

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 23/02/2019.

ESTUDO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO MERCÚRIO EM PEIXES DA REGIÃO AMAZÔNICA

Bruna Cavecci Mendonça

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biomoléculas Estrutura e Função.

*Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães
Padilha*

Botucatu – SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO MERCÚRIO EM PEIXES DA REGIÃO AMAZÔNICA

Bruna Cavecci Mendonça

Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de concentração Biomoléculas Estrutura
e Função.

*Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães
Padilha*

**Botucatu – SP
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

Mendonça, Bruna Cavecci.

Estudo de proteínas associadas ao mercúrio em peixes da
região Amazônica / Bruna Cavecci Mendonça. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Capes: 20801017

1. Peixe - Pesquisa. 2. Pescados - Contaminação. 3. Stress
oxidativo. 4. Mercúrio. 5. Metaloproteínas. 6. Toxicologia.
7. Amazônia.

Palavras-chave: ESI-MS/MS; Estresse oxidativo; GFAAS;
Mercúrio; Metalômica.

DEDICATÓRIA

***Ao meu Deus e Pai que me guarda e me conduz com Amor,
Graça e Misericórdia pelos caminhos dessa vida!***

***Ao meu esposo João Inácio de Mendonça que com todo seu
amor e carinho sempre me ajuda, meu grande presente de
Deus!***

***Meus pais (Claudio e Neide), se hoje sou o que sou é porque
vocês se dedicaram e muito, essa conquista é de vocês!***

Ao meu irmão (Matheus), meu parceiro de sempre!

***Aos meu Orientador (Pai Acadêmico), que sempre me
estimulou!***

***A cada professor e colega de profissão que passou por minha
vida!***

A minha casa UNESP que aprendi a amar e representar!

Dedico

AGRADECIMENTOS



Agradecimento em especial à FAPESP, Processo nº 2014/02638-5



E ao 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

Agradeço a Deus, pela Vida! Ele me guarda e me guia em cada momento da minha vida!

Ao meu esposo (“Algumas pessoas vivem pela fortuna, pela fama, pelo poder, pensam que as coisas materiais definem o que elas são por dentro. Eu já me senti assim antes, Mas a vida é sem graça, Tão cheia de coisas superficiais, Algumas pessoas querem tudo, Mas eu não quero nada, Se não for você, Se eu não tiver você.”) – Alícia Keys.

Aos meus pais, pessoas que me inspiram a cada dia, que foram e continuam sendo pessoas que me fazem cristã, humana, honesta, cidadã... Obrigada pelo amor, apoio e tudo mais que sempre fizeram por mim, desde que souberam que teriam mais uma integrante na família!

Ao meu irmão Matheus, um cara que sempre olhou pra mim e disse: “Você vai conseguir!” Você é tudo o que uma irmã gostaria de ter!

Ao meu Orientador, que sempre me apoiou e me inspirou!

A UNESP minha casa acadêmica, ao Instituto de Biociências de Botucatu pela oportunidade de ser uma doutoranda no programa de Biologia Geral e Aplicada, ao Departamento de Química e Bioquímica.

Ao Laboratório de Bioquímica da FOB-USP Bauru, na pessoa da Prof^ª. Dr^ª. Marília Afonso Rabelo Buzalaf e da Bióloga e Dra..Aline Leite.

A cada amigo Laboratório (Alis, Cilene, Dra. Camila, José, João, Vânia), como esse trabalho iria existir sem a presença, conversas, amizades, risadas e tantas outras coisas que nos fazem uma equipe?

HOMENAGEM AO ORIENTADOR

Pedro de Magalhães Padilha

Mesmo depois de 10 anos ainda me lembro do primeiro dia de aula com você!

Hoje vejo o quanto suas aulas acrescentaram ao meu conhecimento não só na graduação, mas na pós-graduação também, o quanto o seu profissionalismo (como meu orientador), caráter e paixão pelo que faz, estão a cada dia me fazendo ser uma profissional melhor e acreditar que quando trabalhamos com sinceridade, amor e seriedade há resultados e alegrias.

Obrigada por acreditar em mim, obrigada por ter sido meu orientador desde o meu primeiro ano de faculdade e ter me dado inúmeras oportunidades.

Como digo o senhor é meu PAI ACADÊMICO e a CILENE MINHA MÃE ACADÊMICA!

Obrigada por TUDO!

São tantas coisas, tantos anos, tantos desafios, mas como já te disse você e sua família, são muito importantes pra mim, vocês fazem parte da minha vida, jamais me esquecerei de todo o apoio!

Deus é o nosso melhor amigo, confie Nele sempre!

SUMÁRIO

PÁGINAS

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A região Amazônica.....	1
1.2. Problemática do mercúrio.....	2
1.3. Bioacumulação e Biomagnificação do mercúrio.....	3
1.4. Detecção e quantificação de mercúrio.....	5
1.5. Proteômica.....	6
1.6. Metaloproteômica.....	6
1.7. Metalotioneínas (MTs).....	7
1.8. Metalotioneínas como biomarcadores.....	8
1.9. Procedimento de extração e precipitação de proteínas.....	9
1.10. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE).....	9
1.11. Caracterização das proteínas.....	10
1.11.1. ESI-MS/MS.....	10
1.11.2. Shotgun.....	12
1.12. Ferramentas de Bioinformática.....	12
1.13. Estresse Oxidativo.....	13
1.13.1 Estresse oxidativo e metais tóxicos.....	14
1.13.2. Estresse oxidativo e o mercúrio.....	16
1.13.3. Efeitos do mercúrio nos grupos tióis das células.....	17
1.13.4. A inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial por mercúrio.....	18
1.13.5. Efeitos do mercúrio sobre a homeostase do cálcio.....	18
1.13.6. Peroxidação lipídica induzida por mercúrio.....	19
1.13.7. Efeitos do mercúrio sobre outras enzimas antioxidantes.....	19
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Reagentes, soluções e limpeza de frascos e vidrarias.....	22
3.2. Estações de coleta.....	25
3.3. Amostragem.....	27
3.4. Espécies de estudo.....	28

3.4.1. <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> (Dourada).....	28
3.4.2. <i>Mylossoma</i> sp., <i>Myleus</i> sp. (Pacu).....	28
3.4.3. <i>Prochilodus nigricans</i> (Curimatã).....	29
3.5. Tratamento das amostras.....	29
3.6. Otimização dos procedimentos de extração e precipitação das proteínas.....	29
3.6.1.Extração e precipitação 1.....	29
3.6.2. Extração e precipitação 2.....	30
3.7. Determinação de proteína total.....	31
3.8. Determinação de mercúrio total.....	32
3.8.1. Preparo das amostras.....	32
3.8.2. Determinação de Mercúrio por GFAAS.....	33
3.9. Otimização de métodos eletroforéticos.....	33
3.10. Preparo dos spots para a quantificação de mercúrio por GFAAS.....	35
3.11. Preparo dos spots para a identificação por ESI-MS/MS.....	36
3.12. Preparo das amostras para identificação por shotgun.....	39
3.13. Ferramentas de Bioinformática utilizadas.....	40
3.14. Procedimento de extração proteica e quantificação de graus de estresse oxidativo.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Determinação de Proteína Total.....	41
4.2. Determinação de mercúrio total.....	42
4.3. Otimização das separações eletroforéticas.....	43
4.4. Estudo das imagens dos géis de 2D-PAGE.....	54
4.5. Caracterização dos spots proteicos na região de 20,10kDa a 30,00kDa por ESI-MS/MS.....	64
4.6. Gráficos obtidos através do programa Blast2go.....	68
4.6.1. Tecido hepático de Dourada.....	68
4.6.2. Tecido hepático de Pacu.....	71
4.7. Avaliação do estresse oxidativo.....	76
5. Considerações e conclusões.....	77
ANEXO I - Tabela com os spots proteicos do padrão de Metalotioneínas caracterizados por ESI-MS/MS.....	79
ANEXO II - Tabela com spots proteicos caracterizados por ESI-MS/MS das 3 espécies de estudo sem a presença de mercúrio.....	90

6. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	96
6.1. Disciplinas Cursadas.....	96
6.2. Formação complementar.....	96
6.3. Artigos publicados.....	97
6.4. Textos em jornais de notícias/revistas.....	103
6.5. Comunicação em congressos.....	103
6.6. Resumos publicados em anais de congressos.....	105
6.7. Apresentação de trabalhos.....	108
6.8. Palestras e/ou minicursos proferidos em eventos.....	109
6.9. Participação em eventos.....	109
6.10. Outras atividades realizadas.....	110
7. REFERÊNCIAS.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-PAGE Eletroforese em Gel Poliacrilamida em duas dimensões

CHAPS 3-[(3- cloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato

DNA ácido desoxirribonucléico

DTT 1,4-ditiotreitol

ESI Ionização por *Electrospray*

ESI-MS/MS Espectrometria de massas em sequência com ionização por electrospray

GFAAS Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Forno de Grafite

IEF Isoeletrofocalização

kDa KiloDalton ($1 \text{ Da} = 1,661 \times 10^{-24} \text{ g}$)

m/z Relação Massa Carga

MM Massa Molecular

pH Potencial de Hidrogênio

pI Ponto Isoelétrico

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

spot Banda 2D de proteínas

TEMED N,N',N,N'-tetrametiletenodiamina

NADPH Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentração proteica em mg mL^{-1} nos pellets dos tecidos muscular e hepático obtidos nas extrações 1 e 2 de cada espécie.....	41
Tabela 2. Concentração de Mercúrio quantificada em tecido muscular e hepático de Dourada, Pacu e Curimatã e em seus respectivos pellets com diferentes extrações.....	42
Tabela 3. Proteínas identificadas com padrão de metalotioneínas, spot 16.....	53
Tabela 4. Análise de correlação entre os géis considerando três corridas eletroforéticas no fracionamento das proteínas das amostras de tecido muscular e hepático das espécies de peixes estudadas utilizando extração e precipitação 2 e programação B.....	54
Tabela 5. Valores obtidos na determinação da concentração de mercúrio por GFAAS nos spots proteicos das amostras de hepático de dourada, pacu e curimatã.....	55
Tabela 6. Proteínas identificadas por ESI-MS/MS com presença de mercúrio das 3 espécies de estudo.....	66
Tabela 7. Atividade enzimática e de HP de cada espécie e tecido e [Hg].....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Destaque do rio Madeira na Bacia Amazônica - Por Kmusser - Own work using Digital Chart of the World and GTOPO data.....	2
Figura 2. Esquema simplificado do ciclo do Hg na atmosfera e suas interfaces. Os pontos de interrogação indicam lacunas de conhecimento. (Adaptado de Parisa et al., 2015).....	5
Figura 3. Exemplo de gel de eletroforese bidimensional.....	10
Figura 4. Componentes básicos de espectrômetro de massa simples. (Murray et al., 2013).....	12
Figura 5. Reação de Fenton (Ercal et al., 2001).....	15
Figura 6. Possíveis mecanismos envolvidos no estresse oxidativo induzido por metais (Adaptado de Ercal et al., 2001).....	16
Figura 7. Entrada parte técnica usina.....	25
Figura 8. Parte jusante da barragem.....	25
Figura 9. Parte montante da barragem.....	25
Figura 10. Vista das casas de turbinas.....	25
Figura 11. Parte da barragem em construção.....	25
Figura 12. Calha para os peixes.....	25
Figura 13. Preparativos para a coleta.....	26
Figura 14. rio Madeira, a montante.....	26
Figura 15. Base de apoio das coletas.....	26
Figura 16. Barcos utilizados nas coletas.....	26
Figura 17. Mapa do rio Madeira com as estações de coleta destacadas em Amarelo, no ponto vermelho se encontra a Usina.....	26
Figura 18. Coleta sendo realizada.....	27
Figura 19. Amostras identificadas e armazenadas.....	27
Figura 20. Dourada (<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>) Ordem: Siluriformes; Família: Pimelodidae.....	28

Figura 21. Pacu (<i>Mylossoma sp.</i> , <i>Myleus sp.</i>) Ordem: Characiformes; Família: Characidae.....	28
Figura 22. Curimatã (<i>Prochilodus nigricans</i>), Ordem: Characiformes; Família: Prochilodontidae.....	29
Figura 23. Géis de músculo de Curimatã com concentração de 18% de poliacrilamida e pH 3-10, o gel A corresponde a extração 1 e o gel B corresponde a extração 2.....	43
Figura 24. Géis de músculo de Dourada (A), músculo de Pacu (B) e músculo de Curimatã (C) com concentração de 15% de poliacrilamida e fitas pH 3-10, corrida A, extração 1.....	44
Figura 25. Géis de tecido muscular (A) e tecido hepático e (B) de Dourada com concentração de 15% de poliacrilamida e fitas pH 3-10, corrida B, extração 1.....	45
Figura 26. Géis de tecido muscular (A) e tecido hepático (B) de Pacu com concentração de 15% de poliacrilamida e fitas pH 3-10, corrida B, extração 1.....	46
Figura 27. Géis de tecido muscular (A) e tecido hepático (B) de Curimatã com concentração de 15% de poliacrilamida e fitas pH 3-10, corrida B, extração 1.....	47
Figura 28. Géis 15% e pH 3-10, extração 2, corrida B, (A) tecido muscular Dourada, (B) tecido muscular Pacu, (C) tecido muscular Curimatã.....	48
Figura 29. Géis 15% e fitas pH 3-10, extração 2, corrida B, (A) tecido hepático Dourada, (B) tecido hepático Pacu, (C) tecido hepático Curimatã.....	49
Figura 30. Gel 15% obtido na corrida eletroforética dos padrões de 14,4 a 97,0 kDa e pI 3-10, com o padrão de MTs.....	51
Figura 31. Gel 15%, pH 3-10, Músculo Dourada, não foi detectado mercúrio em nenhum spot (azul) da região proposta (destacada em vermelho).....	56
Figura 32. Gel 15%, pH 3-10, Fígado de Dourada, os spots marcados em vermelho (na região proposta) são os que apresentam mercúrio, juntamente com os spots em 3D (spot selecionado está com a cor verde).....	57
Figura 33 Gel 15%, pH 3-10, Fígado de Dourada, os spots marcados em vermelho são os que apresentam mercúrio.....	58
Figura 34. Gel 15% de Músculo de Pacu, não foi detectado Mercúrio em nenhum spot da região proposta.....	59
Figura 35. Gel 15%, pH 3-10, Fígado de Pacu, o spot marcado em vermelho é o que apresenta mercúrio, dentro da região proposta; a imagem ao lado representa o spot em 3D (spot selecionado está com a cor verde).....	60
Figura 36. Gel 15%, pH 3-10, Fígado de Pacu, os spots marcados são os que apresentaram presença de mercúrio.....	61

