

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).



Figura 1: Destaque do rio Madeira na Bacia Amazônica - Por Kmusser - Own work using Digital Chart of the World and GTOPO data.

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”.

1.3. Bioacumulação e biomagnificação do mercúrio

A abundância de vida terrestre e aquática da floresta Amazônica é um facilitador para a ocorrência natural de metilação de mercúrio, levando à produção de metilmercúrio (MeHg). Como mostrado em alguns estudos (Achá et al., 2012; Correia et al., 2012), estas zonas úmidas são importantes locais de produção de MeHg que acumula nos peixes em função do seu nível trófico. Na verdade, os peixes da Bacia Amazônica têm altas concentrações totais de Hg (HgT) no músculo (Barbosa et al., 2003; Bastos et al., 2015). A concentração de HgT é distribuída de maneira diferente entre os órgãos de bagres por exemplo: fígado > músculo > gônadas > sangue (Cizdziel

et al., 2003). No entanto, o sistema nervoso central é o alvo de toxicidade crítica do Hg (Pereira et al., 2014).

Regiões costeiras e estuários são depósitos de sedimentos como o Hg, onde ocorrem deposição atmosférica externas e deposição fluvial que são depositadas e recicladas (Stordal et al., 1996; Turner et al., 2001; Laurier et al., 2003; Balcom et al., 2004). Dessa forma a metilação de Hg é dependente do regime físico do estuário e sedimento (grau de bioturbação, hidrodinâmica na interface sedimento/água), a química de sedimentos (matéria orgânica (MO), conteúdo de ferro, sulfato e concentração de sulfeto). E também o movimento de Hg presente nos sedimentos em receptores bióticos através dos processos fisiológicos, físico-químicos e ecológicos. Os fatores biogeoquímicos em sedimentos influenciam grandemente a transformação de Hg inorgânico para MeHg que, por sua vez, determina o seu potencial de bioacumulação e biomagnificação em teias alimentares.

A bioacumulação é um processo que ocorre quando um elemento químico no caso o Hg se acumula em elevadas concentrações nos organismos de níveis tróficos mais baixos. A exposição do peixe a água contaminada por metais tóxicos provoca a absorção pelo organismo, que posteriormente ao servir de alimento a seres de um nível trófico mais elevado, contaminará esse outro organismo, fazendo com que o Hg suba na cadeia alimentar. A contaminação da cadeia alimentar provoca um aumento da concentração do Hg a cada nível trófico que é o processo de biomagnificação (USGS, 2009).

A biologia vem desempenhando um papel fundamental na ciclagem geoquímica de mercúrio. Nas últimas décadas os avanços na genômica e o desenvolvimento de métodos de microbiologia têm melhorado significativamente a compreensão do ciclo biogeoquímico do mercúrio; esse campo de pesquisa continua a desenvolver-se rapidamente. Os compostos organo-mercuriais são muitas vezes ligados a bioacumulação particularmente como MeHg, mostrando que há biomagnificação nas cadeias alimentares aquáticas. O grau de metilação é dependente do fornecimento constante de mercúrio inorgânico a partir da atmosfera (Mason et al., 2002).

A deposição atmosférica é considerada como sendo uma importante fonte de mercúrio mesmo nos sistemas aquáticos mais remotos (Mason et al., 1994). No entanto, a caracterização físico-química da atmosfera e os processos biológicos aquáticos ainda não estão completamente explicados e, conseqüentemente, a extensão da incorporação de várias espécies de mercúrio produzidas por meio de transformação atmosférica na

cadeia alimentar ainda está para ser totalmente compreendida. A figura 2 ilustra processos físicos e químicos que envolvem espécies mercuriais na atmosfera e suas interfaces.

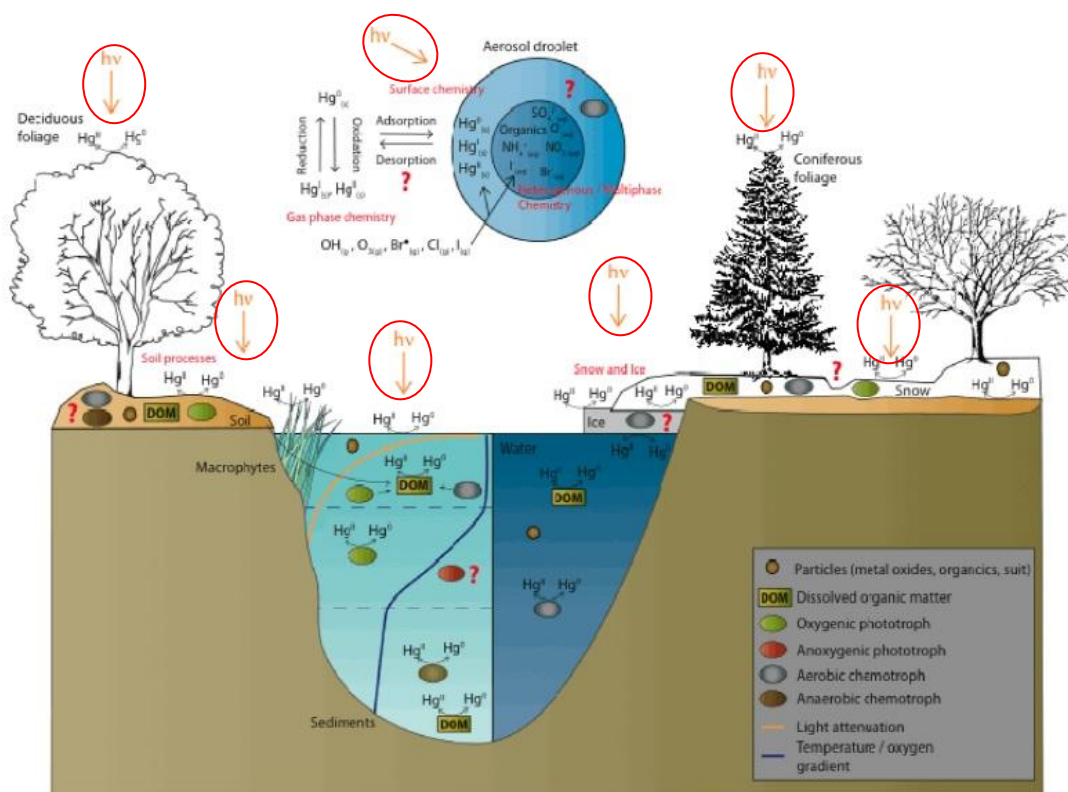


Figura 2: Esquema simplificado do ciclo do Hg na atmosfera e suas interfaces. Os pontos de interrogação indicam lacunas de onhecimento. (Adaptado de Parisa et al., 2015).

1.4. Detecção e quantificação de Mercúrio

Um dos métodos mais utilizados para a quantificação de mercúrio é a Espectrometria de Absorção Atômica de Vapor Frio (CVAAS), mas durante alguns anos foi desenvolvido um novo método, simples, rápido e sensível para a determinação das concentrações de mercúrio no tecido dos peixes utilizando a Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) (Martin et al., 2013). Esse método consiste em: mineralização ácida das amostras em banho ultra-sônico e água em temperatura ambiente, permitindo a completa mineralização das amostras de tecido. Usando nitrato de cobre como modificador químico e como modificador permanente tungstato de sódio, atinge-se a estabilização térmica do mercúrio até à temperatura de atomização de 1600° C no ensaio GFAAS. Os limites calculados de detecção (LOD) e

quantificação (LOQ) foram 0,014 e 0,047 mg kg⁻¹, respectivamente, permitindo a determinação de concentrações em partes por bilhão (ppb) de mercúrio.

1.5. Proteômica

O século XX foi marcado pela genômica e a busca por decifrar os genomas de todas as espécies, principalmente a humana, sendo o “Projeto Genoma Humano” o mais conhecido recrutando mais de 5.000 cientistas em 17 países e movimentando mais de 53 bilhões de dólares (Wikipédia, 2015). Desde a descoberta de DNA como material hereditário em 1944, passando pelo sequenciamento automatizado do DNA em 1986, o lançamento do Projeto Genoma Humano em 1990 até o ano de 2003 onde o sequenciamento do primeiro genoma humano se completou (Murray et al., 2013), pensava-se que todas as “respostas” para várias doenças e “incógnitas biológicas” seriam respondidas. No entanto, percebeu-se que os genomas são inventários de genes que podem ser expressos em uma célula sob condição específica. Apenas um subconjunto das proteínas codificadas por estes genes estará presente de fato em um dado contexto biológico (Berg, 2014).

O proteoma de um organismo (derivado das proteínas expressas pelo genoma) fornece informações mais complexas, abrangendo os tipos, funções e interações das proteínas em seus ambientes biológicos. Ele não é uma característica fixa de uma célula. Como representa a expressão funcional da informação, ele varia de acordo com o tipo de célula, estágio de desenvolvimento e condições ambientais, como a presença de hormônios; patógenos; metais tóxicos, como, o mercúrio, chumbo, cádmio.

O proteoma é maior que o genoma, porque quase todos os produtos gênicos são proteínas que podem ser quimicamente modificadas de várias formas diferentes. Além disso, essas proteínas não existem isoladamente elas geralmente interagem uma com as outras para formar complexos com propriedades funcionais específicas. Enquanto o genoma é estático, o proteoma é altamente dinâmico (Berg, 2014).

1.6. Metaloproteômica

Há mais de uma década Glen Evans citou a revolução científica das chamadas ciências pós-genômicas utilizando o neologismo em inglês usado para formar substantivos significando um estudo da totalidade de algo -“OMICS”- fazendo referência a genômica (“genomics”), proteômica (“proteomics”), metabolômica

("metabolomics") concluindo que há necessidade de "analisar os componentes de um organismo vivo em sua totalidade" (Evans, 2000). A metaloproteômica é uma área de estudo estabelecida recentemente que mescla dentro da biologia a proteômica e a metabolômica (Barnett et al., 2012).

A proteômica corresponde a uma investigação em larga escala das propriedades estruturais e funcionais das proteínas (Anderson & Anderson, 1998) enquanto a metalômica abrange a "análise exaustiva da totalidade das espécies metálicas e metalóides dentro de um tipo de célula ou tecido"; já a metabolômica corresponde a uma área que visa identificar e quantificar um conjunto de metabólitos produzidos ou modificados por um organismo (Szpunar, 2005). Em 2004, Haraguchi usou pela primeira vez o termo metalômica como "ciência integrada ao biometal" (Haraguchi, 2004). Hoje o termo metaloproteômica se torna mais adequado, pois reconhece a importante relação entre os íons metálicos e as proteínas ao invés de concentrar apenas em espécies metálicas individualmente (Lothian et al. 2013).

