

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor ,
o texto completo desta dissertação
será disponibilizado somente a partir
de 23/02/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ELUCIDAÇÃO DE ASPECTOS FISIOLÓGICOS E FUNCIONAIS DE PROTEÍNAS
ASSOCIADAS AO MERCÚRIO EM PIRARUCU (*Arapaima gigas*)**

IZABELA DA CUNHA BATAGLIOLI

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Zootecnia.

Botucatu – SP
Agosto 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ELUCIDAÇÃO DE ASPECTOS FISIOLÓGICOS E FUNCIONAIS DE PROTEÍNAS
ASSOCIADAS AO MERCÚRIO EM PIRARUCU (*Arapaima gigas*)**

IZABELA DA CUNHA BATAGLIOLI
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha
Co-orientador: Dr. José Cavalcante Souza Vieira

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Zootecnia.

Botucatu – SP
Agosto 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte.

B328e	Bataglioli, Izabela da Cunha Elucidação de aspectos fisiológicos e funcionais de proteínas associadas ao mercúrio em pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>) / Izabela da Cunha Bataglioli. -- Botucatu, 2019 41 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu Orientador: Pedro de Magalhães Padilha Coorientador: José Cavalcante Souza Vieira 1. Proteínas. 2. Mercúrio. 3. <i>Arapaima gigas</i>. 4. Pescados. 5. Meio ambiente. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Biografia do autor

Izabela da Cunha Bataglioli – nasceu na cidade de Amparo/SP, em 3 de dezembro de 1992, filha de Vera Lucia Alves da Cunha. Ingresou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, graduando-se em dezembro de 2016. Em abril de 2017 ingressou no Mestrado pelo programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Câmpus de Botucatu, onde foi bolsista FAPESP, na Área de Química e Bioquímica, com foco em metaloproteômica, visando quantificar e caracterizar proteínas associadas ao mercúrio em pirarucu (*Arapaima gigas*).

Dedicatória

À minha mãe, por todo apoio incondicional durante essa longa caminhada sempre almejando meu crescimento pessoal e profissional, me permitindo assim seguir em frente e alcançar meus objetivos.

Agradecimento

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela oportunidade de estudar em um programa de excelência, pelo crescimento e conhecimentos adquiridos.

Ao meu orientador, Dr. Pedro de Magalhães Padilha, pela oportunidade, confiança e generosidade em compartilhar todo seu conhecimento para que eu concluísse meu trabalho.

Ao meu coorientador Dr. José Cavalcante Souza Vieira, por toda dedicação, infinita paciência, por todo ensinamento e suporte desde o primeiro dia, por todas as dúvidas tiradas (mais de uma vez!!!), sou muito grata por nossa amizade!

À todos os professores que já tive e que contribuíram para que eu chegasse até aqui e aos que me ajudaram nessa jornada, em especial a professora Simone Fernandes, minha primeira incentivadora acadêmica, sempre acreditou em meu potencial e me guiou com sábios conselhos.

Aos meus amigos queridos de laboratório, Janaína, Isabela, Grasieli e Mineiro (Wellington), que fizeram com que os dias mais difíceis se tornassem mais toleráveis, pelo carinho, companherismo e alegria de fazer das pequenas coisas cotidianas um motivo para descontrair.

A minha querida amiga Mariana, juntas desde o primeiro dia de graduação compartilhando as vitórias e derrotas desde sempre. Muito obrigada pela amizade, certamente levarei para a vida toda!

A minha psicóloga Kauana Barreiro, por me auxiliar nos momentos mais confusos, com toda sua paciência e carinho me ajudando sempre a enxergar os fatos com clareza, buscando sempre a melhor alternativa para continuar. Uma pessoa iluminada.

Não posso deixar de agradecer ao meu alicerce, Vera (mãe), Daniela (irmã), Janaína (irmã) e Ticiane (cunhada), com todas as dificuldades da vida nunca deixaram de acreditar em mim e me apoiar incondicionalmente, vibrando com minhas realizações como se fossem suas, me levantando e me ensinando a passar pelas dificuldades, a verdade é que vocês sempre foram a luz que iluminou meu caminho.

A todos que contribuíram de alguma forma para conclusão desta dissertação. Essa conquista é também de todos vocês, meu muitíssimo obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e financiado

pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo FAPESP: N° 2017/09466-3.