Figura 37. Gel 15%, pH 3-10, Músculo Curimatã, não foi detectado mercúrio em nenhum spot da região proposta.....	61
Figura 38. Gel 15%, pH 3-10, Músculo Curimatã, os spots marcados apresentaram mercúrio.....	62
Figura 39. Gel 15%, pH 3-10, Fígado de Curimatã, o spot marcado em vermelho apresenta mercúrio. A imagem ao lado representa o spot em 3D (spot selecionado está com a cor verde).....	63
Figura 40. Gráfico dos componentes celulares das proteínas do tecido hepático de Dourada com presença de mercúrio.....	68
Figura 41. Score da distribuição dos componentes celulares.....	68
Figura 42. Processos biológicos das proteínas ligadas ao mercúrio.....	69
Figura 43. Score dos processos biológicos.....	69
Figura 44. Funções moleculares das proteínas ligadas ao mercúrio.....	70
Figura 45. Score das funções moleculares das proteínas.....	70
Figura 46. Gráfico dos componentes celulares das proteínas do tecido hepático de Dourada com presença de mercúrio.....	71
Figura 47. Score do componente celular.....	71
Figura 48. Processos biológicos das proteínas do fígado de pacu com presença de mercúrio.....	72
Figura 49. Score do processo biológico das proteínas.....	73
Figura 50. Função molecular das preteínas.....	73
Figura 51. Score da função molecular.....	74

Resumo

O peixe é uma importante fonte de proteínas de alto valor biológico, vitaminas e minerais. Porém, este alimento é também uma das principais vias de exposição humana a contaminantes tóxicos como o metilmercúrio (MeHg). Assim a sua acumulação no peixe pode predispor sérios riscos para a saúde humana. As altas concentrações de mercúrio encontrados em solo, sedimentos, peixes e humanos na Amazônia brasileira têm sido estudados intensamente pela comunidade científica nas últimas décadas, procurando-se elucidar os mecanismos de toxicidade das espécies mercuriais. As espécies mercuriais ligam-se preferencialmente às proteínas. Podendo significar que a fração biodisponível das espécies mercuriais nas diferentes espécies de peixes pode ser dependente da forma como estas estão ligadas a essas proteínas. Portanto esta proposta de trabalho buscou otimizar procedimentos eletroforéticos por 2D-PAGE para fracionamento e identificação de proteínas responsáveis pelo transporte de mercúrio em amostras de tecido muscular e hepático de peixes coletados no reservatório da Usina Hidrelétrica de Jirau – no rio Madeira; utilizando o método de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), para determinação de mercúrio nos tecidos e spots proteicos obtidos; avaliou o estresse oxidativo dos peixes contaminados com mercúrio por meio das atividades das enzimas catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD), bem como das concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP); e caracterizou as proteínas transportadoras de mercúrio por Espectrometria de Massas (ESI-MS/MS) e posteriormente por Shotgun que envolve a união de duas técnicas a Espectrometria de Massas e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (ESI-MS/MS + HPLC), finalizando o trabalho com ferramentas de bioinformática. Nesse trabalho três espécies de peixes, apreciadas na região e também comercializadas, foram estudadas *Brachyplatystoma rousseauxii* (Dourada), *Mylossoma sp.*, *Myleus sp.* (Pacu) e *Prochilodus nigricans* (Curimatã), utilizou-se o tecido muscular e hepático de cada uma dessas espécies. Os resultados obtidos demonstram alta concentração de mercúrio no tecido hepático das três espécies de peixe estudadas numa média treze vezes mais concentrada do que no tecido muscular. Após a otimização de extrações, precipitações e corridas eletroforéticas, foram identificadas duas proteínas ligadas ao mercúrio a *Triosephosphate isomerase A* em seis spots proteicos sendo 5 deles no fígado de Dourada e 1 spot proteico no fígado de Pacu, e a

Protein FAM45A no spot proteico de fígado de Cutimatã. Os dados gerados pelos programas de bioinformática confirmam a tendência dessas proteínas estarem ligadas ao mercúrio.

Abstract

Fish is an important source of high biological value proteins, vitamins and minerals. However, this food is also one of the main routes of human exposure to toxic contaminants such as methylmercury (MeHg). Thus, their accumulation in the fish may predispose serious risks to human health. The high concentrations of mercury found in soil, sediments, fish and humans in the Brazilian Amazon; have been studied intensively by the scientific community in the last decades, trying to elucidate the mechanisms of mercury toxicity. Mercurial species bind preferentially to proteins. It may mean that the bioavailable fraction of mercury species in different species of fish may be dependent on the way they are bound to these proteins. Therefore, this work proposal sought to optimize 2D-PAGE electrophoretic procedures for fractionation and identification of proteins responsible for the transport of mercury in samples of muscle and liver tissue collected in the reservoir of the Jirau Hydroelectric Power Plant - on the Madeira river; using atomic absorption spectrometry in graphite furnace (GFAAS), for the determination of mercury in the tissues and protein spots obtained; Evaluated the oxidative stress of fish contaminated with mercury through the activities of the enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD), as well as the concentrations of lipid hydroperoxide (HP); and characterized by mercury transport proteins by Mass Spectrometry (ESI-MS/MS) and later by Shotgun involving the combination of Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography (ESI-MS/MS + HPLC) Finalizing the work with bioinformatics tools. In this work three species of fish, appreciated in the region and also commercialized, were studied *Brachyplatystoma rousseauxii* (Dourada), *Mylossoma sp.*, *Myleus sp.* (Pacu) and *Prochilodus nigricans* (Curimatã), the muscle and liver tissue of each of these species was used. The results obtained demonstrate a high concentration of mercury in the hepatic tissue of the three fish species studied in an average thirteen times more concentrated than in muscle tissue. After optimization of extractions, precipitations and electrophoretic runs, two mercury-bound proteins were identified: *Triosephosphate isomerase A* in six protein spots, five of them in the liver of Dourada and one protein spot in the liver of Pacu, and *Protein FAM45A* in the protein spot of Cutimatã liver. The data generated by the bioinformatics programs confirm the tendency of these proteins to be linked to mercury.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A região amazônica

A Amazônia é uma floresta composta por vegetação latifoliada (folhas largas e grandes), úmida, que cobre a maior parte da Bacia Amazônica da América do Sul. Esta bacia abrange 7 milhões de km², dos quais 5,5 km² são cobertos pela floresta tropical. Esta região inclui territórios pertencentes a nove países. A maioria das florestas está contida dentro do Brasil, com 60% da floresta (ocupando os estados do Pará, do Amazonas, do Amapá, do Acre, de Rondônia e de Roraima e algumas partes do Maranhão, Tocantins e do Mato Grosso), seguida pelo Peru com 13% e com partes menores na Colômbia, Venezuela, Equador, Bolívia, Guiana, Suriname e Guiana Francesa. Representa mais da metade das florestas tropicais remanescentes no planeta e compreende a maior biodiversidade em uma floresta tropical no mundo. É um dos seis grandes biomas brasileiros (Linhares & Gewandsznajder, 1998).