1.7. Metalotioneínas (MTs)

Metalotioneínas (MTs) são proteínas não-enzimáticas, de baixa massa molecular, que possuem em sua cadeia polipeptídica alto teor de resíduos de cisteínas, é estável ao calor e não possui cadeias aromáticas em sua estrutura. Os grupos tióis (-SH) dos resíduos de cisteína permitem que elas se liguem aos metais tóxicos. A primeira MT foi encontrada em córtex renal eqüino (Margoshes & Vallee, 1957) posteriormente encontradas em vertebrados como peixes (Olsson et al, 1998;. Roeva et al., 1999) e em invertebrados aquáticos (Roesijadi & Fowler, 1991), principalmente moluscos (Langston et al, 1998;. Isani et al, 2000) e crustáceos (Roesijadi, 1992;. Engel & Brouwer, 1993; Barka, 2000). Assim como acontece nas metaloproteínas em geral, as metalotioneínas não são saturadas por um único metal, mas contêm vários átomos de Cobre (Cu) e/ou Zinco (Zn), ou quando presentes Cádmio (Cd), Mercúrio (Hg) e Prata (Ag) (Amiard & Cosson, 1997). As metalotíoneínas também apresentam variações de massa molecular, o que sugere a presença de formas monoméricas e diméricas (Langston et al., 1998) ou até mesmo formas triméricas e tetraméricas (Krizkova, et al., 2009).

Devido a capacidade das metalotioneínas se coordenarem com íons metálicos da primeira série de transição, considera-se que estas proteínas desempenham um papel no

controle homeostático de metais essenciais. Dessa forma, essas metaloproteínas podem atuar como “locais” de armazenamento de metais essenciais pronta para satisfazer as demandas metabólicas enzimáticas e entre outras (Brouwer et al, 1989;. Viarengo e Nott, 1993; Roesijadi, 1996). Os metais tóxicos, tais como Cd e Hg são, no entanto, capazes de deslocar os metais essenciais (Amiard e Cosson, 1997). Além disso, devido a exposição e “tolerância” aos metais tóxicos (Roesijadi et al., 1982;. George & Olsson, 1994;. Pavicic et al., 1994; Roesijadi, 1996; Wallace & Lopez, 1997; Ritterhoff & Zauke, 1998), as MTs estão também envolvidas na desintoxicação de quantidades excessivas de metais, tanto os essenciais como os tóxicos. Os recentes progressos em biologia molecular permitirão a caracterização destas diferentes formas de MTs (Lemoine et al, 2000; Syring et al, 2000; Tanguy et al, 2001;. Tanguy & Moraga, 2001), e esclarecer qualquer papel duplo para MTs na homeostase e desintoxicação (Palmiter, 1999; Davis & Cousins, 2000; Butler & Roesijadi, 2001).

1.8. Metalotioneínas como biomarcadores

A resposta fisiológica/bioquímica, no organismo, a alta disponibilidade de metais (essenciais ou tóxicos) é a indução da produção de metalotioneínas, uma característica que é típica de um biomarcador, tal como definido por Depledge (1993): "As alterações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que podem ser medidas em amostras do fluido ou tecido corporal ou ao nível de organismos, que fornece evidência de exposição e/ou de efeitos, de um ou mais poluentes químicos (e/ou radiações)". Nos últimos anos há um consenso de que as MTs podem atuar como biomarcador, podendo ser produzida em diferentes organismos (vertebrados ou invertebrados) resultante da poluição ambiental por um metal tóxico ou por excesso de absorção de metais essenciais, como cobre e zinco. (Pedersen et al, 1997; Avramova et al, 1999; Morris et al., 1999; Hamza-Chafi et al, 1999; Cosson, 2000; Cosson e Amiard, 2000; Isani et al, 2000; Geffard et al., 2001; Geffard et al, 2005). Na Europa, as metalotioneínas são reconhecidas entre um conjunto dos principais biomarcadores e, portanto, estão incluídas em campanhas que visam melhorar a sua determinação quantitativa. MT também é parte do conjunto de biomarcadores selecionados para o monitoramento do ambiente marinho no Plano de Ação para o Mediterrâneo do Programa das Nações Unidas para o Ambiente (UNEP / RAMOGE, 1999). No entanto, a escolha das melhores espécies para o monitoramento, a escolha do órgão mais

relevante para a determinação de MT, e os limites da interpretação de quaisquer dados subsequentes ainda são temas em debate.

1.9. Procedimentos de Extração e Precipitação de Proteínas

Para o estudo do proteoma é necessário extrair as proteínas do tecido estudado. Vários são os processos que podem ser utilizados para esse fim iniciando-se com a ruptura das células do tecido, lisando a célula sem “prejudicar” as proteínas de interesse. Há processos de natureza mecânica como a maceração, sonicação, processos químicos com a utilização de tampões e detergentes contendo SDS, CHAPS; e o processo biológico utilizando uma enzima para obter a proteína de interesse (Berkman & Stenstedt, 1998). Após a extração das proteínas é preciso purificá-las (separar das outras organelas celulares que não compõem o proteoma a ser estudado), em alguns casos utiliza-se a centrifugação, ou a centrifugação diferencial onde se aplica diferentes forças G e tempos diferentes para se obter frações diferenciadas e assim separar as proteínas. Em outros casos as proteínas podem ser separadas do extrato total de acordo com sua solubilidade, tamanho, carga e afinidade de ligação; dentre as estratégias podemos citar a precipitação pelo efeito de salificação (salting out), ou a precipitação com solventes orgânicos que levam as proteínas a se agregarem “perdendo” suas moléculas de água. Outras estratégias incluem diálise; cromatografia de filtração de gel, de troca iônica, de afinidade e líquida de alta pressão (Berg, 2014).

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

A eletroforese bidimensional une duas etapas de separação proteica: a isoeletrofocalização (IEF) e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A IEF consiste na adição de tampões iônicos denominados anfólitos e a aplicação de um campo elétrico que gera um gradiente de pH no interior de uma matriz de poliacrilamida. As proteínas aplicadas migram até alcançarem seu ponto isoelétrico (pH é igual ao seu pI, tendo carga final zero). A IEF combinada com a eletroforese (SDS-PAGE) obtém separações de altíssimas resoluções. Após a amostra ser submetida a IEF a matriz de poliacrilamida é disposta horizontalmente acima de uma lâmina de SDS-poliacrilamida. As proteínas são então dispostas ao longo do topo do gel de

poliacrilamida de acordo com sua migração durante a IEF. São então submetidas à eletroforese novamente em direção perpendicular (verticalmente) para dar origem a um padrão bidimensional de pontos (spots) (Figura 3). Portanto, as proteínas foram separadas no sentido horizontal de acordo com seu ponto isoelétrico e no sentido vertical de acordo com sua massa. A eletroforese bidimensional é particularmente conveniente para separar componentes de misturas proteicas complexas (Murray et al., 2013; Berg, 2014). A Figura 3 mostra um gel de eletroforese bidimensional escaneado com seus respectivos spots.

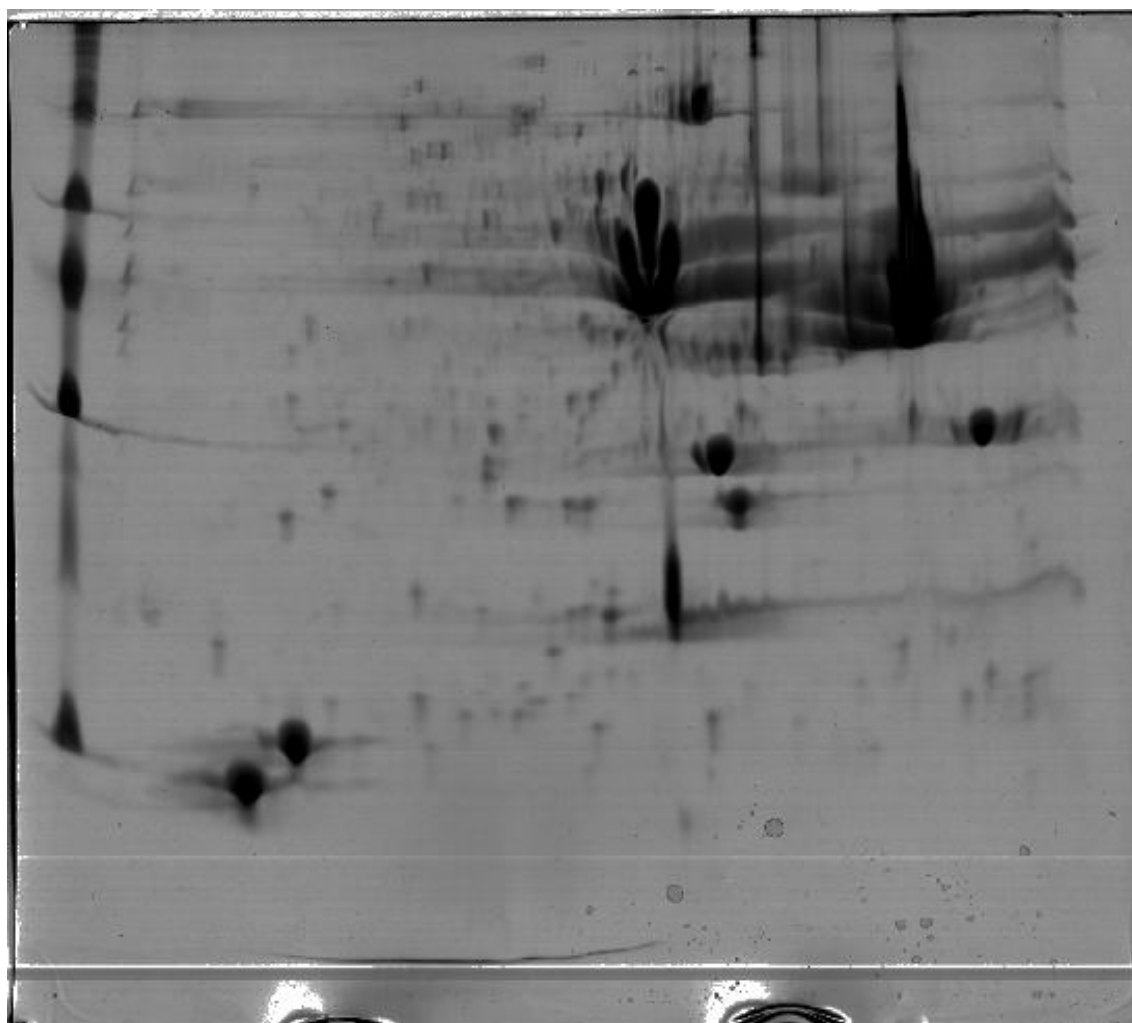


Figura. 3: Exemplo de gel de eletroforese bidimensional.