Elucidação de aspectos fisiológicos e funcionais de proteínas associadas ao mercúrio em pirarucu (*Arapaima gigas*)

RESUMO GERAL

Nas últimas décadas estudos científicos tem dado destaque as altas concentrações de mercúrio (Hg) encontradas em solo, sedimentos, peixes e seres humanos na Amazônia. No entanto, encontram-se ainda escassos estudos relacionados aos mecanismos de toxicidade do mercúrio em nível celular na ictiofauna e populações ribeirinhas. Neste sentido, a investigação dos níveis de expressão de proteínas poderá agir como peça chave na elucidação de biomarcadores de exposição ao mercúrio, facilitando o estudo da contaminação no ambiente e seres vivos por este metal tóxico. O mapeamento destas proteínas associadas ao mercúrio poderá indicar previamente possíveis riscos de contaminação do pescado, bem como evitar a exposição humana ao mercúrio. Estudos metaloproteômicos recentes com peixes da região amazônica, desenvolvidos por grupo de pesquisadores da UNESP de Botucatu, permitiram o fracionamento e caracterização de algumas proteínas associadas ao mercúrio com características de biomarcador. No entanto, os aspectos fisiológicos e funcionais dessas proteínas associadas ao mercúrio nos peixes amazônicos e os mecanismos de adaptação apresentados por estes animais frente à exposição ao metal ainda não foram elucidados. Assim, o presente estudo teve por objetivo utilizar uma nova estratégia de precipitação (fracionada) de proteínas para avançar no conhecimento em busca de biomarcadores proteicos/enzimáticos da contaminação de mercúrio em amostras de tecido hepático de pirarucu (*Arapaima gigas*) coletados em áreas próximas do reservatório da Usina Hidrelétrica de JIRAU - Rio Madeira utilizando-se as seguintes estratégias metaloproteômicas: fracionamento do proteoma das amostras por 2D PAGE (eletroforese bidimensional); mapeamento do mercúrio nos *spots* proteicos por GFAAS (espectrometria de absorção atômica em forno de grafite); caracterização das proteínas associadas ao mercúrio por ESI-MS-MS (espectrometria de massas) e utilização de procedimentos de bioinformática que poderão contribuir no conhecimento dessas proteínas em níveis fisiológicos e funcionais, bem como suas vias metabólicas. Os resultados obtidos mostram que dos 105 *spots* proteicos obtidos, 18 apresentaram concentrações de Hg. Nestes 18 *spots*, foram caracterizadas 10 proteínas que interagiram com mercúrio: Cyb5a protein, Cystathionine beta-synthase a, Fatty acid binding protein 1-A, liver, GTP-binding nuclear protein Ran, Triosephosphate isomerase, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1

alpha (TCF1), Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1), Hemoglobin subunit alpha, Superoxide dismutase, Perforin 1.8. Todas essas proteínas encontradas apresentam características moleculares que favorecem a ligação a metais e podem ser usadas futuramente como biomarcadores de exposição ao mercúrio.

Palavras chaves: Mercúrio em peixes amazônicos; Proteômica; Metalômica; Toxicidade; Pescado e Meio Ambiente.

Elucidation of physiological and functional aspects of mercury-associated metal-binding protein in pirarucu (*Arapaima gigas*)

ABSTRACT

Over the recent decades scientific studies have pointed to the high concentrations of mercury found in soil, sediment, fish and humans in the Amazon. However there are still few studies on the mercury toxicity mechanisms at cellular level in ichthyofauna and riverine populations. The investigation of protein expression levels may be a key element in the elucidation of mercury exposure biomarkers in living beings, which would aid the mapping of environmental contamination by this toxic metal. The early screening of these mercury-associated proteins may indicate the risk of fish contamination at a given area and possibly prevent human exposure to mercury. Recent metalloproteomic studies in fish from the Amazon region developed by a group of researchers from Botucatu UNESP have achieved the fractionation and characterization of some mercury-associated proteins with biomarker characteristics. However they have not elucidated the physiological and functional aspects of these mercury-associated proteins and these animals adaptation mechanisms towards this metal exposure.

This study aimed to increase the knowledge of possible protein biomarkers of mercury contamination in pirarucu (*Arapaima gigas*) collected in areas close to JIRAU - Rio Madeira Hydroelectric Power Plant reservoir. Liver tissue samples were analysed using a novel protein precipitation strategy (fractionation) and the following metalloproteomic strategies: 2D PAGE proteome fractionation of samples; mapping of mercury in protein spots by GFAAS (graphite furnace atomic absorption spectrometry); characterization of mercury-associated proteins by ESI-MS-MS (mass spectrometry) and bioinformatics procedures that may contribute to the knowledge of these proteins at physiological and functional levels, as well as their metabolic pathways. The results show that 18 of the 105 protein spots contained Hg (mercury), leading to the characterization of 10 mercury-interacting proteins: Cyb5a protein, Cystathionine beta-synthase A, Fatty acid binding protein 1-A, liver, GTP-binding nuclear protein Ran, Triosephosphate isomerase, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1), Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1), Hemoglobin subunit alpha, Superoxide dismutase and Perforin 1.8. All

of these proteins have molecular characteristics that favor metal binding and have the potential to be used in the future as mercury exposure biomarkers.