A floresta amazônica é conhecida como abrigo da maior biodiversidade do mundo, pois nela podem ser encontradas milhares de espécies animais, vegetais e micro-organismos. Além da variedade de seres biológicos, a região conta com muitos rios, os quais formam a maior reserva de água doce de superfície disponível no mundo (a maior bacia hidrográfica do planeta). Seu principal rio é o Amazonas, que possui mais de mil afluentes (rios menores que nele desaguam), é o mais largo do mundo e grande responsável pelo desenvolvimento da floresta. (Lima, 2007).

O rio Madeira (Figura 1) é o maior afluente do rio Amazonas com extensão total aproximada de 3.315 km (17º maior do mundo em extensão). É caracterizado por alta produtividade de sedimentos, principalmente em suspensão. Contribui com 50% da carga total de sedimentos suspensos transportados pelo rio Amazonas (Latrubesse et al., 2005) e com 15% da água que o rio Amazonas que desagua no Oceano Atlântico (Bastos et al., 2007). A sua bacia hidrográfica se espalha pela Bolívia e pelo Brasil em uma área de 690.103 km², abrangendo 14% da floresta amazônica brasileira; geograficamente 25% de sua bacia é nos Andes, 27% nas formações rochosas e 48% na planície amazônica (Maurice-Bourgoin et al., 2000; Sterling, 1979; Smith, 2002).



1.2. Problemática do Mercúrio

O uso de amálgama de mercúrio para a extração de ouro a partir de minério presentes nos sedimentos é amplamente utilizada por garimpeiros em vários países tropicais, como Bolívia, Brasil, Colômbia, Indonésia, Peru, Filipinas, Venezuela e Vietnã. A sua utilização é particularmente difundida na Amazônia brasileira, onde o Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE) que possui um projeto sobre Mercúrio, estimou em 1993 aproximadamente 650.000 garimpeiros usando métodos inadequados de mineração de Hg na Amazônia (Jernelov & Ramel, 1994).

As técnicas de amalgamação de Hg utilizadas no Brasil são altamente variáveis, tendo mineração individual ou mineração de ouro com várias pessoas utilizando dragas a diesel para escavar grandes volumes de sedimentos do leito dos rios. Independentemente da escala os procedimentos envolvem a mistura de Hg com uma fração mineral retirada dos sedimentos, a produção de densos grãos de amálgama [Hg: Au] que podem ser separadas a partir do resto do sedimento e a subsequente torrefação do amálgama que libera o Hg em forma de vapor e o pó de aluvião como uma forma

pura do ouro. No processo o mercúrio é liberado para o ambiente como vapor para a atmosfera. Dada a potencial toxicidade do Hg, o seu lançamento na maior floresta do mundo em tamanho e diversidade, se tornou um grande problema ambiental durante as últimas décadas (Lacerda & Salomons, 1992; Porcella, 1994). Com isso numerosas pesquisas para compreender os potenciais impactos ecológicos têm sido realizadas (Martinelli et al, 1988; Malm et al., 1990; Lacerda et al., 1991; Pfeiffer et al., 1991; Lacerda & Salomons, 1992; Reuther, 1994). A maioria destas investigações têm se centrado em locais de mineração e concluíram que:

1. As concentrações de Hg na água, sedimentos e biota estão acima das médias globais;
2. As altas concentrações de Hg estão relacionadas com o agente antropogênico que libera Hg para o ambiente, ou naturais.

No entanto, os impactos regionais de amálgama de mercúrio resultante da mineração no maior sistema fluvial do mundo têm ainda a ser determinado; e vários estudos publicados nos últimos anos têm argumentado que os valores elevados de Hg na bacia Amazônica pode estar relacionada com outras atividades humanas incluindo a queima de biomassa (como a queima de árvores) (Meech et al., 1997) e também sendo reforçada pela erosão do solo, resultante do desmatamento (Roulet & Lucotte, 1999). Em 1999, Forsberg et al. argumentaram que a presença de Hg no solo ocorre naturalmente devido a erosão que ocorre nas montanhas rochosas (Cordilheira dos Andes e vulcões Amparo, Cotopaxi, Licancabur) advindas principalmente do rio Madeira, afirmando que a Amazônia é “O maior reservatório de mercúrio no ecossistema e a maior fonte potencial de mercúrio para ambientes aquáticos”.

5. Considerações e Conclusões

Nesta tese de doutoramento foi visto que trabalhar com metaloproteômica em conjunto de animais que precisam ser capturados demanda paciência, organização, criteriosidade, domínio de conteúdo e prática laboratorial. Toda a logística e pessoal envolvidos nas coletas se devem ao apoio da empresa NATURAE e ao projeto P&D citado, todo o desenho amostral e coletas realizadas exigem grande preparo de equipe. Podemos concluir parcialmente que a recuperação do mercúrio dentro da metodologia com GFAAS foi muito satisfatória em torno de 80%; a segunda extração que é favorável para a obtenção de MTs em conjunto com a otimização da 2D-PAGE nos conduziu para o estudo das imagens dos géis e o mapeamento de mercúrio por GFAAS, para caracterização dos spots obtidos, com presença de Hg, por espectrometria de massas (ESI-MS/MS). O objetivo final do trabalho era caracterizar metalotioneínas como biomarcadoras de toxicidade de mercúrio. A partir dos dados obtidos com os géis de eletroforese bidimensional (2D-PAGE) utilizando o padrão de metalotioneínas como amostra, que indicaram a presença de somente uma metalotioneína caracterizada como *Metallothionein-2C*, e com base nesse resultado, direcionou-se os estudos para a região do gel onde a *Metallothionein-2C* foi encontrada. Com isso para as três espécies de estudo e seus dois tecidos estudados foram obtidos géis com *matching* acima de 80%. Nessa região dos géis foram caracterizados 44 spots por ESI-MS/MS, sendo que, em apenas sete spots as determinações por GFAAS indicaram presença de mercúrio e nenhum deles foi relacionado como MTs. Experimentos de *shot-gun* foram realizados nos tecidos das espécies estudadas e confirmaram a ausência de MTs. Com relação ao estresse oxidativo, assim como em relação as MTs, até o momento, pode-se inferir que as concentrações de mercúrio nas espécies de peixes amazônico estudados, provavelmente não interfere nos sistemas de defesa dos peixes.

