

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 07/07/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO DE BIOMARCADORES DE MERCÚRIO EM PEIXES  
DA AMAZÔNIA POR MEIO DA METALÔMICA E ANÁLISE  
DO ESTRESSE OXIDATIVO**

ALIS CORREIA BITTARELLO

Tese apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em  
Zootecnia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
título de doutor.

BOTUCATU - SP  
Julho - 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO DE BIOMARCADORES DE MERCÚRIO EM PEIXES  
DA AMAZÔNIA POR MEIO DA METALÔMICA E ANÁLISE  
DO ESTRESSE OXIDATIVO**

ALIS CORREIA BITTARELLO

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha  
Coorientadores: Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri  
Dra. Camila Pereira Braga

Tese apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em  
Zootecnia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
título de doutor.

BOTUCATU - SP  
Julho - 2017

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

Bittarello, Alis Correia.

Estudo de biomarcadores de mercúrio em peixes da Amazônia por meio da metalômica e análise do estresse oxidativo / Alis Correia Bittarello. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Coorientador: Luciana Francisco Fleuri

Coorientador: Camila Pereira Braga

Capes: 50400002

1. Eletroforese bidimensional. 2. Stress oxidativo.  
3. Mercúrio. 4. Espectrometria de massa.

Palavras-chave: Eletroforese bidimensional; Estresse oxidativo; Mercúrio; Proteína.

## *Dedico*

À minha querida mãe, pelo apoio incondicional, mesmo sem compreender muito bem os caminhos que escolhi, e por ter me ensinado a levantar a cabeça e a nunca desistir.

## *Agradeco*

Ao meu orientador, Dr. Pedro de Magalhães Padilha, pela oportunidade e confiança. A sua dedicação ao ensino é um exemplo que vou levar para a vida!

À minha coorientadora, Dra. Luciana F. Fleuri, pela paciência, atenção e carinho. Me espelho em sua maneira afetuosa, respeitosa e sensível de se relacionar com os alunos e colegas!

À minha outra coorientadora, colega e amiga, Dra. Camila P. Braga, que foi a primeira a me estender a mão. Sua generosidade ao ensinar é extraordinária!

À todos os professores que já tive e me ajudaram a trilhar este caminho, em especial: ao Professor Otaviano Carneiro da Cunha Filho (UDESC), que foi o primeiro a jogar a semente e acreditar que eu poderia ir um pouco mais longe; ao Professor Sergio Makrakis (UNIOESTE), que me deu o meu primeiro "sim", confiando em uma pessoa que "caiu de paraquedas" no seu grupo de pesquisas, me direcionando para o melhor sempre; ao Professor Wilson R. Boscolo (UNIOESTE), que me deu sua confiança e todo o suporte para que eu pudesse crescer como pessoa e profissional. Meu eterno obrigada aos senhores que me impulsionaram para chegar até este momento e me deram mais que lições acadêmicas, me deram lições de vida de valor inestimável!

Aos meus colegas de laboratório, por todo apoio. Especialmente ao José C. Vieira, pela paciência diante de todas as minhas dúvidas e questionamentos. Não tenho dúvidas de que o futuro lhe reserva muito sucesso!

Ao meu psicólogo Ronaldo Tadeu Felitti, por me ajudar a lidar com meus medos e inseguranças. Por me ensinar que a vida é fé, coragem e movimento. O Sr. é um ser de luz!

Aos meus queridos amigos de departamento: Vânia A. Oliveira (Vâ), Carol Rodrigues (Carolzinha), Gabriela V. Athanázio (Gabi), Danielle Silva (Dani), Elaine Morato (Elaininha), Fabio Fava (Fabinho), Edilson Ramos e Rodrigo Zaluski, pelas longas conversas, pelo apoio nas horas tristes, pelo carinho e pelos sorrisos abundantes.

Aos meus amigos da vida: João Gabriel R. Almeida, Celita Mattiello, Bruno P. Souza, Lucelia Tessaro, Denise Bastos, Mariucha Rocha e Junior De Carli, que participaram desta parte da minha vida me dando todo suporte "técnico", "logístico", afetivo e "auditivo". Sou melhor hoje porque tenho pessoas como vocês ao meu lado, que me levam para frente sempre, nem que seja na base do "empurrão"! Gratidão eterna!

## AUXÍLIOS FINANCEIROS

Projeto regulamentado pela Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL e desenvolvido no âmbito do Programa P&D da Energia Sustentável do Brasil S.A.

P&D: 6631-0001/2012  
Contrato Jirau 004/13



**CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



**FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo  
Processos: 2010/51332-5 e 2013/21297-1



**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
Processo: 472388/2011-8



**FUNDIBIO** – Fundação do Instituto de Biociências



**PROPG** – Pró-Reitoria de Pós-Graduação



## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

ESTUDO DE BIOMARCADORES DE MERCÚRIO EM PEIXES DA AMAZÔNIA POR MEIO DA METALÔMICA E ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	1
RESUMO GERAL .....	2
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	6
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	8
2.1. A Região Amazônica e a Problemática do Mercúrio .....	8
2.2. A Especiação do Mercúrio e sua Presença no Ambiente .....	9
2.3. Toxicocinética e Toxicodinâmica do Mercúrio .....	11
2.4. Biomarcadores de Toxicidade .....	15
2.5. Peixes como Indicadores da Saúde Ambiental .....	17
2.6. Radicais Livres, Espécies Reativas de Oxigênio, Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo.....	20
2.6.1. <i>Radicais livres e Espécies Reativas de Oxigênio</i> .....	20
2.6.2. <i>Antioxidantes Enzimáticos Endógenos</i> .....	23
2.6.3. <i>Contaminação Ambiental e o Estresse Oxidativo</i> .....	25
2.7. Proteômica e Metaloproteômica .....	27
3. REFERÊNCIAS .....	30