Keywords: Mercury in Amazonian fish; Proteomics; Metallomics; Toxicity; Fish and Environment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1: Exemplar de <i>Arapaima gigas</i> (popularmente conhecido como pirarucu)	18
Figura 2: Ciclo do mercúrio em uma bacia hidrográfica.....	20
Figura 3. Níveis de respostas do sistema biológico mediante a exposição a poluentes (xenobióticos).....	23

CAPÍTULO II

Figure 1 - Polyacrylamide gel obtained by 2D PAGE from the hepatic tissue pool of <i>Arapaima gigas</i> fish specie.....	31
Figure 2 - Graphics representing of the functions: Biological Process (A), Celular Components (B) and Molecular Functions (C), generated by Blast2Go software.....	36

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1. Concentration of total mercury in the protein <i>pellets</i> of hepatic tissue with molecular mass less than and higher of 90 kDa of <i>Arapaima gigas</i> fish specie and DOLT-4 fish liver protein (Standard certified).....	32
Table 2. Mercury concentration in protein spots with molecular mass less than 90 kDa of the hepatic tissue samples of <i>Arapaima gigas</i> fish specie.....	32
Table 3. Results of the characterization of the protein spots by ESI-MS/MS of hepatic tissue samples <i>Arapaima gigas</i> fish specie.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Hg	Mercurio
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
ESI-MS-MS	Espectrometria de massas
2D-PAGE	Eletroforese bidimensional

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

<i>Aspectos fisiológicos e funcionais de proteínas associadas ao mercúrio em pirarucu (Arapaima gigas).....</i>	15
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	16
1.REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1. Espécie estudada.....	17
1.1.1. <i>Arapaima gigas</i>	17
1.2. Problemática do Mercúrio	18
1.3. Mercúrio nos rios amazônicos	19
1.4. Proteômica e Metalômica	21
1.5. Metaloproteômica	21
1.6. Biomarcadores	22
2.OBJETIVO GERAL.....	23
REFERÊNCIAS.....	24

CAPÍTULO II

<i>Physiological and functional aspects of metal-binding protein associated with mercury in the liver tissue of pirarucu (Arapaima gigas) from the Brazilian Amazon</i>	27
ABSTRACT	28
1.Introduction	29
2. Material and methods	30
2.1. Experimental animals, sample collection and processing	30
2.2. Protein extraction and precipitation.....	30
2.3. Two-Dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE).....	30
2.4. Determination of total mercury	30
2.5. Characterization of protein SPOTS by ESI-MS/MS	31
3. Results and discussion.....	31
4. Conclusion.....	37
References.....	37

CAPÍTULO III

IMPLICAÇÕES	40
-------------------	----

ELUCIDAÇÃO DE ASPECTOS FISIOLÓGICOS E FUNCIONAIS DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO MERCÚRIO EM PIRARUCU (*Arapaima gigas*)