Portanto há a necessidade de mais estudos relacionando as concentrações mercuriais com todos os fatores bióticos e abióticos da região, relacionando assim um ao outro e fomentando com mais dados as pesquisas na Amazônia e assim podendo compreender a relação que ocorre entre as concentrações mercuriais e os seres humanos dessa região que a

cada estudo se torna mais intrigante, necessitando ir mais a fundo.

7. Referências Bibliográficas

Achá, D., Pabón, C. A., Hintelmann, H., Mercury methylation and hydrogen sulfide production among unexpected strains isolated from periphyton of two macrophytes of the Amazon. FEMS Microbiol. Ecol. 2012, 80,637–645.

Afonso, C.; Lourenço, H. M.; Abreu Dias; Nunes, M. L.; Castro, M. Contaminant metals in black scabbard fish (*Aphanopus carbo*) caught of Madeira and Azores. Food Chemistry, 101: 120-125, 2007.

Afonso, C.; Lourenço, H. M.; Pereira, C.; Martins, M. F.; Carvalho, M. L.; Castro, M.; Nunes, M. L. Total and organic mercury, selenium and α -tocopherol in some deep-water fish species. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88: 2543-2550, 2008.

Amiard, J.C., Cosson, R.P., Lesm'etallothion'eines. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), Biomarqueurs en 'ecotoxicologie. Aspects Fondamentaux. Masson, Paris, pp. 53–66, 1997.

Andersen, H.R., Andersen, O. Effects of dietary α -tocopherol and β -carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. Pharmacol. Tox. 1993, 73, 192-201.

Anderson, N. L., and Anderson, N. G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis 19, 1853–1861, 1998. doi: 10.1002/elps.1150191103

Ariza, M.E., Bijur, G.N., Williams, M.V. Lead and mercury metagenesis: Role of H_2O_2 , superoxide dismutase, and xanthine oxidase. Environ. Mol. Mutagen 1998, 31, 352-361.

Avramova, D.A., Synsynys, B.I., Romantsova, V.A., Rott, G.M., Metallothionein level estimation in the bioassay method for water quality assessment in freshwater reservoirs polluted by waste waters. In: Klaassen (Ed.), Metallothionein IV. Birkh"ausser Verlag, Basel, pp. 633–640, 1999.

Balcom, P.H., Fitzgerald, W.F., Vandal, G.M., Lamborg, C.H., Langer, C.S., Rolfhus, K.R., et al. Mercury sources and cycling in the Connecticut River and Long Island Sound. Marine Chemistry 2004, 90:53–74.

Barbosa, A.C., de Souza, J., Dórea, J. G., Jardim, W. F., Fadini, P. S., Mercury bio-magnification in a tropical black water, rio Negro, Brazil. Arch. Environ. Con- tam. Toxicol. 2003, 45, 235–246.

Barka, S., Processus de d'étoxication et localisation tissulaire des métaux traces (cuivre, zinc, nickel, cadmium, argent et mercure) chez un crustacé marin Tigriopus brevicornis (Müller). Etude du biomarqueur “protéines type métallothionéines”, de La bioaccumulation des métaux et des conséquences sur le transfert trophique. Thèse de Doctorat, Université de Paris 6, 19 septembre 2000, 204 p. + annexes.

Barnett, J. P., Scanlan, D. J., and Blindauer, C.A. Protein fractionation and detection for metalloproteomics: challenges and approaches. Anal. Bioanal. Chem. 402, 3311–3322, 2012. doi:10.1007/s00216-012-5743-y

Bastos, W. R., Dórea, J.G., Bernardi, J.V.E., Lauthartte, L.C., Mussy, M.H., Lacerda, L.D., Malm, O., Mercury in fish of the Madeira River (temporal and spatial assessment), Brazilian Amazon. Environ. Res. 2015, 140, 191–197.

Bastos, W.R., Almeida, R., Dórea, J.G., Barbosa, A.C., Annual flooding and fish-mercury bioaccumulation in the environmentally impacted rio Madeira (Amazon). Ecotoxicology 2007, 16, 341–346.

Bazan, N.G. Arachidonic acid in the modulation of excitable membrane function and at the onset of brain damage. Ann. NY Acad Sci. 1989, 559, 1-16.

Beranova-Giorgianni, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22(5): 273-281.

Berg, J.M.; Stryer, L.; Tymoczko, J.L. Livro - Bioquímica - 7ª Edição – Guanabara Koogan, 2014, p. 1114.

Berkman, T.; Stenstedt, T. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods. Amersham Biosciences, Uppsala 1998.

Bondy, S.C. Oxygen generation as a basis for neurotoxicity by metals. In: Toxicology of Metals. Chang, L.W.; Eds.; CRC Press, Boca Raton, 1996, pp 699-706.

Boveris, A., Oshino, N., Chance, B. The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem. J. 1972, 128, 617-630.

Braga, C.P., Bittarello, A.C., Padilha, C.C.F., Leite, A.L., Moraes, P.M., Buzalaf, M.A.R., Zara, L.F., Padilha, P.M. Mercury fractionation in dourada (Brachyplatystoma rousseauxii) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. Talanta, 2015, 132: 139-244.

Brouwer, M., Winge, D.R., Gray, W.R., Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the American lobster Homarus americanus. J. Inorg. Biochem. 35,

289–303, 1989.

Butler, R.A., Roesijadi, G., Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of a molluscan metallothionein mRNA. *Aquat. Toxicol.* 54, 59–67, 2001.

Chavez, E., Holguin, J.A. Mitochondrial calcium release as induced by Hg^{2+} . *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 3582–3587.

Cizdziel, J., Hinnert, T., Cross, C., Pollard, J., Distribution of mercury in the tissues of five species of freshwater fish from Lake Mead, USA. *J. Environ. Monit.* 2003, 5, 802–807.

Cooper, A.J.L. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu. Rev. Biochem.* 1983, 52, 187–222.

Correia, R.R., Miranda, M. R., Guimarães, J. R., Mercury methylation and the microbial consortium in periphyton of tropical macrophytes: effect of different inhibitors. *Environ. Res.* 2012, 112, 86–91.

Cosson, R.P., Amiard, J.-C. Use of metallothionein as biomarkers of exposure to metals. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F. (Eds.), *Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment*. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA, pp. 79–111, 2000.

Cosson, R.P., Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives. *Cell. Mol. Biol.* 46 (2), 295–309, 2000.

Crinnion, W.J. Environmental Medicine, part three: Long-term effects of chronic low dose mercury exposure. *Altern. Rev. Med.* 2000, 5, 209–223.

Cuyper, A., Vangronsveld, J., Clijsters, H. The chemical behavior of heavy metals play a prominent role in the induction of oxidative stress. *Free Rad. Res.* 1999, 31, 39–43.

Da Silva, M. A. O., Garcia, J. S., Souza, G. H. M. F., Eberlin, M. N., Arruda, M. A. Z. Evaluation of sample preparation protocols for proteomic analysis of sunflower leaves. *Talanta*, 2010, 80: 1545–1551.

Davis, S.R., Cousins, R.J. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J. Nutr.* 130, 1085–1088, 2000.