1.11. Caracterização das proteínas

1.11.1 ESI-MS/MS

Devido a superior sensibilidade, velocidade e versatilidade, a espectrometria de massa (MS) substituiu o método de Edman como principal meio de determinar a sequência de peptídeos e proteínas; para isso as proteínas devem ser fragmentadas em

pequenos peptídeos para a análise. A clivagem das proteínas pode ser realizada por reagentes químicos, como o brometo de cianogênio, ou enzimas proteolíticas como a tripsina que cliva as ligações peptídicas de proteínas após os grupos carbonila dos resíduos de lisina (K) e arginina (R), exceto quando estas ligações ocorrem com resíduos de prolina (P), ou seja, ligações K-P ou R-P (Beranova-Giorgianni, 2003; Nagele et al., 2004).

A espectrometria de massa, que discrimina moléculas apenas conforme sua massa pode detectar as alterações físicas comparativamente sutis (modificação pós-traducional: adição ou delação de frações, carboidrato, de grupos fosforila, hidroxila, ou outros) que ocorrem nas proteínas durante o ciclo vital de uma célula ou organismo. Uma amostra mantida no vácuo é vaporizada em condições nas quais pode ocorrer protonação, conferindo uma carga positiva. Um campo elétrico então impele os cátions através de um campo magnético, que os deflete conforme um ângulo reto em relação ao trajeto original do seu voo, enfocando-os para um detector. A força magnética para defletir o trajeto de cada espécie iônica em direção ao detector, medida como a corrente aplicada ao eletroímã, é registrada. Para íons de carga final idêntica, essa força é proporcional à sua massa (Murray et al., 2013; Berg, 2014). A Figura 4 ilustra os componentes básicos de um espectrômetro de Massa.

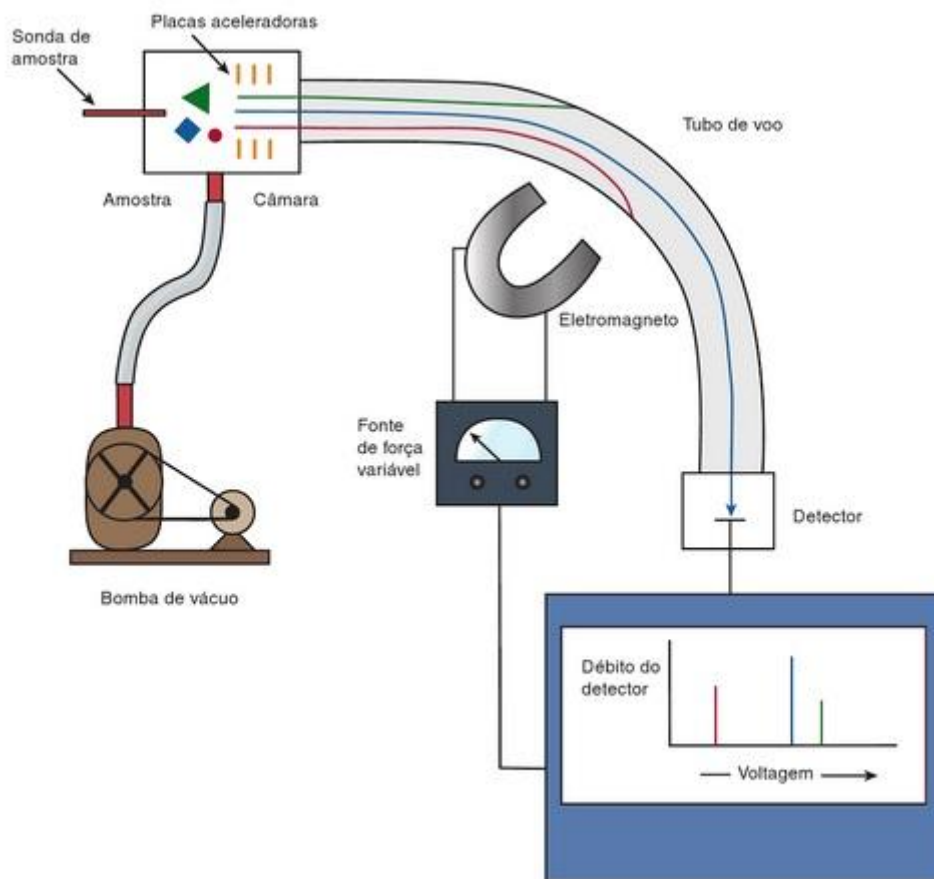


Figura 4: Componentes básicos de espectrômetro de massa simples. (Murray et al., 2013).

1.11.2. Shotgun

Outra forma de caracterizar proteínas é a técnica de shotgun, com ela se trabalha com amostras complexas que não necessitam ser fracionadas por 2D-PAGE por exemplo. As amostras passam por um processo de clivagem, através de uma enzima (tripsina), assim como ocorre anteriormente à espectrometria de massas (ESI-MS/MS). Nela ocorre o acoplamento de duas técnicas a cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrometria de massa. É uma excelente ferramenta para identificar e separar proteínas de baixa abundância, proteínas mal formadas e proteínas de membrana, presentes numa amostra (Fournier, et.al, 2007).

1.12. Algumas ferramentas de Bioinformática

Podemos dizer que a bioinformática alia a capacidade de armazenar, processamento de dados dos computadores para coleções, comparações, recuperação e análise de dados biológicos em larga escala. São inúmeros os bancos de dados que

podem ser acessados pela internet, além de vários programas que podem ser instalados ou usados on-line para se obter uma infinidade de informações de cada proteína e também de suas interações como mapas metabólicos e gráficos (Murray et al., 2006).

1.13. Estresse Oxidativo

Vários oxidantes potentes são gerados durante os processos metabólicos na maioria das células animais. Entre esses oxidantes estão o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais peroxil (ROO°) e os radicais hidroxila (OH°), que são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS). Radicais livres são átomos ou grupo de átomos que possuem um elétron não pareado. O radical OH° é uma molécula especialmente reativa e pode reagir com proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e outras moléculas, alterar sua estrutura e provocar danos aos tecidos.

O superóxido é formado nas hemácias por auto-oxidação da hemoglobina em metemoglobina; em outros tecidos, esse radical é produzido pela ação das enzimas, tais como a citocromo-P450 redutase e a xantina oxidase. Quando são estimulados por agentes externos (bactérias, metais tóxicos) os neutrófilos desenvolvem uma explosão respiratória e geram superóxido por uma reação catalisada pela NADPH oxidase. O superóxido sofre dismutação espontânea e forma H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$; contudo, a taxa dessa mesma reação é fortemente acelerada pela ação da enzima superóxido dismutase.

O peróxido de hidrogênio tem vários destinos. A enzima catalase presente em alguns tipos de células converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 . A enzima glutathione peroxidase contém selênio e também atua na glutathione reduzida (GSH) e no H_2O_2 para produzir glutathione oxidada (GSSG) e H_2O ; esta enzima também pode utilizar outros peróxidos como substratos.

Os compostos e as reações químicas capazes de gerar espécies potencialmente tóxicas do oxigênio podem ser descritos como pró-oxidantes. Por outro lado, os compostos e as reações que inativam essas espécies reativas, que as eliminam, que suprimem sua formação ou se contrapõem às suas ações são antioxidantes e incluem o NADPH, a GSH, o ácido ascórbico e a vitamina E. Na célula normal, há um equilíbrio apropriado entre pró-oxidantes e antioxidantes. Contudo, esse equilíbrio pode ser desviado no sentido pró-oxidantes quando a produção das espécies reativas do oxigênio é aumentada acentuadamente (como por exemplo após a ingestão de algumas substâncias químicas), ou quando os níveis de antioxidantes estão reduzidos (inativação

das enzimas envolvidas no descarte das espécies reativas ou por distúrbios que diminuam os níveis dos antioxidantes). Essa condição é conhecida como "estresse oxidativo" e pode causar danos graves às células, caso o estresse seja intenso ou prolongado.

Acredita-se que as ROS desempenham papel importante em diversos tipos de lesão celular (como por exemplo o contato com vários compostos químicos tóxicos) dos quais alguns podem causar morte celular. A evidência indireta em favor da participação dessas espécies reativas na produção de danos celulares é sugerida quando a administração de uma enzima, como a superóxido dismutase ou a catalase, protege contra a lesão celular na situação específica estudada (Murray et al., 2006).

1.13.1. Estresse Oxidativo e metais tóxicos

Metais tóxicos (chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio) são amplamente encontrados em nosso ambiente. Os seres vivos estão expostos a eles por meio de várias fontes, incluindo ar, água, solo e alimentos contaminados. Estudos recentes indicam que os metais de transição atuam como catalisadores em reações de oxidação de macromoléculas biológicas, por conseguinte, as toxicidades associadas a estes metais pode ser devido a danos nos tecidos; metais oxidantes, como o ferro, cobre e cromo, podem sofrer ciclos redox enquanto metais redutores, como chumbo, cádmio, mercúrio e outros, esgotam as células e suas principais enzimas antioxidantes e enzimas contendo grupos tióis. Os metais oxidantes ou metais redutores podem causar aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radical ($\text{OH}^\bullet$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O aumento de ROS pode sobrecarregar defesas antioxidantes intrínsecas das células e resultar em uma condição conhecida como "estresse oxidativo". Células sob estresse oxidativo exibem várias disfunções devido a lesões causadas por ROS nos lipídios, proteínas e DNA (Ercal et al., 2001).

Evidências crescentes indicam que mecanismos multifatoriais podem estar envolvidos na toxicidade induzida por metal, e que um dos mecanismos bem conhecidos é o de uma espécie de oxigênio reativo, induzida por metal. As reações de Fenton (Figura 5) parecem desempenhar papel importante no estresse oxidativo observado em toxicidade do metal oxidante (Liochev et al., 1999). Depleção de grandes reservas de grupos sulfidrila das células parece ser um mecanismo indireto importante para o estresse oxidativo, que é induzido por metais redox-inativas (Stohs & Bagchi,

1993). Mecanismos para esse estresse não são tão claros e tão facilmente entendidos como são os mecanismos de estresse oxidativo induzido por metais oxidantes, que tem sido estudado por muitos cientistas (Stohs & Bagchi, 1993; Li & Manning, 1955; Jocelyn, 1972; Vallee & Ulmer, 1972; Cooper, 1983; Hultberg et al., 1999; Bondy, 1996; Cuypers et al., 1999; Hultberg et al., 2001).

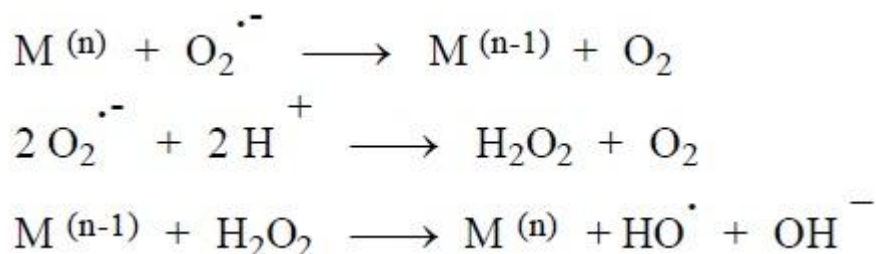


Figura 5: Reação de Fenton (Ercal et al., 2001).