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Na Amazônia as altas concentrações de mercúrio encontradas em solo, sedimentos, peixes e seres humanos têm sido reportadas em diversos trabalhos nas últimas décadas. No entanto, estudos relacionados à elucidação dos mecanismos de toxicidade do mercúrio na ictiofauna e nas populações ribeirinhas em nível celular, de fundamental importância socioambiental, ainda são poucos. O desenvolvimento de biomarcadores relacionados ao mapeamento e expressões de proteínas associadas ao mercúrio poderá indicar previamente possíveis riscos de contaminação do pescado e da exposição humana. Neste contexto, a metalômica, área científica proposta recentemente, apresenta-se como proposta inédita e inovadora na identificação de biomarcadores de mercúrio associados às proteínas. Estudos metaloproteômicos recentes com peixes da região amazônica, desenvolvidos por grupo de pesquisadores da UNESP de Botucatu, permitiram o fracionamento e caracterização de algumas proteínas associadas ao mercúrio com características de biomarcador. No entanto, os aspectos fisiológicos e funcionais dessas proteínas associadas ao mercúrio nos peixes amazônicos e os mecanismos de adaptação apresentados por estes animais frente à exposição ao metal ainda não foram elucidados. Assim, a proposta de trabalho busca utilizar uma nova estratégia de precipitação (fracionada) de proteínas para avançar no conhecimento em busca de biomarcadores proteicos/enzimáticos da contaminação de mercúrio em amostras de tecido hepático de pirarucu (*Arapaima gigas*) coletados em áreas próximas do reservatório da Usina Hidrelétrica de JIRAU - Rio Madeira utilizando-se as seguintes estratégias metaloproteômicas: fracionamento do proteoma das amostras por 2D-PAGE; mapeamento do mercúrio nos spots proteicos por GFAAS; caracterização das proteínas associadas ao mercúrio por ESI-MS-MS e utilização de procedimentos de bioinformática que poderão contribuir no conhecimento dessas proteínas em níveis fisiológicos e funcionais.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. M. Status and use of bioindicators for evaluating effects of chronic stress on fish. **American Fisheries Society Symposium**, v. 8, p. 1–8, 1990.
- ARANTES, C. C.; CASTELLO, L.; STEWART, D. J.; CETRA, M.; QUEIROZ, H. L. Population density, growth and reproduction of arapaima in an Amazonian river-floodplain. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 19, n. 3, p. 455–465, 2010.
- AULA, I.; BRAUNSCHWEILER, H.; MALIN, I. The watershed flux of mercury examined with indicators in the Tucuruí reservoir in Pará, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 175, p. 97–107, 1995.
- BAYNE, B. L.; BROWN, D. A.; BURNS, K.; DIXON, D. R.; IVANOVICI, A.; LIVINGSTONE, D. R. D.; LOWE, M.; MOORE, M. N.; STEBBING, A. R. D.; WIDDOWS, J. The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals. Praeger Special Studies/Praeger Scientific. **The Quarterly Review of Biology**, v. 61, p. 136–137, 1985.
- BARBOSA, A. C.; BOISCHIO, A. A.; EAST, G. A.; FERRARI, I.; GONÇALVES, A.; SILVA, P. R. M.; CRUZ, T. M. E. Mercury contamination in the Brazilian Amazon. Environmental and occupational aspects. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 80, n. 1–4, p. 109–121, 1995.
- BARD, J.; IMBIRIBA, E. P. **Piscicultura do pirarucu, *Arapaima gigas***. Belém, EMBRAPA–CPATU, Circular Técnica, 52, p. 17, 1986.
- BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ZARA, L. F.; ROCHA, J. C.; SANTOS, A. Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico do AHE JIRAU – Bacia do Rio Madeira. **Tractebel Energia**, 2009.
- BASTOS, W. R.; LACERDA, L. D. A contaminação por Mercúrio na bacia do Rio Madeira: Uma breve revisão. **Geochimica Brasiliensis**, v. 18, p. 99–114, 2004.
- BASTOS, W. R.; Gomes, J. P. O.; Oliveira, R. C.; Almeida, R.; Elisabete, L. N.; Bernardi, J. V. E.; Lacerda, L. D.; Silveira, E. G.; Pfeiffer, W. C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 368, n. 1, p. 344–351, 2006.
- BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: Strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 10–15, 2003.
- BIDONE, E. D.; CASTILHOS, Z. C.; SANTOS, T. J. S.; SOUZA, T. M. C.; LACERDA, L. D. Fish contamination and human exposure to mercury in Tartarugalzinho River, Amapá state, Northern Amazon, Brazil. A screening approach. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 97, n. 1–2, p. 9–15, 1997.
- CASTELLO, L. A Method to Count Pirarucu *Arapaima gigas*: Fishers, Assessment, and Management. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 24, n. 2, p. 379–389, 2004.
- CÁUPER G. C. B. Ictiofauna In: Biodiversidade Amazônica – Flora Amazônica – Volume II. **Centro Cultural dos Povos da Amazônia**, 2006.
- DECAPRIO, A. P. Biomarkers: Coming of Age for Environmental Health and Risk Assessment. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 7, p. 1837–1848, 1997.
- DOLBEC, J.; MERGLER, D.; LARRIBE, F.; ROULET, M.; LEBEL, J.; LUCOTTE M. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 271, n. 1–3, p. 87–97, 2001.
- ENGSTROM, D. R. Fish respond when the mercury rises. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 42, p. 16394–16395, 2007.