### CAPÍTULO II

BIOMARCADORES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO HEPÁTICO E RENAL DE PEIXES DA AMAZÔNIA .....	42
1. INTRODUÇÃO .....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	47
2.1. Coleta e Preparo das Amostras .....	47
2.2. Extração, Precipitação e Quantificação de Proteínas .....	48
2.3. Eletroforese Bidimensional .....	48
2.4. Determinação de Mercúrio Total .....	50
2.5. Preparo e Identificação dos <i>Spots</i> Proteicos .....	51
2.6. Análise da Atividade das Enzimas do Sistema Antioxidante .....	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	80
5. REFERÊNCIAS .....	82



### **CAPÍTULO III**

BIOMARCADORES MOLECULARES DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO MUSCULAR DE PEIXES AMAZÔNICOS .....	96
1. INTRODUÇÃO .....	99
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	100
2.1. Coleta e Preparo das Amostras .....	100
2.2. Extração, Precipitação e Quantificação de Proteínas .....	101
2.3. Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE) .....	102
2.4. Determinação de Mercúrio Total .....	103
2.5. Preparo e Identificação dos <i>Spots</i> Proteicos .....	104
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	104
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	115
5. REFERÊNCIAS .....	117

### **CAPÍTULO IV**

IMPLICAÇÕES .....	124
-------------------	-----

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

#### BIOMARCADORES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO HEPÁTICO E RENAL DE PEIXES DA AMAZÔNIA

- Tabela 1.** Determinação de mercúrio total nos tecidos e precipitados proteicos de fígado e rim de *Plagioscion squamosissimus* e *Colossoma macropomum* ..... 56
- Tabela 2.** Proteínas identificadas por espectrometria de massa, a partir da identificação e quantificação do mercúrio por GFAAS, no tecido hepático de *Plagioscion squamosissimus* e *Colossoma macropomum*..... 60
- Tabela 3.** Proteínas identificadas por espectrometria de massa, a partir da identificação e quantificação do mercúrio por GFAAS, no tecido renal de *Plagioscion squamosissimus* e *Colossoma macropomum*. ..... 62
- Tabela 4.** Atividade enzimática e concentração de hidroperóxido de lipídeos e mercúrio total no tecido hepático e renal de *Plagioscion squamosissimus* e *Colossoma macropomum*. ..... 78

### CAPÍTULO III

#### BIOMARCADORES MOLECULARES DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO MUSCULAR DE PEIXES AMAZÔNICOS

- Tabela 2.** Determinação da concentração mercúrio total no tecido e precipitado proteico de músculo de *Plagioscion squamosissimus* e *Colossoma macropomum* ..... 105
- Tabela 2.** Concentração de mercúrio nos spots proteicos obtidos por GFAAS. Massa molecular e ponto isoelétrico experimental de cada spot do tecido muscular de *Plagioscion squamosissimus* e *Colossoma macropomum* . ..... 108
- Tabela 3.** Proteínas identificadas por espectrometria de massa, a partir da identificação e quantificação do mercúrio por GFAAS, no tecido muscular de *Plagioscion squamosissimus* e *Colossoma macropomum*. ..... 109

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

#### ESTUDO DE BIOMARCADORES DE MERCÚRIO EM PEIXES DA AMAZÔNIA POR MEIO DA METALÔMICA E ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

- Figura 1.** Anatomia simplificada de um peixe teleósteo ..... 13
- Figura 2.** Representação da ordem sequencial de respostas a poluentes dentro de um sistema biológico e local de atuação dos biomarcadores ..... 16
- Figura 3.** *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840); nome vulgar: corvina, pescada ou pescada-branca ..... 18
- Figura 4.** Exemplar jovem e adulto de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), respectivamente; nome vulgar: tambaqui ..... 20
- Figura 5.** Papel das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona-S-transferase (GST), glutatona redutase (GR) e outros antioxidantes primários na defesa contra as espécies reativas de oxigênio (ERO). GSH = glutatona reduzida, GSSG = glutatona oxidada ..... 25

### CAPÍTULO II

#### BIOMARCADORES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO HEPÁTICO E RENAL DE PEIXES DA AMAZÔNIA

- Figura 1.** Mapa dos locais de coleta no Rio Madeira, a jusante e a montante da área do UHE Jirau-RO. 1-Caripunas (09°11'16,98"S 064°36'44,53"W); 2-Área da represa; 3-Rau (09°16'12,8"S 064°41'14,1"W); 4-São Lourenço (09°23'26,5"S 064°53'05,7"W) ..... 47
- Figura 2.** Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por eletroforese 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido hepático de *Plagioscion squamosissimus* (A) e *Colossoma macropomum* (B) ..... 57
- Figura 3.** Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por eletroforese 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido renal de *Plagioscion squamosissimus* (A) e *Colossoma macropomum* (B)..... 58

### CAPÍTULO III

#### BIOMARCADORES MOLECULARES DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO MUSCULAR DE PEIXES AMAZÔNICOS

- Figura 1.** Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por eletroforese 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular de *Plagioscion squamosissimus* (A) e *Colossoma macropomum* (B). ..... 107