; 19 de citosol; 7 de vacúolo; 5 de vesícula citoplasmática e 8 de nucleoplasma.

Em relação às proteínas "downregulated", apresentam: *Processos biológicos*: 4 de reprodução; 15 de processo de organismo multicelular; 9 de regulação biológica; 9 de processo do sistema imune; 31 de processo metabólico; 5 de resposta ao estímulo; 26 de processo de desenvolvimento; 41 de processo celular; 4 de processo reprodutivo; 9 de sinalização e 17 de localização. *Função molecular*: 6 sequências de atividade carreadora molecular; 4 de atividade antioxidante; 8 de atividade molecular estrutural; 12 de ligação; 30 de atividade catalítica; 10 de atividade dependente de ATP e 11 de atividade de transporte. *Componente celular*: 100% das proteínas (43) desempenham funções relacionadas à anatomia celular, sendo assim distribuídas: 19 de mitocôndria; 6 de retículo endoplasmático; 8 de espaço extracelular; 11 de citoesqueleto; 13 de membrana plasmática; 20 de citosol; 5 de vesícula citoplasmática e 6 de nucleoplasma.

Em relação às proteínas "upregulated", apresentam: *Processos biológicos*: 4 sequências de processo de organismo multicelular; 2 de regulação biológica; 1 de processo do sistema imune; 7 de processo metabólico; 1 de resposta a estímulo; 6 de processo de desenvolvimento; 1 de processo biológico envolvido na interação de organismos interespecíficos; 10 de processo celular; 3 de sinalização e 3 de localização. *Função molecular*: 3 sequências de atividade molecular estrutural; 2 de atividade motora

citoesquelética; 2 de ligação; 1 de atividade de sequestro molecular; 1 de atividade reguladora de função molecular; 5 de atividade catalítica; 2 de atividade dependente de ATP e 1 de atividade de transporte. *Componente celular*: as 13 sequências “upregulateds” fazem parte de alguma estrutura celular, sendo assim distribuídas: 6 de mitocôndria; 1 de aparato de golgi, 1 de retículo endoplasmático; 1 de lisossomo; 1 de espaço extracelular; 1 de peroxissomo; 4 de citoesqueleto; 3 de membrana plasmática; 6 de citosol e 1 de nucleoplasma.

Com base nas informações da análise funcional e de expressão proteica é possível destacar em relação às proteínas/enzimas que se expressaram somente no grupo Hg-60: As isoformas 2, 4 e 7 da Glutathione S-transferase Mu (GST Mu), a Glutathione peroxidase (GPx) e as proteínas de choque térmico Heat shock 70 kDa protein 1-like e Heat shock protein beta-1. A GST é uma família de enzimas multifuncionais, que participam da fase II da desintoxicação do organismo, e envolvidas na conjugação da glutathione (GSH) a uma série de compostos eletrofílicos, desde subprodutos endógenos, até produtos químicos ambientais, incluindo metais tóxicos, como o mercúrio, afim de torná-los menos reativos e de mais fácil eliminação (Bittarello et al., 2020). A glutathione GPx é uma superfamília de enzimas antioxidantes que participam das atividades antioxidantes, protegendo os organismos na redução de radicais livres, catalisando a redução de hidroperóxidos livres ou ligados a membrana (Bittarello et al. 2020). Os grupos selenol da GPx (base mole) tem alta afinidade por espécies eletrofílicas (ácidos moles), como o mercúrio (Pearson, 1963). A Heat shock 70 kDa protein 1-like e Heat shock protein beta-1 pertencem a classe das “chaperonas - HSPs”, proteínas que são induzidas por diversos tipos de estressores, como alterações na temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido e metais contaminantes como cádmio, chumbo e mercúrio (Lima et al, 2019). As HSPs por participarem de mecanismos de defesa induzidos a condições fisiológicas sub-ótimas, fez com que o nome —Proteínas de Choque Térmico fosse substituído por —Proteína de Estresse, como termo mais geral que abrange melhor sua amplitude de ação (Lima et al., 2010).