Os possíveis mecanismos envolvidos no estresse oxidativo induzido por metais estão representados na Figura 6. Pb, Cd, As e Hg são incluídos porque são comumente encontrados no ambiente e têm sido sugeridos como sendo muito tóxicos e cancerígenos. Os mecanismos propostos para o estresse oxidativo induzido por metais aborda o seu papel na geração de ROS além de seu efeito sobre o sistema antioxidante de defesa, estando cientificamente provado ser um mecanismo importante com relação a toxicidade do metal.

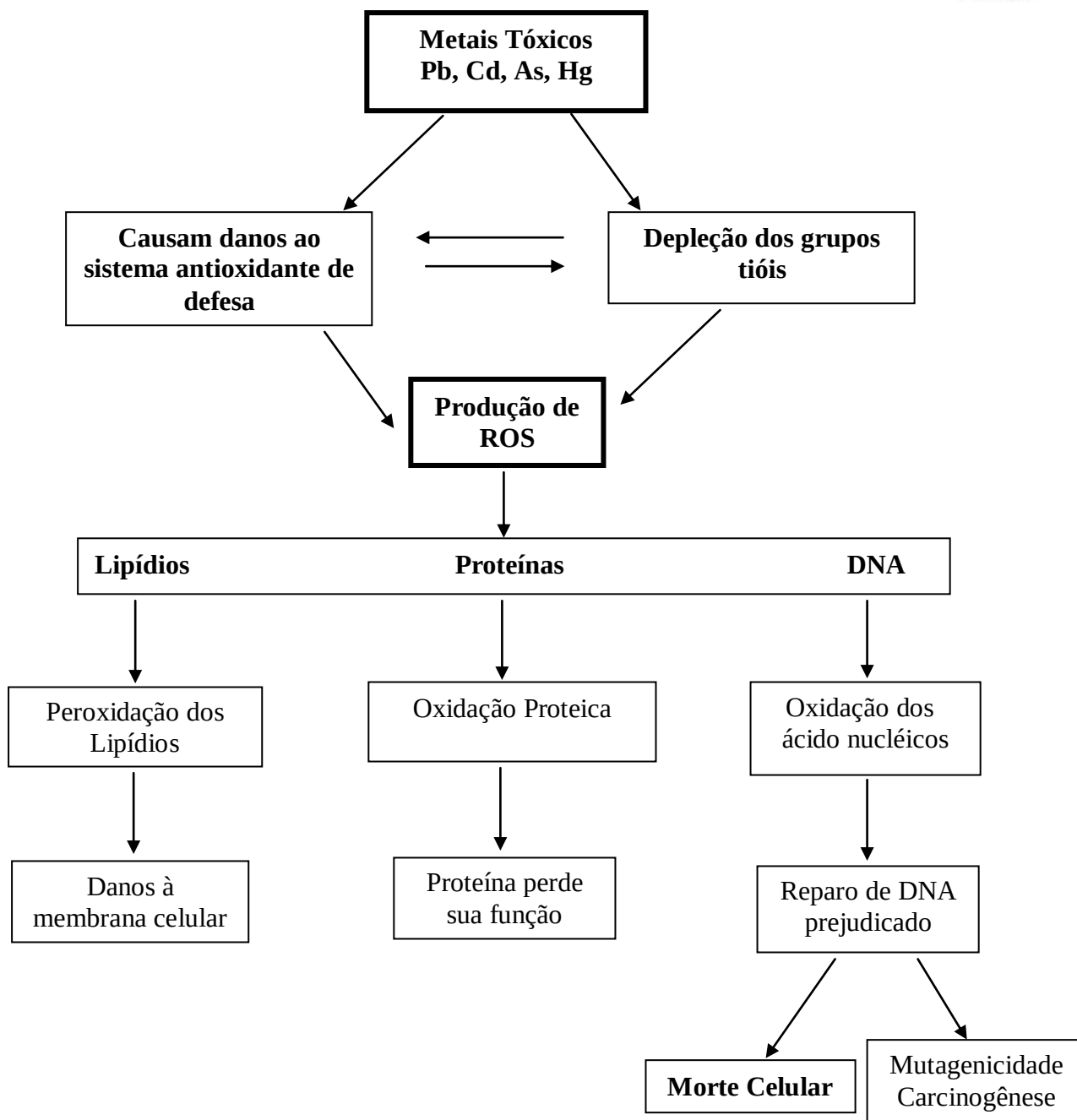


Figura 6: Possíveis mecanismos envolvidos no estresse oxidativo induzido por metais (Adaptado de Ercal et al., 2001).

1.13.2. Estresse Oxidativo e o Mercúrio

As fontes primárias de mercúrio de baixa concentração (Hg) e a exposição crônica, são amálgamas dentárias e o consumo de peixes contaminados. O Hg entra na água como um processo natural de gases de fora da crosta terrestre e, como resultado da poluição industrial. Algas e bactérias (fatores biológicos ou químicos) metilam Hg que entra nos cursos de água. O Metilmercúrio (MeHg) faz o seu caminho por meio da

cadeia alimentar para peixes e mariscos e, finalmente, em seres humanos (Crinnion, 2000).

As duas principais subespécies, altamente absorvidas de Hg são o mercúrio elementar (Hg^0) e o metilmercúrio (MeHg). As chamadas "amalgamas de prata" dentárias contêm mais de 50% Hg^0 , que é o único metal com um ponto de fusão abaixo da temperatura ambiente. O vapor de Hg^0 é altamente lipofílico e é eficientemente absorvido por meio dos pulmões e mucosa oral. Depois de introduzido no sangue, passa rapidamente as membranas celulares, incluindo a barreira sangue-cérebro e a barreira placentária. Uma vez dentro de uma célula, Hg^0 é oxidado pela Catalase (CAT) e se torna altamente reativo Hg^{2+} . Por outro lado, MeHg, derivado de peixe, é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal (mais do que 95% de absorção de alimentos). Devido à sua natureza solúvel em lípidos, MeHg também podem atravessar facilmente as barreiras placentárias (Zalups & Lash, 1996; Crinnion, 2000).

Uma vez absorvido, o Hg tem baixa taxa de excreção. Uma grande proporção de Hg absorvida acumula-se nos rins, tecido neurológico e fígado. Todas as formas de mercúrio exibem efeitos tóxicos, incluindo neurotoxicidade, nefrotoxicidade e toxicidade gastrointestinal. Dentre os vários mecanismos sugeridos para explicar os efeitos neurotóxicos de Hg, nenhum consegue explicar todos os resultados neuropatológicos. A reatividade química e algumas características biológicas do metal indicam que o estresse oxidativo pode estar envolvido na toxicidade induzida pelo Hg. Desde que o MeHg foi classificado como a forma ambiental mais comum e mais tóxica de Hg, a maioria dos estudos experimentais tem se voltado para ele. Por volta de 3% a 6% de Hg orgânico acumulado no cérebro é convertido para Hg^{2+} , a lesão oxidativa induzida por mercúrio também deve ser considerada.

1.13.3. Efeitos do Mercúrio nos grupos tióis das células

Um dos mecanismos mais importantes para o dano oxidativo induzido pelo Hg é a sua conhecida reatividade aos grupos sulfidríla. Uma vez absorvido na célula, tanto Hg^{2+} e MeHg formam ligações covalentes com glutatona (GSH) e os resíduos de cisteína das proteínas. A glutatona é o antioxidante intracelular primário e o agente de conjugação, ela se esgota e sofre disfunção na toxicidade do Hg. Um único íon de Hg pode ligar-se e causar excreção irreversível de até duas moléculas de GSH (Quig, 1998). Na verdade, a GSH serve como principal linha de defesa celular contra compostos de Hg. Quando os íons de Hg são liberados os complexos de GSH e cisteína elevam suas

atividades e os íons livres de Hg afetam o metabolismo da GSH e prejudicam as células (Hultberg et al., 2001). No entanto, a interação de compostos de Hg e GSH sugeriu a produção de danos oxidativos via acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que normalmente tinham sido eliminados por GSH (Sarafian, 1999).

1.13.4. A inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial por Mercúrio

Em organismos eucarióticos, as mitocôndrias são os principais locais para a produção de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , convertendo 1 a 5% de O_2 celular para $O_2^{\cdot-}$ durante o metabolismo normal (Boveris et al., 1972). Agentes que bloqueiam o transporte de elétrons em qualquer etapa são usados para estimular a produção $O_2^{\cdot-}$ (Schulze-Osthoff et al., 1992). O Hg aumenta a produção de H_2O_2 , ao alterar a eficiência da fosforilação oxidativa e transporte de elétrons na etapa b5 ubiquinona-citocromo (Lund et al., 1991; Chavez & Holguin, 1988; Nath et al., 1996). Este mecanismo é altamente plausível para os efeitos nefrotóxicos de Hg, que é conhecido por se acumular nos rins em níveis elevados. Por outro lado o MeHg é conhecido por ser um agente de desacoplamento, estimulando o estado IV da respiração (Verity et al., 1975). Ao acelerar as taxas de transferência de elétrons na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria ocorre um derramamento prematuro de elétrons que eleva o nível de oxigênio molecular e gera $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 .

1.13.5. Efeitos do mercúrio sobre a homeostase do cálcio

O estresse oxidativo induzido por Hg parece ser o seu efeito sobre a homeostase do cálcio. O papel do cálcio na ativação de enzimas hidrolíticas, tais como proteases, endonucleases e fosfolipases, é muito conhecido. A ativação da fosfolipase A2 apresenta resultados no aumento da produção de ácido araquidônico, o qual influencia rapidamente lipoxigenase e ciclo-oxigenase e resulta na produção de $O_2^{\cdot-}$. Portanto, a ativação de fosfolipase A2 está relacionada com a elevação das ROS (Bazan, 1989; Siesjo et al., 1989; Keyser & Alger, 1990). Além disso, o ácido araquidônico, um ácido graxo insaturado com quatro ligações duplas, é conhecido por ser um importante alvo de ROS (Halliwell & Gutteridge, 1989). Outra consequência do aumento do cálcio é a conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase, que, em seguida, catalisa reações com $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 formando produtos secundários. As formas orgânicas e inorgânicas de Hg alteram a homeostase do cálcio, mas por mecanismos diferentes (Tan et al., 1993). MeHg é responsável por aumentar o cálcio intracelular por meio da

aceleração do influxo de cálcio a partir do meio extracelular e pela mobilização de reservas de cálcio intracelular. No entanto, foi sugerido que o Hg^{2+} intracelular aumenta a concentração de cálcio apenas pelo aumento do influxo do meio extracelular. Embora uma relação direta entre o aumento dos níveis de cálcio e dano oxidativo induzido por Hg não tenha sido relatada pelos autores (Tan et al., 1993), níveis elevados de cálcio citoplasmático podem aumentar o dano oxidativo (Sarafian, 1999). Também é sugerido que Hg^{2+} desloca Fe e Cu a partir de seus sítios de ligação intracelulares; portanto, acelera a formação de ROS mediada pela reação de Fenton (Sarafian, 1999; Huang et al., 1996).