- SILVA, F. A. **Selênio em tilápia do nilo utilizando eletroforese em gel e espectrometria atômica**. 2009. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. (eds.). Check list of freshwater fishes of South and Central America. **EDIPUCRS**, Porto Alegre, p. 742, 2003.
- GOLDSTEIN, B.; GIBSON, J.; HENDERSON, R.; HOBBIE, J.; LANDRIGAN, P.; MATTISON, D.; PERERA, F.; PFITZER, E.; SILBERGELD, E.; WOGAN, G. Biological markers in environmental health research. By the Committee on Biological Markers of the National Research Council. **Environmental health perspectives**, v. 74, p. 3-9, 1987. doi:10.1289/ehp.74-1474499
- GÓMEZ-ARIZA, J. L.; GARCÍA-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. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, n. 1–2, p. 15–22, 2004.
- GOULDING, M.; BARTHEM, R.; FERREIRA, E. **The Smithsonian atlas of the Amazon**. Smithsonian Books, Washington and London, p. 253, 2003.
- GOULDING, M. **The fishes and the forest: explorations in amazonian natural history**. Berkeley, Los Angeles, University of California Press, p. 280, 1980.
- GUO, T. L.; MILLER, M. A.; SHAPIRO, I. M.; SHENKERA, B. J. Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: Evidence of mitochondrial dysfunction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 250–257, 1998.
- JUNK, W. J. **General aspects of floodplain ecology with special reference to Amazonian floodplains**. In: JUNK, W. J. (ed.). **The Central Amazon Floodplain: Ecology of a pulsing system**, v. 126, p. 525, 1997.
- 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**, v. 79, n. 1, p. 20–32, 1998.
- MALM, O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, v. 77, p. 73–78, 1998.
- MANSO, M. A.; LÉONIL, J.; JAN, G.; GAGNAIRE, V. Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6–9, p. 845–855, 2005.
- MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: The concept and methodology. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 4, p. 1119–1138, 2009.
- MURRIETA, R. S. S. A MÍSTICA DO PIRARUCU: PESCA, ETHOS E PAISAGEM EM COMUNIDADES RURAIS DO BAIXO AMAZONAS. **Horizontes Antropológicos**, v. 7, n. 16, p. 113–130, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-71832001000200006>
- NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4th Edition, John Wiley & Sons, Hoboken, v. 15, p. 601, 2006
- PFEIFFER, W. C.; LACERDA, L. D.; SALOMONS, W.; MALM, O. Environmental fate of mercury from gold mining in the Brazilian Amazon. **Environmental Reviews**, v. 1, n. 1, p. 26–37, 1993. <https://doi.org/10.1139/a93-004>
- PFEIFFER, W. C.; LACERDA, L. D. Mercury inputs into the Amazon Region, Brazil. **Environmental Technology Letters**, v. 9, p. 325–330, 1988.
- QUEIROZ, M. L.; BINCOLETTI, C.; QUADROS, M. R.; CAPITANI, E. M. Presence of micronuclei in lymphocytes of mercury exposed workers. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 21, n. 1, p. 141–150, 1999.
- ROULET, M.; LUCOTTE, M.; FARELLA, N.; SERIQUE, G.; COELHO, H.; PASSOS, C. J. S.; SILVA, E. J.; ANDRADE, P. S.; MERGLER, D.; GUIMARÃES, J. R. D.; AMORIM, M. Effects of recent human colonization on the presence of mercury in

- Amazonian ecosystems. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 112, n. 3–4, p. 297–313, 1999.
- ROULET, M.; LUCOTTE, M. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferrallitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 80, n. 1–4, p. 1079–1088, 1995.
- SÁNCHEZ, J. “El paiche” aspectos de sucesso e aproveitamento natural. **Revista de Caza y Pesca (Lima, Peru)**, v. 10, p. 17–61, 1969.
- SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: IBAMA/AM, ProVárzea, p. 144, 2006.
- SANTOS, G. M.; SANTOS, A. C. M. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. **Estudos Avançados**, v. 19, n. 54, p. 165–182, 2005.
- SCHLENK, D. Necessity of Defining Biomarkers for Use in Ecological Risk Assessments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 1–12, p. 48–53, 1999.
- SHENKER, B. J.; GUO, T. L.; SHAPIRO, I. M. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: Evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. **Environmental Research**, v. 84, n. 2, p. 89–99, 2000.
- SHI, W.; CHANCE, M. R. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 1, p. 144–148, 2011.
- SIOLI, H. Hydrochemistry and Geology in the Brazilian Amazon Region. **Amazoniana**, v. 3, p. 267–277, 1968.
- 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.
- VAUCHEL, P.; SANTINI, W.; GUYOT, J.L.; MOQUET, J. S.; MARTINEZ, J. M.; ESPINOZA, J. C.; BABY, P.; FUERTES, O.; NORIEGA, L. N.; PUITA, O.; SONDAG, F.; FRAIZY, P.; ARMIJOS, E.; COCHONNEAU, G.; TIMOUK, F.; OLIVEIRA, E.; FILIZOLA, N.; MOLINA, J.; RONCHAIL, J. A reassessment of the suspended sediment load in the Madeira River basin from the Andes of Peru and Bolivia to the Amazon River in Brazil, based on 10 years of data from the HYBAM monitoring programme. **Journal of Hydrology**, v. 553, p. 35–48, 2017.
- VENTURIERI, R.; BERNARDINO, G. Pirarucu, espécie ameaçada pode ser salva através do cultivo. **Revista Panorama da Aqüicultura**, v. 9, n. 53, p. 13–21, 1999.
- VISPO, N. S. Proteômica. In: **Combinatoria Molecular**. Cuba: Elfos Scientiae, p. 367–404, 2004.
- WASSERMAN, J. C.; HACON, S.; WASSERMAN, M. A. O Ciclo do mercúrio no Ambiente Amazônico. **Rio de Janeiro: Revista Mundo e Vida**, v. 2, p. 46–53, 2001.