Das proteínas e/ou enzimas que apresentaram “upregulated” pode-se destacar a actin_ alpha cardiac muscle 1, a Calsequestrin-2 e a Ig gamma-1 chain C region. A actin_ alpha cardiac muscle 1 foi uma das isoformas da actin identificada no spot 22 como uma das proteínas associadas ao mercúrio (conforme já discutido no item 3.3). O spot 22 apresentou concentração de mercúrio total igual a 750 ppm (mg kg⁻¹), assim, o aumento

significativo de expressão da actin_ alpha cardiac muscle 1 ($p = 1$), permite afirmar essa proteína como potencial biomarcador de exposição às espécies mercuriais.

Em relação às proteínas e/ou enzimas que apresentaram “downregulated”, destacam-se: as isoformas 1 e 2 da Actin_ cytoplasmic, a Actin_ gamma-enteric smooth muscle, a Actin_ aortic smooth muscle e a Actin_ alpha skeletal muscle; e as isoformas beta 1, 2 e alfa $\frac{1}{2}$ da Hemoglobin subunit. As isoformas da actin (conforme já discutido no item) foram identificadas no spot 22 com concentração de mercúrio total maior que 700 ppm, e as análises de expressão proteica indicaram “fold change” igual a 0, o que permite afirmar que a actin e suas isoformas apresentam características de potenciais biomarcadores de exposição ao mercúrio. As isoformas beta 1, 2 da Hemoglobin subunit, também apresentaram “downregulated” igual a 0 e foram identificadas nos *spot* proteicos 13 e 31, *spots* que apresentaram concentração de mercúrio total igual a 138 e 341 ppm, respectivamente, dados que qualificam a Hemoglobin subunit beta 1 e 2, como potenciais biomarcadores de exposição ao mercúrio.

4. CONCLUSÕES

A determinação de mercúrio total no tecido renal de ratos expostos a baixas concentrações de mercúrio ($4,60 \mu\text{g kg}^{-1}$) por 30 e 60 dias comprovou o processo de bioacumulação do mercúrio em função do tempo de exposição. Os estudos metaloproteômicos indicaram que as isoformas das enzimas *GST Mu* e a *GPx* e as proteínas de choque térmico *Heat shock 70 kDa protein 1-like* e *Heat shock protein beta-1*, se expressaram somente no grupo exposto ao mercúrio por 60 dias, o que qualifica essas enzimas/proteínas com potencial de biomarcador de exposição às espécies mercuriais. As isoformas da *actin*, que apresentaram “upregulated” e “downregulated” e as isoformas da *Hemoglobin subunit* que apresentaram “downregulated”, e aliado a isso, *spots* proteicos dessas proteínas apresentaram concentrações de mercúrio total da ordem de 138 a 750 ppm, o que reforça a qualificação dessas proteínas com potencial de biomarcador de exposição às espécies mercuriais. Ressalta-se que os resultados apresentados no presente trabalho, corroboram com resultados da literatura que destacam o rim como um órgão responsivo a intoxicação por metais tóxicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASANO, S. et al. (2000). Review article: acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. **Pathol Int.**, 50: 169-174. 10.1046/j.1440-1827.2000.01032.x.

BATAGLIOLI, I. C. et al. (2019). Physiological and functional aspects of metal-binding protein associated with mercury in the liver tissue of pirarucu (*Arapaima gigas*) from the Brazilian Amazon. **Chemosphere**, 236:124320. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.07.051.

BITTENCOURT, L. O. et al. (2021). From Molecules to Behavior in Long-Term Inorganic Mercury Intoxication: Unraveling Proteomic Features in Cerebellar Neurodegeneration of Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, 23:111-127. Doi: 10.3390/ijms23010111

BITTARELLO, A. C. et al. (2020). 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**, 711:134547. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134547.

BOROUSHAKI, M. T. et al. (2014). Protective effect of pomegranate seed oil against mercuric chloride-induced nephrotoxicity in rat. **Ren. Fail**, 36:1581- 1586. doi: 10.3109/0886022X.2014.949770

BRAGA, C. P. et al. (2015). Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. **Talanta**, 132:239–244. doi: 10.1016/j.talanta.2014.09.021.

BRAGA, C. P. et al. (2016). Liver Proteome in Diabetes Type 1 Rat Model: Insulin-Dependent and -Independent Changes. **OMICS - A Journal of Integrative Biology**, 20: 711-726. doi: 10.1089/omi.2016.0135

DAVIDSON, P. W., MYERS, G. J., WEISS, B. (2004). Mercury exposure and child development outcomes. **Pediatrics**, 113: 1023-1029.