1.13.6. Peroxidação Lipídica induzida por Mercúrio

O aumento da peroxidação lipídica foi relatada em animais (Huang et al., 1996; Fukino et al., 1984; Lund et al., 1993) que foram expostos a vários compostos de Hg. Huang et al. relataram aumento das concentrações de malondialdeído (MDA) no fígado, rins, pulmões e testículos de ratos tratados com HgCl_2 (Huang et al., 1996), que se correlacionou com a gravidade da hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Além disso, a peroxidação lipídica associada ao HgCl_2 foi significativamente reduzida em um antioxidante, em pré-tratamento de dióxido de selênio. O selênio tem efeito protetor, quer diretamente por ligação de Hg ou que serve como um cofator para a GPx, facilitando assim a sua atividade eliminadora de ROS. Outro anti-oxidante bem conhecido, a vitamina E, foi demonstrada apresentando proteção contra-induzida com HgCl_2 e peroxidação lipídica hepática em alta concentração (Andersen & Andersen, 1993).

1.13.7. Efeitos do Mercúrio sobre outras enzimas antioxidantes

Além disso a indução de peroxidação lipídica (por meio de níveis de MDA) altera as concentrações de GSH na presença de HgCl_2 , também foi relatado que o Hg pode afetar outras atividades das enzimas antioxidantes de células. Ariza et al. mostraram que o Hg^{2+} induz a formação de H_2O_2 e estimula a atividade de SOD de cobre-zinco e xantina-oxidase nas células AS52. Hg^{2+} não afetou outras enzimas antioxidantes, como a CAT, GPx e GR (Ariza et al., 1998). Por outro lado, Hussain et al. (1999), relataram aumento da CAT, e a atividade da GPx, e conteúdo de GSH no fígado, rins e cérebro de ratos expostos a 1 mg/kg/dia durante 14 dias de HgCl_2 . O sistema de defesa antioxidante ativado de células foi relatado para ser um mecanismo

compensatório para o estresse oxidativo induzido HgCl_2 . Da mesma forma, Woods et al. (1995), relataram que o aumento dos níveis de GSH e as atividades de GR e GPx em ratos expostos ao MeHg na água potável foram uma resposta adaptativa a exposição Hg em células epiteliais renais. Já os neurônios não parecem ter uma capacidade de adaptação semelhante (Sarafian et al., 1996); esta foi a explicação dada para o Hg ter mais afinidade por células neurais e posteriormente por células renais (néfrons) (Quig, 1998).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificação de metalotioneínas biomarcadoras de toxicidade do mercúrio e de espécies mercuriais aplicáveis à vigilância ambiental e saúde humana nas áreas de influência direta e indireta da Usina Hidrelétrica de Jirau, de forma a contribuir com a estimativa da magnitude de exposição total ou parcial ao mercúrio.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Desenvolver e validar métodos analíticos visando o fracionamento/separação de metalotioneínas por 2D-PAGE de amostras de músculo e fígado de peixes coletados no rio Madeira - RO;

2.2.2. Identificar possíveis metalotioneínas biomarcadoras de mercúrio por meio da análise das imagens obtidas dos géis de poliacrilamida utilizando programa específico;

2.2.3. Otimizar procedimentos de extração de mercúrio dos spots proteicos para posterior mapeamento por GFAAS nas amostras de tecidos muscular e hepático dos peixes;

2.2.4. Caracterizar as proteínas presentes nos spots onde foi identificada a presença de mercúrio por ESI-MS/MS;

2.2.5. Utilizar recursos de bioinformática para avaliar as proteínas caracterizadas, construindo seus mapas metabólicos.

2.2.6. Avaliar 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);

3. Materiais e Métodos

Os seguintes equipamentos e acessórios foram utilizados para o desenvolvimento do trabalho:

- Agitador por efeito Vórtex, marca Thermolyne, modelo M-37600 (Dubuque, EUA);
- Balança analítica, marca Mettler, modelo AG245 (Bedford, EUA);
- Banho de Ultrassom UNIQUE ULTRASONIC CLEANER, modelo USC1800A;
- Cuba para eletroforese do tipo SDS PAGE, marca GE (Uppsala, Suécia);
- Espectrofotômetro UV/Visível, marca ThermoSpectronic, modelo Genesys 6 (Rochester, EUA);
- Espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU AA 6800 com sistema de atomização eletrotérmica em forno de grafite GFA-EX7 e amostrador automático ASC-6100;
- Mesa Agitadora, marca Quimis, modelo Q225M (Diadema, Brasil);
- Sistema de purificação PURELAB Ultra, marca ELGA LabWater (Saint Maurice, França);
- Sistema para eletroforese 2D-PAGE, marca GE Healthcare, modelo Ettan™ DaltSix (Uppsala, Suécia);
- Sistema para focalização isoeletrica, marca Amersham Biosciences, modelo EPS1001 (Uppsala, Suécia);
- Centrífuga refrigerada, marca BioAgency, modelo Bio-Spin-R (São Paulo, Brasil);
- Vidrarias convencionalmente utilizada em um laboratório de Química Analítica.

Além desses equipamentos e acessórios, nessa etapa do trabalho destacamos a utilização de outros equipamentos na caracterização e na digestão triptica dos spots proteicos:

- Espectrômetro de massas com fonte de ionização por ESI e analisador de massas híbrido Xevo G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado com sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA);

- Sistema Montage[®] In-Gel Digest_{zp} Milipore.

3.1. Reagentes, soluções e limpeza de frascos e vidrarias

Todos os reagentes foram de pureza analítica espectroscópica e/ou cromatográfica, sendo as soluções preparadas todas com água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida em sistema de purificação PURELAB Ultra, marca ELGA LABWATER (Saint Maurice, França). Os frascos plásticos, vidrarias e demais utensílios utilizados foram descontaminados por meio de imersão em ácido nítrico ou ácido clorídrico 10% (v/v) por 12h. Após este procedimento o material foi lavado com água ultra pura e seco à temperatura ambiente. Os seguintes reagentes/soluções foram utilizados para o desenvolvimento do trabalho:

- Ácido Acético Glacial, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, $\text{MM} = 60,05 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Clorídrico, HCl , $\text{MM} = 36,46 \text{ g mol}^{-1}$, 37 % (m/m) (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Etilenodiaminotetracético dipotássico (K_2EDTA), $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{K}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MM} = 404,46 \text{ g mol}^{-1}$ (Vetec, rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido Fosfórico 85%, H_3PO_4 , $\text{MM} = 98,00 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Ácido sulfúrico, H_2SO_4 – $\text{MM} = 98,08 \text{ g mol}^{-1}$, 96 % (m/m) (Merck)
- Acrilamida, $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$, $\text{MM} = 71,08 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Agarose grau Biologia Molecular (BioAgency, São Paulo, Brasil);
- Albumina de Soro Bovino (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Anfólitos, pH de 3 a 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Azul de Bromofenol, $\text{C}_{19}\text{H}_9\text{Br}_4\text{NaO}_5\text{S}$, $\text{MM} = 691,94 \text{ g mol}^{-1}$ (BioAgency, São Paulo, Brasil);
- Azul de Coomassie G-250, $\text{C}_{47}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$, $\text{MM} = 854,03 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Clorofórmio, HCCl_3 – $\text{MM} = 119,38 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck)

- Ditioneitol (DTT), $C_4H_{10}O_2S_2$, MM = 154,24 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), $C_{12}H_{25}NaO_4S$, MM = 288,28 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Etanol, C_2H_6O , MM = 46,07 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Fitas para focalização isoeletrica com anfólitos imobilizados de pH 3 a 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Glicerol 87%, $C_3H_8O_3$, MM = 92,09 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Iodoacetamida, C_2H_4INO , MM = 184,96 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Metanol, CH_4O , MM = 32,04 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- N, N', N, N'-tetrametilenodiamina (TEMED), $C_6H_{16}N_2$, MM = 116,20 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- N, N'-metilenobisacrilamida, $C_7H_{10}N_2O_2$, MM = 154,17 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Nitrato de cobre trihidratado, $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ – MM = 441,60 g mol⁻¹ (Merck)
- Nitrato de paládio dihidratado, $Pd(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ – MM = 266,44g mol⁻¹ (Merck)
- Óleo Mineral (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Padrão ICP de mercúrio, 1000 mg L⁻¹ (Merck)
- Padrão Protéico de Massa Molecular (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Padrão de Metalotioneínas: Metallothioneins -1 Rabbit Liver (Enzo Life Sciences);
- Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 – MM = 34,01 g mol⁻¹, 30% (m/m) (Merck)
- Persulfato de Amônio, $N_2H_8S_2O_8$, MM = 228,20 g mol⁻¹ (Mallinckrodt, Paris, França);
- Sacarose > 99,5% (Sigma, Aldrich)
- Solução Padrão de mercúrio Titrisol Merck;

- Sulfato de Amônio, $\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, $\text{MM} = 132,14 \text{ g mol}^{-1}$ (Vetec, rio de Janeiro, Brasil);
- Sulfonato de 3-[3-cloroamidopropil-dimetilamonio]-1-propano (CHAPS), $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$, $\text{MM} = 614,88 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Tiouréia, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$, $\text{MM} = 76,12 \text{ g mol}^{-1}$ (Synth, Diadema, Brasil);
- Tris-hidroximetil amino metano, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$, $\text{MM} = 121,14 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Uréia, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, $\text{MM} = 60,06 \text{ g mol}^{-1}$ (BioAgency, São Paulo, Brasil).

No processo de digestão trípica dos spots proteicos:

- Bicarbonato de amônio (Sigma);
- Acetonitrila (J. T. Baker);
- Tripsina (Promega);
- Ácido Fórmico (Sigma-Aldrich);
- Solução 50 mmol L^{-1} em Bicarbonato de amônio;
- Solução 25 mmol L^{-1} em Bicarbonato de amônio;
- Solução descorante 50% (v/v) em acetonitrila e 25 mmol L^{-1} em Bicarbonato de amônio;
- Solução de redução 20 mmol L^{-1} em ditioneitol (Affymetrix) e 50 mmol L^{-1} em Bicarbonato de amônio;
- Solução de alquilação 55 mmol L^{-1} em iodocetamida (GE Healthcare) e 50 mmol L^{-1} em Bicarbonato de amônio;
- Solução $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tripsina e 50 mmol L^{-1} em ácido acético;
- Solução bloqueadora 5% (v/v) em ácido fórmico e 50% (v/v) em acetonitrila;
- Solução eluente A 1% (v/v) em ácido fórmico e 50% (v/v) em acetonitrila;
- Solução eluente B 1% (v/v) em ácido fórmico e 60% (v/v) em metanol (J. T. Baker).