Depledge, M.H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi, M.C., Leonzio, C. (Eds.), *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 261–285, 1993.

Dórea, J. G.; Barbosa, A. C. Anthropogenic impact of mercury accumulation in fish from the rio Madeira and rio Negro rivers (Amazonia). *Biological Trace Element Research*, v. 115, n. 3, p. 243–254, 2007.

Engel, D.W., Brouwer, M. Crustaceans as models for metal metabolism: I. Effects of the molt cycle on blue crab metal metabolism and metallothionein. *Mar. Environ. Res.* 35, 1–5, 1993.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage Current Topics in Medicinal Chemistry 2001, 1, 529-539.

Evans, G.A. Designer science and the “omic” revolution. *Nat. Biotechnol.* 18, 127–127, 2000. doi:10. 1038/72480

Forsberg, B.R., Jardim, W.F., Zeidemann, V.K., Fadini, P.S., Carneiro, A., Padovani, C.R., Silva-Forsberg, M.C., Roulet, M., Lucotte, M., Nakazono, E.M., Martins, A.E., Chagas, E.C., The biogeochemistry of mercury in the Negro River basin _Brazilian Amazon. Proceedings of the 5th International Conference on Mercury as a Global Pollutant rio de Janeiro 1999:153.

Fournier, M.L., Gilmore, J.M., Martin-Brown, S.A., Washburn, M.P. 2007. "Multidimensional separations-based shotgun proteomics". *Chem. Rev.* 107 (8): 3654–86.

Fukino, H., Hirai, M., Hsueh, Y.M., Moriyasu, S., Yamani, Y., Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Tox. Appl. Pharmacol.* 1984, 73, 395-401.

Garcia, J. S., Magalhães, C. S., ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. 2006, *Talanta*, 69: 1-15.

Garcia, J. S., Souza, G. H. M. F., Eberlin, M. N., Arruda, M. A. Z. Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus L.*) leaves through proteomic changes. *Metallomics*, 2009 1: 107-113.

GE Healthcare, Manual do usuário, 11-0034-38, ImageMaster 2D Platinum 7.0 Edition AA, 2007.

Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C. Do seasonal changes interfere with metallothionein induction by metals in mussels *Mytilus edulis*? *Ecotox. Env. Saf.* 61 (2), 209–220, 2005.

Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters *Crassostrea gigas* from a clean and a metal-rich sites. *Biomarkers* 6 (2), 91–107, 2001.

George, S.G., Olsson, P.E. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In: Kramer, K.J.M. (Ed.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Boca

Raton, Florida, pp. 151–171, 1994.

Gómez-Ariza, J.L.; Garcia-Barrera, T.; Lorenzo, F.; Bernal, V.; Villegas, M.J.; Oliveira, V. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems, *Anal. Chim. Acta.* n. 524, p. 15-22, 2004.

Gornall, A. G.; Bardawill, C. J.; David, M. M.; *J. Biol.Chem.* 1949, 177, 751.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., eds. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd edition. Oxford: Clarendon Press; 1989.

Huang, Y.L., Cheng, S.L., Lin, T.H. Lipid peroxidation in rats administrated with mercuric chloride. *Biol. Trace Elem. Res.* 1996, 52, 193-206.

Hultberg, B., Andersson, A., Isaksson, A. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. *Tox.* 2001, 156, 93-100.

Hultberg, B., Andersson, A., Isaksson, A. Thiol and redox reactive agents exerts different effects on glutathione metabolism in HeLa cell cultures. *Clin. Chim. Acta* 1999, 283, 21-32.

Hussain, S., Atkinson, A., Thompson, S.J., Khan, A.T. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. *J. Environ. Sci. Health, B* 1999, 34, 645-660.

Isani, G., Andreani, G., Kindt, M., Carpen`e, E. Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cell Mol. Biol.* 46 (2), 311–330, 2000.

Jernelov, A., Ramel, C. Mercury in the environment, *Synopsis of the Scientific Committee on Problems of the Environment SCOPE meeting on mercury held at the Royal Academy of Sciences Stockholm 28-30 October, 1993.* *Ambio* 1994; 23:166.

Jocelyn, P.C. Metal derivatives of thiols. In *Biochemistry of the SH group*. Academic Press, London, 1972, pp 77-116.

Keyser, D.O., Alger, B.E. Arachidonic acid modulates hippocampal calcium current via protein kinase C and oxygen radicals. *Neuron* 1990, 5, 545-553.

Kmusser - Own work using Digital Chart of the World and GTOPO data., CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4747559>.

Krizkova, S., Adam, V. and Kizek, R. Study of metallothionein oxidation by using of chip CE. *ELECTROPHORESIS*, 30: 4029–4033, 2009. doi: 10.1002/elps.200900226.

Lacerda et al., *Water Air Soil Pollut*, 1991, 96: 635-642.

Lacerda, L.D., Salomons, W. Mercúrio na Amazônia: uma bomba relógio química

(Mercury in the Amazon: a chemical time bomb) Serie Tecnologia Ambiental nº 3. CETEMr CNPq. rio de Janeiro, 1992.

Langston, W.J., Bebianno, M.J., Burt, G.R. Metal handling strategies in molluscs. In: Langston, W.J., Bebianno, M.J. (Eds.), Metal Metabolism in Aquatic Environments. Chapman and Hall, London, pp. 219–283, 1998.

Latrubesse, E.M., Stevaux, J.C., Sinha, R., Tropical rivers. Geomorphology 2005, 70, 187–206.

Laurier, F.J.G., Cossa, D., Gonzalez, J.L., Breviere, E., Sarazin, G. Mercury transformations and exchanges in a high turbidity estuary: the role of organic matter and amorphous oxyhydroxides. Geochimica et Cosmochimica Acta 2003, 67:3329–3345.

Lebel, J.; Mergler, D.; Branches, F.; Lucotte, M.; Amorim, M.; Larribe, F.; Dolbec, J. Neurotoxic Effects of Low-Level Methylmercury Contamination in the Amazonian Basin. Environmental Research, 79A: 20-32, 1998.

Lima, J. L. A. (1º de junho de 2007). "Amazonas supera o Nilo como rio mais longo, dizem cientistas". Consultado em 16 de Junho de 2016.

Lima, P. M., Neves, R. C. F., Santos, F. A., Perez, C. A., Da Silva, M. A. O., Arruda, M. A. Z., Castro, G. R., Padilha P. M. Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SR XRF and FAAS after 2D PAGE separation: Preliminary results. Talanta, 2010, 82: 052-1056.

Linhares, S. & Gewandszajder, F. Biologia Hoje - Vol 3. São Paulo: ed. Ática, 1998.

Liochev, S. I. The mechanism of "Fenton-like reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. In Metal Ions in Biological Systems; Sigel, A.; Sigel, H.; Eds.; Marcel Dekker, Inc: New York, 1999, 1-39.