Flower, D.R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J.*, 318 (1): 1–14. doi:10.1042/bj3180001.

GANFORNINA, M. D. et al. (2000). A phylogenetic analysis of the lipocalin protein family. **Molecular Biology and Evolution**. 17 (1): 114–126. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026224. PMID 10666711.

HAZELHOFF, M. H., BULACIO, R. P., TORRES, A. M. (2012). Gender related differences in kidney injury induced by mercury. **Int. J. Mol. Sci.**, 13:10523-10536,. doi: 10.3390/ijms130810523

KADE, I. J., JOSEPH, I. (2012). Mercury toxicity on sodium pump and organoseleniums intervention: a paradox. **J. Biomed. Biotechnol.**, 2012:1-12. doi:10.1155/2012/924549

LI, Y. et al (2007). Human serum albumin–mercurial species interactions. **J Proteome res.** 2007, 6, 6, 2277–2286. 10.1021/PR0700403.

Li, S. J. et al. (2010). Mercury-induced membranous nephropathy: clinical and pathological features. **Clin J Am Soc Nephrol**. 5: 439-444. 10.2215/CJN.07571009.

LIMA, P. M. et al (2010). Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SRXRF and FAAS after 2D PAGE separation: Preliminary results. **Talanta**, 82:1052-1056. doi: 10.1016/j.talanta.2010.06.023

MORAES, P. M. et al (2012). A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. **Biological Trace Element Research**, 150:195-199. doi: 10.1007/s12011-012-9502-x

MORAES, P. M. et al (2013). GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. **Food Chemistry**, 141:2614-2617. Doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.008

NELSON L. S. et al (2011): **Goldfrank's toxicologic emergencies**. New York: McGrawHill.

PARK, J. D., ZHENG, W. (2012). Human exposure and health effects of Inorganic and elemental mercury. **J. Prev. Med. Publ. Health**, 45: 344-352.
10.3961/jpmph.2012.45.6.344.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases (1963). **J. Am. Chem. Soc.**, 85:3533-3539. doi: 10.1021/ja00905a001

POLLARD, T.D. & EARNSHAW, W.C. (2006) – **Biologia celular**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2006.

RAFATI-RAHIMZADEH. et al (2014). Current approaches of the management of mercury poisoning: need of the hour. **DARU, J. Pharm. Sci.**, 22 (2014), p. 46, 10.1186/2008-2231-22-46

RANA, M. N, TANGPONG, J., RAHMAN, M. MD. (2018). Toxicodynamics of Lead, Cadmium, Mercury and Arsenic- induced kidney toxicity and treatment strategy: A mini review. **Toxicology Reports**, 5:704-713. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.05.012.

SHEVCHENKO, A. et al. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nat. Protoc.** 1:2856–2860.

TIMM, D. et al. (2001). Structural basis of pheromone binding to mouse major urinary protein (MUP-I). **Protein Science**. 10 (5): 997 1004. doi:10.1110/ps.52201. PMC 2374202. PMID 11316880

VERMA, S. et al. (2010). Accidental inorganic mercury chloride poisoning in a 2-year old child. **Indian J Pediatr.**, 77:1153-1155. doi: 10.1007/s12098-010-0143-9.

Uniprot, 2022. Uniprot.org.br [WWW Document]. 2022. URL <https://www.uniprot.org/> (accessed 8.18.22).

VIEIRA, J.C. S. et al (2015). Determination of the Mercury Fraction Linked to Protein of Muscle and Liver Tissue of Tucunaré (*Cichla* spp.) from the Amazon Region of Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 69:422-430. doi: 10.1007/s00244-015-0160-9.

Vieira, J. C. S. et al. (2017). Identification of protein biomarkers of mercury toxicity in fish. **Environmental Chemistry Letters**, 15: 717-724. doi: 10.1007/s10311-017-0644-0.

YEE, S., CHOI, B. H. (1996). Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. **Neurotoxicology**. 17: 17-26.

ZALUPS, R. K. (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacol. Rev.**, 52:113-143.