3.2. Estações de coleta

A primeira etapa do trabalho foi mapear e conhecer a região do rio Madeira e principalmente a área de influência da Usina Hidrelétrica de Jirau. Abaixo apresentamos algumas fotos do local (Figuras de 7 a 16) e o mapa (Figura 17) com as estações de coleta definidas.



Figura 7. Entrada parte técnica usina.



Figura 8. Parte jusante da barragem .



Figura 9. Parte montante da barragem .



Figura 10. Vista das casas de turbinas.



Figura 11. Parte da barragem em construção.



Figura 12. Calha para os peixes.



Figura 13. Preparativos para a coleta.



Figura 14. rio Madeira, a montante.



Figura 15. Base de apoio das coletas.



Figura 16. Barcos utilizados nas coletas.



Figura 17. Mapa do rio Madeira com as estações de coleta destacadas em Amarelo, no ponto vermelho se encontra a Usina.

3.3. Amostragem

Os peixes foram capturados utilizando rede malhadeira fixa (também conhecida como rede de espera). A estrutura das redes malhadeiras eram de forma retangular com altura variando de 2 a 4 m e 100 m de comprimento com malha de 8 cm entre nós opostos. As redes foram colocadas nos pontos de coleta (Caripunas, RAU, Mutum e Fortaleza do Abunã) e vistoriadas a cada 4 horas. Os peixes foram retirados da rede e imediatamente eutanasiados por secção da coluna vertebral, e os tecidos de interesse (Músculo e Fígado) extraídos e armazenados em gelo.

As coletas (Figuras 18 e 19) ocorreram de 2014 a 2016, considerando a sazonalidade regional, período chuvoso e período de seca do rio.

O rio Madeira tem a extensão de 1.390.000 km² e é afluente da margem direita do rio Amazonas, nasce na cordilheira dos Andes (Dórea & Barbosa, 2007), tendo o seu pulso de inundação regulado pelo degelo andino e índice pluviométrico da região registrado com média de 2.200 mm (1.400 e 2.500 mm ano⁻¹) em Porto Velho.

Em Outubro o período chuvoso se inicia e se intensifica nos meses de Novembro e Dezembro se estendendo até o mês de Maio, podendo eventualmente se prolongar até o mês de Junho. O período mais chuvoso concentra-se no primeiro trimestre do ano. Este período é conhecido como inverno amazônico, apresentando clima quente e chuvoso (ANA, 2005; Torrente-Vilara, 2009). A vazante do rio começa no final de Maio e começo do mês de Junho, já o período de baixa vazão se estende até o mês de Novembro.

Todas as coletas foram realizadas com o suporte da NATURAE consultoria ambiental que trabalha em conjunto com o projeto P&D Energia Sustentável do Brasil S.A. (6631-0001/2012 - Contrato Jirau 004/13).



Figura 18. Coleta sendo realizada.



Figura 19. Amostras identificadas e armazenadas

3.4. Espécies de estudo

As três espécies de estudo foram: Dourada (Figura 20), Pacu (Figura 21) e Curimatã (Figura 22), ao todo foram coletados: 5 exemplares de Dourada, 22 de Pacu e 25 de Curimatã.

3.4.1. *Brachyplatystoma rousseauxii* (Dourada)



Figura 20: *Brachyplatystoma rousseauxii* (Dourada) Ordem: Siluriformes; Família: Pimelodidae.

É uma espécie de grande porte, predadora, ataca vorazmente cardumes de peixes menores, principalmente peixes de escamas. A espécie tem importância comercial em diversas áreas da Amazônia e é muito apreciado para a culinária.

3.4.2. *Mylossoma* sp., *Myleus* sp. (Pacu)

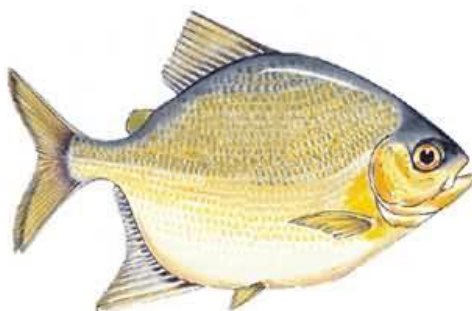


Figura 21: *Mylossoma* sp., *Myleus* sp. (Pacu) Ordem: Characiformes; Família: Characidae.

Pacu é o nome geral dado a várias espécies semelhantes da família Characidae, sendo dificilmente identificados até a espécie com precisão. É uma espécie onívora, com tendência à herbivoria; alimentando-se principalmente de frutos, sementes, algas e mais raramente, peixes, moluscos e crustáceos. Na Amazônia, são importantes na pesca de subsistência e pesca comercial local.

3.4.3. *Prochilodus nigricans* (Curimatã)

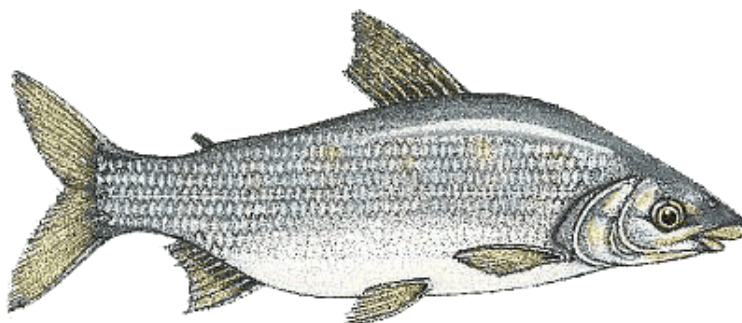


Figura 22: *Prochilodus nigricans* (Cutimatã), Ordem: Characiformes; Família: Prochilodontidae.

Alimenta-se, basicamente, de detritos orgânicos e de microorganismos associados à lama do fundo de lagos e margens de rios. (Santos et al., 1984). São capturadas em grandes cardumes, sendo espécies importantes comercialmente, principalmente para as populações de baixa renda.

3.5. Tratamento das amostras

As amostras de músculo e fígado foram identificadas, separadas e mantidas a -20° C em frascos de polipropileno. Ao chegarem ao laboratório do IBB/UNESP Botucatu foram todas trituradas (foi feito um poll do tecido de cada espécie), liofilizadas e armazenadas em tubo Falcon de 50 mL a -20° C. Para as amostras de tecido muscular apenas a trituração foi suficiente, já as amostras de tecido hepático foram trituradas e maceradas com nitrogênio líquido.

3.6. Otimização dos procedimentos de extração e precipitação de proteínas

3.6.1. Extração e precipitação 1

Este procedimento de extração e precipitação proteica foi modificado de Braga et al. (2015) e Vieira et al. (2015).

Para essa etapa do trabalho duas soluções foram utilizadas: Solução Etanol/Clorofórmio na proporção 12,5:1; e Solução Etanol/HCl na proporção 2,5:1, conservadas a temperatura de -4° C.

As amostras de tecido muscular e hepático de cada espécie (pools) passaram pelos seguintes procedimentos: aproximadamente 2 g de tecido (muscular ou hepático) foi macerado com almofariz e pistilo com 2 mL de água deionizada (1:1). Após, o macerado foi levado para a centrifugação por 30 minutos a 13.000 RPM e a 4° C; o sobrenadante foi retirado e o precipitado obtido foi descartado. O sobrenadante foi novamente centrifugado por 30 minutos a 13.000 RPM e a 4° C; o sobrenadante obtido foi retirado e o precipitado descartado. Até esse ponto consideramos ter todas as proteínas solúveis extraídas da amostra de tecido presente no sobrenadante. Para cada 1.000 µL do sobrenadante obtido foi adicionado 1.000 µL da solução de Etanol/Clorofórmio (1:1), essa mistura repousou por 30 minutos no freezer e após esse tempo foi centrifugada por 30 minutos a 13.000 RPM e a 4° C. O precipitado dessa etapa (proteínas de maior Massa Molecular, acima de 90,0 kDa) foi descartado; e o sobrenadante obtido ficou por mais 15 minutos no freezer repousando. Esse sobrenadante foi centrifugado novamente por 30 minutos a 13.000 RPM e a 4° C e novamente o precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante com as proteínas de menor massa molecular foi utilizado. Para cada 1.000 µL do sobrenadante foi adicionado 400 µL da solução Etanol/HCl (2,5:1); essa mistura repousou por mais de 12 horas (overnight) no freezer. A mistura que ficou em repouso foi centrifugada por 30 minutos a 13.000 RPM e a 4° C o sobrenadante foi descartado e o pellet obtido (proteínas de menor massa molecular, abaixo de 90,0 kDa) foi lavado quatro vezes com etanol PA (Baker) gelado (mantido no freezer), da seguinte forma: foram adicionados cerca de 1.000 µL de etanol gelado ao pellet, agitado no vórtex e centrifugado por 10 minutos a 13.000 RPM e a 4° C (processo de lavagem, para obter pellet sem interferentes).

Ao utilizar a extração 1 observou-se que as proteínas encontradas não correspondem as proteínas de interesse do atual estudo (metalotioneínas), pois através da caracterização por ESI-MS/MS, se tratam de proteínas do tipo *metal binding protein*, portanto, se utilizou de outro processo de extração e purificação de proteínas que ocorre em meio desnaturante e redutor.

3.6.2. Extração e precipitação 2

Essa extração foi utilizada, por favorecer a degradação de proteínas que não possuem características de MTs, e foi utilizado o método descrito por Viarengo et al. (1997) com algumas alterações. Aproximadamente 0,50 g do pool do tecido muscular e

0,10 g do pool de tecido hepático de cada espécie, foram macerados com almofariz e pistilo na proporção de 1:3 (m/v) em tampão de extração contendo Tris-HCl 20 mmol L⁻¹ pH 8,5, Sacarose 0,5 mol L⁻¹ e DTT 200 mmol L⁻¹. Após a homogeneização, a mistura ficou em repouso durante 5 minutos e foi centrifugada duas vezes a 13.000 RPM por 60 minutos a 4° C. Após esse procedimento o precipitado (proteínas com maiores massas moleculares, acima de 90,0 kDa) foi descartado e utilizou-se 1 mL do sobrenadante (proteínas de menor massa molecular – abaixo de 90,0 kDa, incluindo as MTs) com 1,05 mL de etanol PA(Baker) (-20° C) (v:v) e 80 µL de clorofórmio que ficou em repouso por 30 minutos. A amostra foi centrifugada novamente a 13.000 RPM por 30 minutos a 4° C e o precipitado foi desprezado por possuir as proteínas de maior massa molecular. 500 µL do sobrenadante foi tratado com 50 µL de solução HCl 37% (SIGMA) e com etanol gelado na proporção 1:3 (v/v). Nessa etapa as proteínas de baixa massa molecular presentes no sobrenadante são precipitadas. A adição de HCl implica exatamente nessa recuperação incluindo as metalotioneínas. Essas misturas de HCl, etanol e amostra (sobrenadante) ficaram em repouso por mais de 12 horas (Overnight) a -20° C e em seguida foram centrifugadas a 13.000 RPM por 30 minutos a 4° C. Após essa centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi submetido a uma lavagem para remoção do excesso de ácido. Para isso 1.500 µL de etanol, 17 µL de clorofórmio e 207 µL de tampão de extração sem DTT foi utilizado. A amostra foi novamente centrifugada a 13.000 RPM por 20 minutos a 4° C, obtendo-se o pellet final com as proteínas de menor massa molecular e MTs.