Lothian A, Hare DJ, Grimm R, Ryan TM, Masters CL and Roberts BR Metalloproteomics: principles, challenges, and applications to neurodegeneration. Front. Aging Neurosci. 5:35, 2013. doi: 10.3389/fnagi.2013.00035

Loureiro, V. R., Saleh, M. A. D., Moraes, P. M., Neves, R. C. F., Silva ; A. F., Padilha, C. C. F., Padilha P. M. Manganese determination by GFAAS in feces and fish feed slurries. Journal of the Brazilian Chemical Society, 18:1235-1241, 2007.

Lund, B.O., Miler, D.M., Woods, J.S. Mercury-induced H₂O₂ formation and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. Biochem. Pharmacol. 1991, 42, S181-S187.

Lund, B.O., Miler, D.M., Woods, J.S. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. Biochem. Pharmacol. 1993,

45, 2017-2024.

Malm, O., Pfeiffer, W.C., Souza, C.M.M., Reuther, R. *Ambio* 1990; 19:11-15.

Margoshes, M., Vallee, B.L. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813–4814, 1957.

Martinelli, L. A., Ferreira, J. R., Forsberg, B. R. *Victoria. Ambio*, 1988; 17:252-254.

Mason, R. P., Fitzgerald, W. F., Morel, F. M. The Biogeochemical Cycling of Elemental Mercury: Anthropogenic Influences. *Geochim. Cosmochim. Acta* 1994, 58, 3191–3198.

Mason, R. P., Sheu, G. R. Role of the Ocean in the Global Mercury Cycle. *Global Biogeochem. Cycles* 2002, 16, 40-1–40-14.

Mataveli, L. R. V., Pawel, P., Mounicou, S., Arruda, M. A. Z., Szpunar, J. A comparative study of element concentrations and binding in transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Metallomics*, 2010 2: 800.

Maurice-Bourgoin, L., Quiroga, I., Chincheros, J., Courau, P. Mercury distribution in waters and fishes of the upper rio Madeira and mercury exposure in riparian Amazonian populations. *Sci. Total Environ.* 2000 260, 73–86.

Meech, J.A., Veiga, M.M., Tromans, D. Emission and stability of mercury in the Amazon. *Can Metall Q* 1997, 36, 4:231-239.

Moraes, P. M. Fracionamento de mercúrio em amostras de tecido muscular de peixes coletados na área de influência do “AHE Jirau” – Bacia do rio Madeira utilizando estratégias metaloproteômicas. Tese de Doutorado, 2014.

Moraes, P. M., Santos, F. A., Cavecci, B., Padilha, C. C. F., Vieira, J. C. S., Roldan, P. S., Padilha, P. M. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. *Food Chemistry*, 2013 141: 2614-2617.

Moraes, P. M., Santos, F. A., Padilha, C. C. F., Vieira, J. C. S., Zara, L. F., Padilha P. M. A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. *Biological Trace Element Research*, 2012 150: 195-199.

Morris, C.A., Stürzenbaum, S., Nicolaus, B., Morgan, A.J., Harwood, J.L., Kille, P. Identification and characterization of metallothionein protein from environmental indicator species as potential biomonitors. In: Klaassen (Ed.), *Metallothionein IV*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 621–627, 1999.

Murray R.K., Bender D.A., Botham K. M., Kennelly P.J., Rodwell V.W, Weil, P.A. - *Bioquímica Ilustrada de Harper (Lange)* 29ª Edição. Editora ARTMED. 2013.

Murray, R. K., Graner, D. K., Rodwell, V. W. 2006 Harper's Illustrated Biochemistry, 27th ed., McGraw-Hill, New York.

Nagele, E., Martin, V., Horth, P., VAD, C. 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Rev. Proteomics*, 2004 1(1): 38-46.

Nath, K. A., Croatt, A. J., Likely, S., Behrens, T. W., Warden, D. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int.* 1996, 50, 1032-1043.

Neves, R. C. F., Lima, P. M., Baldassini, W. A., Santos, F. A., Moraes, P. M., Castro, G. R., Padilha, P. M. Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo. *Química Nova*, 2012 35: 493-498.

Olsson, P.-E., Kling, P., Hogstrand, C. Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. In: Langston, W.J., Bebianno, M.J. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London, pp. 321–350, 1998.

Palmiter, R.D. Metallothionein facts and frustrations. In: Klaassen, C. (Ed.), *Metallothionein IV*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 215–221, 1999.

Parisa, A., Ariya, Marc Amyot, Ashu Dastoor, Daniel Deeds, Aryeh Feinberg, Gregor Kos, Alexandre Poulain, Andrei Ryjkov, Kirill Semeniuk, M. Subir, and Kenjiro Toyota. Mercury Physicochemical and Biogeochemical Transformation in the Atmosphere and at Atmospheric Interfaces: A Review and Future Directions, *Chemical Reviews* 2015 115 (10), 3760-3802. DOI: 10.1021/cr500667e.

Pavicic, J., Skreblin, M., Krebar, I., Tusek-Zidaric, M., Stegnar, P., Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations. I. Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. *Comp. Biochem. Physiol. C* 107, 249–257, 1994.

Pearson, R. G. Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Society*, 1963, 85: 3533-3539.

Pedersen, S.N., Lundebye, A.K., Depledge, M.H. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.* 37, 183–200, 1997.

Pereira, P., Raimundo, J., Araújo, O., Canário, J., Almeida, A., Pacheco, M. Fish eyes and brain as primary targets for mercury accumulation-a new insight on environmental risk assessment. *Sci.Total Environ.*, 2014 494–495,290–298.

Pfeiffer, W. C., Lacerda, L. D., Malm, O., Souza, C. M. M., Silveira, E. G., Bastos, W.

R. Mercury in the Madeira river ecosystem, Rondonia, Brazil. *For Ecol Manage J* 1991;38: 239-245.

Porcella, D. B. In: Watras, C.J., Huckabee, J.W., editors. *Mercury pollution: integration and synthesis*. Lewis Publishers: Boca Raton, 1994:3-19.

Quig, D. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Alter. Med. Rev.* 1998, 3, 262-270.

Reuther, R. Mercury accumulation in sediments and fish from rivers affected by alluvial gold mining in the Brazilian river basin, Amazon. *Environ Monit Assess*, 1994; 32: 239-258.

Ritterhoff, J., Zauke, G.-P. Potential role of metal-binding proteins in cadmium detoxification in *Themisto libellula* (Mandt) and *Themisto abyssorum* Boeck from the Greenland Sea. *Mar. Environ. Res.* 45 (2), 179–191, 1998.

Roesijadi, G. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp. Biochem. Physiol. C* 113 (2), 117–123, 1996.

Roesijadi, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22, 81–114, 1992.

Roesijadi, G., Drum, A.S., Thomas, J.M., Fellingham, G.W. Enhanced mercury tolerance in marine mussels and relationship to low weight, mercury-binding proteins. *Mar. Pollut. Bull.* 13 (7), 250–253, 1982.

Roesijadi, G., Fowler, B.A. Purification of invertebrate metallothioneins. *Meth. Enzymol.* 205, 263–275, 1991.

Roeva, N.N., Sidorov, A.V., Yurovitskii, Y.G. Metallothioneins, proteins binding heavy metals in fish. *Biol. Bull.* 26 (6), 617–622, 1999.