4. Conclusion

The metalloproteomic study of muscle tissue of *Arapaima gigas*, demonstrated that mercury-bound proteins identified in this tissue could become biomarkers of mercury exposure. Knowledge of their functions in the organism, metabolic pathways, and affinities for making connections with essential metals may help to consolidate them as biomarkers. *Arapaima gigas* presented a great diversity of proteins linked to mercury, perhaps because it is a species at the top of the food chain that can biomagnify this element in its tissues, and as it is a species widely consumed by the human population, it may cause serious public health problems. The bioinformatics analysis using the Blast2GO software showed that proteins, among their most outstanding functions, present catalytic activity, binding, cell division, localization, cellular regulation, and development processes among others. This indicates their diversity of functions in the body and their importance as future biomarkers of exposure to mercury.

Acknowledgements

The authors thank the Foundation for Research Support of the São Paulo State – FAPESP (process 2017/09466-3 and 2016/19404-2), to National Council of Scientific and Technological Development – CNPq (Processo n°: 404485/2016-2 and 304768/2018-19), and Brazilian research funding agency ANEEL/ESBR – P&D: 6631-0001/2012/Contract Jirau 004/2013.

References

- Amorim, M.J.M., Mergler, D., Bahia, M.O., Dubeau, H., Miranda, D., Lebel, J., Burbano, R.R., Lucotte, M., 2000. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. *An. Acad. Bras. Cienc.* 72, 497–507. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652000000400004>.
- Aula, I., Braunschweiler, H., Malin, I., 1995. The watershed use of mercury examined with indicators in the Tucuruí reservoir in Para Brazil. *Sci. Total Environ.* 97–107, 17597e107.
- Azevedo-Silva, C.E., Almeida, R., Carvalho, D.P., Ometto, J.P.H.B., de Camargo, P.B., Dorneles, P.R., Azeredo, A., Bastos, W.R., Malm, O., Torres, J.P.M., 2016. Mercury biomagnification and the trophic structure of the ichthyofauna from a remote lake in the Brazilian Amazon. *Environ. Res.* 151, 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.035>.
- Bastos, W.R., Gomes, J.P.O., Oliveira, R.C., Almeida, R., Nascimento, E.L., Bernardi, J.V.E., de Lacerda, L.D., da Silveira, E.G., Pfeiffer, W.C., 2006. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira river basin, Amazon, Brazil. *Sci. Total Environ.* 368, 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.09.048>.
- Bastos, W.R., Almeida, R., Zara, L.F., Rocha, J.C., Santos, A., 2009. Programa de Monitoramento Hidrobiológico-químico do AHE JIRAU – Bacia do Rio Madeira. Tractebel Energia.
- Bittarello, A.C., Vieira, J.C.S., Braga, C.P., de Paula Araújo, W.L., da Cunha Bataglioli, I., da Silva, J.M., Buzalaf, M.A.R., Fleuri, L.F., de Magalhães Padilha, P., 2019. Characterization of molecular biomarkers of mercury exposure to muscle tissue of *Plagioscion squamosissimus* and *Colossoma macropomum* from the Amazon region. *Food Chem.* 276, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.002>.
- Bourdon, S., Laggoun-Défarge, F., Disnar, J.-R., Maman, O., Guillet, B., Derenne, S., Largeau, C., 2000. Organic matter sources and early diagenetic degradation in a tropical peaty marsh (Tritirivakely, Madagascar). Implications for environmental reconstruction during the Sub-Atlantic. *Org. Geochem.* 31, 421–438. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(00\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(00)00010-3).
- 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., 2015. Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. *Talanta* 132, 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.021>.
- Braga, C.P., Boone, C.H.T., Grove, R.A., Adamcova, D., Fernandes, A.A.H., Adamec, J., de Magalhães Padilha, P., 2016. Liver proteome in diabetes type 1 rat model: insulin-dependent and -independent changes. *OMICS A J. Integr. Biol.* 20, 711–726. <https://doi.org/10.1089/omi.2016.0135>.
- Braga, C.P., Vieira, J.C.S., Grove, R.A., Boone, C.H.T., Leite, A. de L., Buzalaf, M.A.R., Fernandes, A.A.H., Adamec, J., Padilha, P. de M., 2017. A proteomic approach to identify metalloproteins and metal-binding proteins in liver from diabetic rats. *Int. J. Biol. Macromol.* 96, 817–832. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2016.12.073>.
- Burtis, Carl, Edward Ashwood, D.B., 2005. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis*, fourth ed.
- Cavalcante, J., Vieira, S., Braga, C.P., Oliveira, G., De, Leite, A.D.L., Afonso, M., Buzalaf, R., Padilha, P.D.M., 2017. Mercury Exposure: protein biomarkers of mercury exposure in jaraqui fish from the Amazon region. *Biol. Trace Elem. Res.* <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1129-5>.
- Cerbino, M.R., Vieira, J.C.S., Braga, C.P., Oliveira, G., Padilha, I.F., Silva, T.M., Zara, L.F., Silva, N.J., Padilha, P.M., 2017. Metalloproteomics approach to analyze mercury in breast milk and hair samples of lactating women in communities of the Amazon basin, Brazil. *Biological Trace Element Research* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1057-4>.