Os procedimentos de quantificação de proteínas dos pellets obtidos na extração 1 e 2 foram iguais e descritos a seguir.

3.7. Determinação de proteína total

Para a quantificação de proteína utilizou-se o método de Biureto empregando albumina de soro bovino como padrão (Gornall et al. 1949). Para isso foi construída uma curva analítica com concentrações de 5 a 50 g L⁻¹ a partir de solução padrão estoque de albumina bovina 100 g L⁻¹. Para leitura das amostras, os precipitados protéicos foram ressolubilizados em 100 µL de NaOH 0,50 mol L⁻¹. Em cubetas de plástico foram adicionados 50 µL de padrão/amostra e 2,5 mL do reagente do Biureto. A mistura padrão ou amostra com o reagente foi mantida a 32° C em banho Maria

(Marconi) durante 10 min. Após o tempo de reação, as leituras de absorbância foram medidas a 540 nm, usando espectrofotômetro UV/Visível.

Após a quantificação de proteína nos pellets da extração 1, utilizou-se outro pellet (da mesma amostra e de mesma concentração proteica) que foi ressolubilizado em 100 μL de tampão contendo ureia a 7 mol L^{-1} , tioureia a 2 mol L^{-1} , CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v) e azul de bromofenol a 0,002%; 2,8 mg de DTT esta mistura foi utilizada nas separações eletroforéticas. Cada fita de 13 cm de Isoeletrofocalização (IEF), utilizada nesse experimento, suporta uma concentração de $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ e um volume de 250 μL . Sabendo-se então a concentração da proteína no pellet foi feito o cálculo para aplicarmos na fita de IEF a concentração e o volume adequado. Segue o cálculo:

As concentrações determinadas por meio das leituras no espectrofotômetro foram chamadas de C.

C (g/L).

São necessárias 375 μg de proteínas em 250 μL de solução, portanto a concentração é de $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

$$1,5 \times 250 = C \times V$$

V – Volume que será utilizado a partir da solubilização do pellet em 100 μL da solução C+DTT.

Exemplo:

$$C = 17,60 \text{ g/L}$$

$$1,5 \times 250 = 17,60 \times V$$

$$V = 21,30 \mu\text{L}$$

Utilizar 21,30 μL da solução pellet + C + DTT e acrescentar 228,70 μL da solução C + DTT. Obtem-se volume final de 250 μL e 375 μg de proteínas pronto para aplicar nas fitas.

3.8. Determinação do Mercúrio total

3.8.1. Preparo das amostras

Para a determinação do Hg total presente nos pellets proteicos e nas amostras de tecido utilizou-se a metodologia descrita em Moraes et al. (2013). Para isso os pellets (em triplicata) foram mineralizados e transferidos para balões do tipo Kjeldahl de 25 mL (balões de digestão). Também foram transferidas massas de aproximadamente 250

mg de tecido muscular e de tecido hepático em triplicata para balões de digestão. Para cada balão de digestão contendo tanto os pellets como os tecidos, foram transferidas alíquotas de 3 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de balões de digestão foi colocado em banho de ultrassom da UNIQUE à temperatura de 40° C e 135 Watts de potência, até completa mineralização das amostras (extrato transparente). Em seguida os extratos ácidos obtidos foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL completando-se os volumes com água ultrapura e as determinações foram feitas por Espectrometria de Absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). Para validação do método de mineralização foi utilizada como amostra o padrão certificado para proteína de músculo de peixe DORM 4 – NRC contendo $410 \pm 3 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio total.

3.8.2. Determinação do mercúrio por GFAAS

Para determinação de mercúrio foi utilizado espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema *self-reverse* (SR), tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco de mercúrio SHIMADZU, operada com corrente mínima de 12 mA e corrente máxima de 400 mA (corrente utilizada na correção de fundo – BG). O comprimento de onda utilizado foi de 253,7 nm e resolução espectral de 0,5 nm. Argônio foi utilizado como gás inerte, mantendo-se um fluxo constante de 1 L min^{-1} durante todo o programa de aquecimento, exceto na etapa de atomização, na qual o fluxo de gás foi interrompido. Os sinais de absorbância foram medidos em área de pico (Silva et al., 2006; Loureiro et al., 2007; Silva et al., 2007).

3.9. Otimização de métodos eletroforéticos

Antes do início das separações eletroforéticas, volumes de 250 μL dos extratos protéicos do tecido muscular e do tecido hepático de cada espécie (obtidos pela ressolubilização da massa dos pellets da precipitação fracionada) foram aplicados em fitas para focalização isoeletrica de 13 cm, que continham o gel pré-preparado com os anfólitos imobilizados de pH 3 a 10. Essas fitas foram colocadas em um aparato, sobre o qual permaneceram por 12 horas, a temperatura ambiente, para serem reidratadas com o extrato protéico. Além do extrato protéico foram adicionados cerca de 900 μL de óleo

mineral sobre essas fitas. Após este período, a fita rehidratada foi levada ao sistema de IEF para corrida em primeira dimensão da eletroforese bi-dimensional, utilizando a seguinte programação de tensão: Etapa 1 = 500 V, com acúmulo de 500 Vh; Etapa 2 = 1.000 V, com acúmulo de 800 Vh; Etapa 3 = 10.000 V, com acúmulo de 11.300 Vh; Etapa 4 = 10.000 V, com acúmulo de 3.000 Vh; com um acúmulo final total de 15.600 Vh.

O programa de separação em primeira dimensão durou em média 4,5 h. Após o término da focalização isoeletrica, a fita com as proteínas separadas em função do pI, foi equilibrada em duas etapas. Na primeira etapa, foram utilizados 10 mL de solução contendo ureia 6 mol L⁻¹, SDS 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 1% (m/v). Esta etapa denominada redução tem a finalidade de manter as proteínas nas formas reduzidas. Na segunda etapa foi utilizada uma solução de composição similar, porém, substituindo-se o DTT por iodoacetamida 2,5% (m/v). Esta etapa é denominada alquilação e sua finalidade é alquilar os grupos tióis das proteínas, prevenindo que elas sejam reoxidadas durante o processo eletroforético. Cada etapa durou 15 min e foram realizadas sob baixa agitação em mesa agitadora (Gòmez-Ariza, et al., 2004.).

Após a etapa de equilíbrio das fitas foi realizada a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS-PAGE). A fita de proteínas foi aplicada em gel de poliacrilamida com diferentes concentrações: 15% e 18% previamente preparados em placa de vidro com dimensões 180x160x1,5 mm. Os géis de poliacrilamida foram preparados a partir das seguintes soluções: Acrilamida, N,N'- metilenobisacrilamida, Tris-hidroximetil amino metano, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), N,N',N,N'- tetrametilenodiamina (TEMED), Ácido Clorídrico e Persulfato de Amônio. Foi colocado sobre o gel de poliacrilamida, ao lado da fita, um pedaço de papel de filtro, ao qual foi aplicado 8 µL de padrão de massa molecular contendo as proteínas β-fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa). A fita e o papel de filtro foram vedados com solução quente de agarose 0,5% (m/v) em tampão adequado, de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida. Em seguida, a corrida eletroforética em segunda dimensão foi efetuada (testando várias programações de acordo com as concentrações em cada gel de poliacrilamida) em sistema para eletroforese 2D-PAGE, em duas etapas, utilizando a seguinte programação:

Para o gel de concentração de 18% foi testada a Tensão (V) = 100; Corrente elétrica (mA) = 59,2 inicial e 12,9 final; Potência (W) = 10 inicial e 6 final; Tempo (h) = 18h.

Para o gel de concentração de 15% foram testadas as seguintes programações: Programação A Etapa 1: Tensão (V) = 100; Corrente elétrica (mA) = 96 inicial e 77 final; Potência (W) = 10 inicial e 8 final; Tempo (h) = 0,5h e Etapa 2: Tensão (V) = 250; Corrente elétrica (mA) = 180 inicial e 25 final; Potência (W) = 26 inicial e 7 final; Tempo (h) = 3,5h. Programação B Etapa 1: Tensão (V) = 100; Corrente elétrica (mA) = 96 inicial e 77 final; Potência (W) = 10 inicial e 8 final; Tempo (h) = 0,5h e Etapa 2: Tensão (V) = 160; Corrente elétrica (mA) = 124 inicial e 49 final; Potência (W) = 20 inicial e 8 final; Tempo (h) = 6 h.

Após o período de corrida as proteínas foram fixadas durante 1 h, empregando-se solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) e reveladas empregando-se o corante Coomassie coloidal, que consiste em uma solução de sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), azul de coomassie G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v). O corante ficou em contato com o gel durante 72 h e depois foi removido por sucessivas lavagens com água ultrapura. Os géis obtidos, feitos em triplicatas, foram escaneados em Scanner GE Healthcare e tratados no programa *Image Master Platinum 7.0*.

3.10. Preparo dos spots para quantificação de mercúrio por GFAAS

Os spots proteicos das regiões de estudo foram selecionados e mineralizadas conforme Moraes et al. (2013) da seguinte forma: 9 spots proteicos (obtidos das réplicas de três corridas – em cada corrida obteve-se 3 géis), foram transferidos para frascos de digestão de 5 mL. Para cada frasco de digestão foram transferidas alíquotas de 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de frascos foi colocado em banho de ultrassom da UNIQUE à temperatura de 40° C e 135 Watts de potência, até completa mineralização das amostras (extrato transparente). Em seguida, os extratos ácidos obtidos foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL completando-se os volumes com água ultrapura. Para validação do método de mineralização foi utilizado padrão certificado *Fish Protein DORM 4* – NRC contendo $410 \pm 55 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio total.