Roulet, M., Lucotte, M. The natural origin of mercury in central Amazonian ecosystems. *Proceedings of the 5th International Conference on Mercury as a Global Pollutant* rio de Janeiro, 1999:162.

Santos, F. A., Lima, P. M., Neves, R. C. F., Moraes, P. M., Perez, C. A, Da Silva, M. A. O., Arruda, M. A. Z., Castro, G. R., Padilha, P. M. Metallomic study of plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: initial results. *Microchimica Acta*, 2011, 173: 43-49.

Santos, F.A., Cavecci, B., Vieira, J.C.S., Franzini, V.P., Santos, A., Leite, A.L., Buzalaf, M.A.R., Zara, L.F., Padilha, P.M. A Metalloproteomics Study on the Association of Mercury With Breast Milk in Samples From Lactating Women in the Amazon Region of Brazil. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2015.

Santos, M.G.; Jegu, M. e Merona, B. Catálogo de peixes comerciais do baixo rio Tocantins. Projeto Tucuruí. Manaus: ELETRONORTE/CNPq/INPA, 1984

Sarafian, T.A. Methylmercury-induced generation of free radicals: biological implications. *Met. Ions Biol. Syst.* 1999, 36, 415-444.

Sarafian, T.A., Bredesen, D.E., Verity, M.A. Cellular resistance to methylmercury. *Neurotox.*, 1996, 17, 27-36.

Schulz, G. E., Schirmer, R. H. Principles of protein structure, Springer Verlag, New York, 1990.

Schulze-Osthoff, K., Bakker, A. C., Vanhaesebroeck, R., Beyaert, R., Jacob, W. A., Fiers, W. J. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 5317-5322.

SCOPE (Scientific Committee on Problems of the Environment).

Scopes, R. Protein purification: Principles and practice, 3rd Ed., Springer Verlag, New York, 1994.

Siesjo, B. K., Bengtsson, F., Grampp, W., Theander, S. Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1989, 568, 234-251.

Silva Júnior, J. G. Eletroforese de proteínas – guia teórico-prático. rio de Janeiro: Interciência, p. 125, 2001.

Silva, F. A., Neves, R. C. F., Quintero-Pinto, L. G., Padilha, C. C. F., Jorge, S. O. M. A., Barros, M. M., Pezzato, L. E., Padilha P. M. 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, 2007.

Silva, F. A., Padilha, C. C. F., Castro, G. R., Roldan, P. S., Nogueira, A. R. A., Moraes, P. M., Padilha P. M. Selenium determination in tissue samples of Nile tilapia using ultrasound-assisted extraction. *Central European Journal of Chemistry*, 9:119-125, 2011.

Silva, F. A., Padilha, C. C. F., Pezzato, L. E., Barros, M. M., Padilha P. M. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. *Talanta*, 69:1025-1030, 2006.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. Principles of instrumental analysis. 5th ed. New York: Saunders College, 1998. p. 848.

Smith, N. J.H., Amazon Sweet Sea: Land, Life, and Water at the River's Mouth University of Texas Press, 2002, [S.l.] pp. 1–2. ISBN 9780292777705.

- Sterling, T.: Der Amazonas. Time-Life Bücher, 1979, 8th German Printing, p. 19.
- Stohs, S. J., Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 1993, 18,321-336.
- Stordal, M.C., Gill, G.A., Wen, L.S., Santschi, P.H. Mercury phase speciation in the surface waters of three Texas estuaries: importance of colloidal forms. *Limnology and Oceanography*, 1996, 41:52–61.
- Sussulini, A., Garcia, J. S., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Flores, E. M., Pérez, C. A., Arruda, M. A. Z. Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. *Microchimica Acta*, 2007, 158: 173-180 (b).
- Sussulini, A., Souza, G. H. M. F., Eberli, N., Arruda, M. A. Z. Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007 22: 1-6 (a).
- Syring, R.A., Hoexum Brouwer, T., Brouwer, M. Cloning and sequencing of cDNAs encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmium-inducible metallothioneins from the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 125, 325–332, 2000.
- Syversen, T.; Kaur, P. The toxicology of mercury and its compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26: 215-226, 2012.
- Szpunar, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis:metallomics, metalloproteomics and heteroatomtagged proteomics and metabolomics. *Analyst* 130, 442–465, 2005. doi: 10.1039/b418265k.
- Tan, X., Tang, C., Castoldi, A. F., Manzo, L., Costa, L. G. Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat T lymphocytes. *J. Tox. Environ. Health*, 1993, 38, 159-170.
- Tanguy, A., Moraga, D. Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metalinduced stress? *Gene* 273, 123–130, 2001.
- Tanguy, A., Mura, C., Moraga, D. Cloning of a gene coding for a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquat. Toxicol.* 55, 35–47, 2001.
- Torrente-Vilara, G. Heterogeneidade ambiental e diversidade ictiofaunística do trecho de corredeiras do rio Madeira, Rondônia, Brasil. Tese de doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 194p, 2009.

Turner, A., Millward, G. E., LeRoux, S. M. Sediment-water partitioning of inorganic mercury in estuaries. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35:4648–4654.

U.S. Geological Survey. URL: toxics.usgs.gov/no_longer_available_d.html (consultado em 29 de Outubro de 2016.)

Universal Protein Resource (UniProt) (2016) página da web: www.uniprot.org. Acessado de 18 a 30 de Junho de 2016.

Vallee, B. L., Ulmer, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annu. Rev. Biochem.* 1972, 41, 91-128.

Verity, M. A., Brown, W. J., Cheung, M. J. Organic mercurial encephalopathy: in vivo and in vitro effects of methylmercury on synaptosomal respiration. *Neurochem.* 1975, 25, 759-766.

Viarengo, A., Nott, J.A. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C* 104 (3), 355–372, 1993.

Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F; Fabbri, R. A simple spectrophotometric Method for Methallothionein Evaluations in Marine Organisms: an application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Marine Environmental Research*, Barking, v 44, p. 69-84, 1997.

Vieira, J.C.S.; Cavecci B.; Queiroz, J.V.; Braga, C.P.; Padilha, C.C.F.; Leite, A.L.; Figueiredo, W.S.; Buzalaf, M.A.R.; Zara, L.F.; Padilha, P.M. Determination of the Mercury Fraction Linked to Protein of Muscle and Liver Tissue of Tucunaré (*Cichla* spp.) from the Amazon Region of Brazil. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2015.

Wallace, W.G., Lopez, G.R. Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxication. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 147, 149–157, 1997.

Wikipedia, página do “Projeto Genoma Humano” Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Projeto_Genoma_Humano#Hist.C3.B3ria Acesso em 22 de Junho de 2015.

Woods, J. S., Ellis, M. E. Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methylmercury. Relationship to mercury-induced oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 1995, 50, 1719-1724.

Zalups, R. K., Lash, L. H. Interactions between glutathione and mercury in the kidney, liver and blood. In: *Toxicology of Metals*; Chang, L.W.; Eds.; CRC Press, Boca Raton, 1996, 145-163.