- Chmurzyńska, A., 2006. The multigene family of fatty acid-binding proteins. (FABPs): Function, structure and polymorphism 47, 39–48. <https://doi.org/10.1007/BF03194597>.
- Currie, L.A., 1999. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities: (IUPAC Recommendations 1995). *Anal. Chim. Acta* 391 (2), 105–126. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00104-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00104-X). De La Cerda.
- de Queiros, J.V., Vieira, J.C.S., Oliveira, G., Braga, C.P., Bataglioli, I.C., Silva, J.M., de Paula Araújo, W.L., Padilha, P.M., 2019. Identification of biomarkers of mercury contamination in brachyplatystoma filamentosum of the Madeira river, Brazil, using metalloproteomic strategies. *Biol. Trace Elem. Res.* 187, 291–300. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1363-5>.
- de Queiroz, J.V., Vieira, J.C.S., da Cunha Bataglioli, I., Bittarello, A.C., Braga, C.P., de Oliveira, G., do Carmo Federici Padilha, C., de Magalhães Padilha, P., 2018. Total mercury determination in muscle and liver tissue samples from Brazilian Amazon fish using slurry sampling. *Biol. Trace Elem. Res.* 184, 517–522. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1212-y>.
- Dolbec, J., Mergler, D., Larribe, F., Roulet, M., Lebel, J., Lucotte, M., 2001. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. *Sci. Total Environ.* 271, 87–97. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00835-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00835-4).
- Dorea, J.G., 2004. Cassava cyanogens and fish mercury are high but safely consumed in the diet of native Amazonians. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.12.008>.
- Dorea, J.G., Farina, M., Rocha, J.B.T., 2013. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *J. Appl. Toxicol.* 33, 700–711. <https://doi.org/10.1002/jat.2855>.
- Escobar, Herton, 2001. *Depois Do Genoma, a Corrida Pelo Proteoma* [WWW Document]. 13-02-2001.
- Gao, Y., Chen, C., Zhang, P., Chai, Z., He, W., Huang, Y., 2003. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* 485, 131–137. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00347-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00347-7).
- Garcia, J.S., Magalhães, C.S., de, Arruda, M.A.Z., 2006. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta* 69, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.041>.
- Gerhard, D.S., Wagner, L., Feingold, et al., 2004. The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the mammalian gene collection (MGC). *Genome Res.* 14, 2121–2127. <https://doi.org/10.1101/gr.2596504>.
- Kazmi, S., Krull, I.S., 2001. Proteomics and the current state of protein separations science, part two. *Pharmaceuticals* August (16), 18–27.
- de Lacerda, Luiz Drude, Malm, O., 2008. Mercury contamination in aquatic ecosystems: an analysis of the critical areas. *Estud. Avançados* 22, 173–190. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142008000200011>.
- Lacerda, L.D., Marins, R.V., 1997. Anthropogenic mercury emissions to the atmosphere in Brazil: the impact of gold mining. *J. Geochem. Explor.* 58, 223–229. [https://doi.org/10.1016/S0375-6742\(96\)00068-4](https://doi.org/10.1016/S0375-6742(96)00068-4).
- Lebel, J., Mergler, D., Branches, F., Lucotte, M., Amorim, M., Larribe, F., Dolbec, J., 1998a. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian basin. *Environ. Res.* 79, 20–32. <https://doi.org/10.1006/enrs.1998.3846>.
- Lebel, J., Mergler, D., Branches, F., Lucotte, M., Amorim, M., Larribe, F., Dolbec, J., 1998b. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian basin. *Environ. Res.* 79, 20–32. <https://doi.org/10.1006/enrs.1998.3846>.
- Liao, J., He, J., Gong, Z., 1997. An abundant zebrafish cDNA clone encodes a ras-like protein which is expressed ubiquitously. *DNA Sequence* 7, 313–317. <https://doi.org/10.3109/10425179709034051>.
- Liu, C.C., Persechini, P.M., Young, J.D., 1995. Perforin and lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Immunol. Rev.* 146, 145–175.
- Maurice-Bourgoin, L., Quiroga, L., Chincheros, J., Courau, P., 2000. Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira rivers and mercury exposure in riparian Amazonian populations. *Sci. Total Environ.* 260, 73–86. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00542-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00542-8).
- Moraes, P.M., Santos, F.A., Padilha, C.C.F., Vieira, J.C.S., Zara, L.F., De, M., Padilha, P., 2012. A preliminary and qualitative metallomics study of mercury in the muscle of fish from Amazonas, Brazil. *Biol. Trace Elem. Res.* 150, 195–199. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9502-x>.
- Moraes, P.M., Santos, F.A., Cavecci, B., Padilha, C.C.F., Vieira, J.C.S., Roldan, P.S., Padilha, P. de M., 2013. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. *Food Chem.* 141, 2614–2617. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.008>.
- Parente, V.M., 1996. *A economia da pesca em Manaus: Organização da produção e da comercialização*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., López-Barea, J., Peinado, J., 2003. Effect of food

- deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chem. Biol. Interact.* 145, 191–199. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(03)00002-4).
- Pearson, R.G., 1963. Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3533–3539. <https://doi.org/10.1021/ja00905a001>.
- Piper, P.W., 1999. Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1219–1227. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00147-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00147-1).
- Porto, M.P.R., Galdieri, L.C., Pereira, V.G., Vergani, N., Da Rocha, J.C.C., Micheletti, C., Martins, A.M., Perez, A.B.A., D'Almeida, V., 2005. Molecular analysis of homocystinuria in Brazilian patients. *Clin. Chim. Acta* 362, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.05.030>.
- Roulet, M., Lucotte, M., Guimarães, M.J.R.D., Rheault, I., 2000. Methylmercury in water, seston, and epiphyton of an Amazonian river and its floodplain. *Tapajós River, Brazil. Sci. Total Environ.* 261, 43–59. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00694-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00694-5).
- Rozovsky, S., Jogi, G., Tong, L., McDermott, A.E., 2001. Solution-state NMR investigations of triosephosphate isomerase active site loop motion: ligand release in relation to active. *J. Mol. Biol.* 310, 271–280. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4673>.
- Sacco, J.C., Trepanier, L.A., 2010. Cytochrome b5 and NADH cytochrome b5 reductase: genotype-phenotype correlations for hydroxylamine reduction. *Pharmacogenetics Genom.* 20, 26–37. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283343296>.
- 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., 2015. 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.* 69, 223–229. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0161-8>.
- Schneider, A.S., 2000. Triosephosphate isomerase deficiency: historical perspectives and molecular aspects. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 13, 119–140. <https://doi.org/10.1053/beha.2000.0061>.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M., 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1, 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>.
- Silva, F.A., Padilha, C.F.F., Pezzato, L., et al., 2006. 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. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.12.008>.
- Silva, F.A., Neves, R.C.F., Quintero-Pinto, L.G., et al., 2007. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micro-nutrient in feed used in pisciculture. *Chemosphere* 68, 1542–1547. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.03.003>.
- UniProt, 2016. Universal protein resource (UniProt) [WWW Document]. 2016. URL <http://www.uniprot.org/>, accessed 4.28.16.
- Uniprot, 2018. Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1) - *Danio rerio* (Zebrafish) [WWW Document]. URL <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6ZM17>, accessed 6.5.18.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6).
- Varela, M., Forn-Cuní, G., Dios, S., Figueras, A., Novoa, B., 2016. Proinflammatory caspase activation and an antiviral state are induced by a zebrafish perforin after possible cellular and functional diversification from a myeloid ancestor. *Journal of Innate Immunity* 8, 43–56. <https://doi.org/10.1159/000431287>.
- 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., 2015. 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.* 69, 422–430. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0160-9>.
- Vieira, J.C.S., Braga, C.P., de Oliveira, G., de Lima Leite, A., de Queiroz, J.V., Cavecci, B., Bittarello, A.C., Buzalaf, M.A.R., Zara, L.F., de Magalhães Padilha, P., 2017. Identification of protein biomarkers of mercury toxicity in fish. *Environ. Chem. Lett.* 15, 717–724. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0644-0>.
- Vieira Rocha, A., Rita Cardoso, B., Cominetti, C., Barofaldi Bueno, R., de Bortoli, M.C., Farias, L.A., Teixeira Favaro, D.I., Aranha Camargo, L.M., Franciscato Cozzolino, S.M., 2014. Selenium status and hair mercury levels in riverine children from Rondônia, Amazonia. *Nutrition* 30, 1318–1323. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.03.013>.