3.11. Preparo dos spots para identificação por ESI-MS/MS

Os spots proteicos onde houve a detecção de mercúrio foram extraídos dos géis (obtidos das réplicas de três corridas) utilizando-se bisturi, sendo cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm³. Os seguimentos foram transferidos para microtubos de 2,0 mL contendo ácido acético 1% e mantidos em geladeira até os passos subsequentes, descritos a seguir:

I. Remoção do corante

- Com uma pipeta de 200 µL, o ácido acético foi retirado e os segmentos dos spots foram lavados com a solução descorante adicionando um volume suficiente para cobrir o gel, mantendo-se em repouso por 10 min.
- A solução descorante foi removida em seguida e o processo de lavagem repetido até a retirada total do corante comassie blue e que o gel ficasse transparente. Após as lavagens foi adicionado acetonitrila, e após agitação a mistura foi mantida em repouso por 10 min (decorrido esse tempo o gel deve ficar branco).
- A acetonitrila foi removida e o procedimento descorante foi repetido por mais uma vez. Após remoção da acetonitrila o tubo permaneceu aberto por 30 min para que o resíduo remanescente desse solvente fosse evaporado à temperatura ambiente.
- Os fragmentos desidratados e sem coloração foram armazenados em freezer até o próximo passo.

II. Redução e alquilação

- Os fragmentos de gel foram reidratados em aproximadamente 200 µL de solução de redução e incubados a 56°C por 40 min.
- Com auxílio de uma pipeta, a solução de redução foi removida e adicionou-se aproximadamente 200 µL de solução de alquilação. Em seguida, a mistura foi incubada na ausência de luz por 30 min à temperatura ambiente.
- A solução de alquilação foi removida e os fragmentos lavados com bicarbonato de amônio 25 mmol L⁻¹ por 3 min.
- Após esse tempo a solução de bicarbonato de amônio foi removida e os fragmentos foram desidratados duas vezes com acetonitrila por 10 min. A acetonitrila foi descartada e o resíduo remanescente nos fragmentos foi evaporado à temperatura ambiente.

- Os fragmentos desidratados foram armazenados em freezer até o próximo passo.

III. Digestão triptica das proteínas

- Foi preparado um banho-maria a 37°C aproximadamente duas horas antes de se iniciar a digestão para que a temperatura ficasse estável.
- Foram preparados microtubos de 1,5 mL com a marcação das amostras que seriam digeridas para utilizar no dia posterior.
- Foi preparada a solução de tripsina para a digestão das proteínas a partir da alíquota de 10 µL de tripsina com 90 µL de solução 25 mmol L⁻¹ de bicarbonato de amônio gelada, deste modo, obteve-se a concentração final da enzima em solução de 10 ng µL⁻¹.
- Transferiu-se para os microtubos de 2 mL que continham os fragmentos de géis desidratados, 15 µL de solução digestora contendo 150 ng de tripsina.
- Após 15 min foi adicionado ao microtubo solução de bicarbonato de amônio a 25 mmol L⁻¹ até completa cobertura dos fragmentos de gel.
- Os fragmentos foram então incubados a 37°C em banho-maria por 14 h.

IV. Eluição dos peptídeos

- Os tubos com as amostras foram retirados do banho-maria e centrifugados (foi dado somente um *spin*) para que as gotas retidas na tampa descessem;
- Adicionou-se em seguida 15 µL de solução bloqueadora;
- Logo em seguida, foi adicionado aproximadamente 100 µL de Eluente A e transferiu-se a mistura para banho ultrassom por 15 min a 40°C. Após esse tempo, retiraram-se os tubos do ultrassom, foi dado um *spin* em centrífuga e com uma pipeta acoplada a uma ponteira de microcapilaridade transferiram-se os sobrenadantes para os microtubos de 1,5 mL preparados no dia anterior;
- Este procedimento foi repetido mais uma vez e em seguida os sobrenadantes foram transferidos para os microtubos de 1,5 mL;
- Foi adicionado então aproximadamente 100 µL de Eluente B e transferiram-se os microtubos para banho ultrassom por 15 min a 40°C. Decorrido esse tempo, os microtubos foram removidos do ultrassom, foi dado um *spin* em centrífuga e os sobrenadantes foram transferidos para os microtubos de 1,5 mL;
- Foi adicionado em seguida aproximadamente 100 µL de acetonitrila e transferiram-se os microtubos para banho ultrassom por 15 min a 40°C. Após

esse tempo, os microtubos foram retirados do ultrassom, foi dado um *spin* em centrífuga e os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos de 1,5 mL;

- Finalmente, os microtubos de 1,5 mL com a solução contendo os peptídeos extraídos foram submetidos à secagem em um concentrador a vácuo sob temperatura a 30°C até aproximadamente 1 µL. Após esse processo, as alíquotas das soluções contendo os peptídeos foram armazenadas a -4° C até a próxima etapa de limpeza da amostra para a caracterização.

V. Limpeza da amostra para caracterização

- As amostras de peptídeos foram ressuspensas em 10 µL de solução 0,1% TFA preparada com água ultra pura, e agitadas no vórtex;
- Ponteiras *Zip Tips* foram acopladas a uma micropipeta de 10 µL e passou por 3 etapas de preparo: 10 µL da solução TFA preparada com 100% de ACN e descartada; após aspirou-se 10 µL da solução 0,1% TFA preparada com 50% de ACN e descartada; posteriormente foi aspirado 10 µL de solução 0,1% TFA preparada com água ultra pura e descartada.
- Após o preparo da ponteira *Zip Tip* foi realizada a ligação da amostra à coluna aspirando e dispensando a amostra de peptídeos que foi dissolvida em 0,1% TFA em água, repetindo o *up-down* 10 vezes e deixando o volume excedente no microtubo.
- Após essa etapa ocorreu a lavagem dos peptídeos onde 10 µL da solução 0,1% TFA preparada em 5% solução de Metanol, essa etapa foi repetida 3 vezes.
- A última etapa é onde ocorre a eluição das amostras, onde 10 µL da solução de 0,1% TFA em (50%) ACN é dispensado no *vaiun com capilar* de 0,2 mL, fazendo movimentos *up-down* por 10 vezes para garantir a completa eluição dos peptídeos. Com isso, as amostras estão prontas para serem caracterizadas por ESI-MS/MS.

A análise dos peptídeos tripticos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). Para tanto, o sistema UPLC nanoACQUITY foi equipado com uma coluna do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 75 mm x 150 mm; 1,8 µm, Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel B (100% ACN + 0,1

% ácido fórmico). Os peptídeos foram separados através de um gradiente linear de 7-85 % de fase móvel B durante 20 min com fluxo de 0,35 $\mu\text{L}/\text{min}$ e a temperatura da coluna mantida a 45°C. O MS foi operado em modo íon positivo, com resolução de pelo menos 20000 FWHM (full-width halfmaximum) e em modo de aquisição independente de dados (LC-MSE), com o tempo de aquisição de dados de 20 min por spot. Os dados foram coletados a uma energia de colisão constante de 15 eV no modo MS de baixa energia e 45 eV modo de alta energia. A correção das massas foi realizada utilizando o calibrante externo (Glu-1-fibrinopeptide B, 1 pmol/mL) infundido através do lock mass a um fluxo de 300 nL/min e amostrado a cada 30 s.

Os espectros de massa obtidos do nanoUPLC-MSE foram processados utilizando o software Protein Lynx Global Server (PLGS) versão 3.0. A identificação das proteínas foi obtida por meio do algoritmo de contagem de íons incorporado ao software. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados da espécie (*Danio rerio*) baixado do catálogo do UniProt (Universal Protein Resource). Para a busca foram utilizados os seguintes parâmetros: Carbamidomethyl-C (modificação fixa), oxidation M e phosphoryl STY (modificações variáveis); precisão de massa igual a 10 ppm, com tolerância do fragmento igual a 0,1 Da contra a massa teórica de peptídeos, com pelo menos um peptídeo por proteína, dois íons fragmentos por peptídeo e cinco íons fragmentos por proteína; clivagens perdidas: 1; False discovery rate: 4.

3.12. Preparo da amostra para identificação por Shotgun

Pesou-se 100 mg de amostra de tecido muscular e hepático de cada espécie, separadamente, em cada amostra foi adicionado tampão contendo 8 M de Ureia, 25mM de Tris em pH 8,0, para a homogenização da amostra, esse homogeneizado foi transferido para tubos de eppendorf de 1,5 mL e centrifugados à 14.000 rpm por 30 minutos, tendo o seu sobrenadante recolhido e o precipitado descartado. Após essa etapa o volume referente à 100 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ foi transferido para tubos da Axygen, adicionou-se 25 μL de RapiGest realizando movimentos up/down e finalizando em vortex. Posteriormente aqueceu-se a mistura à 37,5 °C por 40 minutos, adicionou-se 2,5 μL da solução de redução (1,5 mg para 100 μL de 50 mM Ambic) e essa mistura foi aquecida por 30 minutos. 2,5 μL de solução de alquilação (5,5 mg para 100 μL de 50 mM Ambic) foi adicionada e manteve-se no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos. Após os 30 minutos no escuro 10 μL de tripsina concentrada foi adicionada e deixada

overnight à 37,5 °C. As amostras receberam então 10 µL de TFA 5% e ficaram sob aquecimento por uma hora e meia, após este tempo foi centrifugada à 14.000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi recolhido e levado ao concentrador para posteriormente ser analisado por shotgun.

3.13. Ferramentas de Bioinformática utilizadas

As ferramentas utilizadas neste trabalho foram o banco de dados *uniprot kb* e o programa *Blast2go*. A partir da caracterização da proteína é obtido seu código para acessar o banco de dados do *uniprot Kb*, sendo possível obter a sequência FASTA da proteína, que é inserida no *Blast2go* e a partir dessa sequência aliada a todas as outras encontradas é possível obter mapas metabólicos, gráficos com funções de cada proteína, e vários outros dados.

3.14. Procedimento de extração proteica e quantificação do grau de Estresse Oxidativo

O grau de estresse oxidativo foi analisado por meio da quantificação do marcador de lipoperoxidação (hidroperóxido) (HP) e pela atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) nos tecidos muscular e hepático de cada espécie de estudo.

Aproximadamente 200 mg de tecido muscular e hepático de cada espécie foram descongeladas e homogeneizadas em Potter Elvehjem, com pistilo de teflon, com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 RPM por 15 min, em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação de proteínas totais e análise da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e dosagem de hidroperóxido de lipídeo (HP).

As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (com software Swift II, England) e em leitor de microplaca (µQuant-MQX 200 com Kcjunior software, Bio-Tec Instruments, USA). Todos os reagentes foram de procedência da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

A atividade da enzima glutathione peroxidase (GSH-Px, E.C. 1.11.1.9) foi determinada por meio da oxidação da glutathione em presença de peróxido de hidrogênio e cumene hidroperóxido. A atividade da superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) foi

determinada pela alteração na redução do nitroblue-tetrazólio (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) e fenazina metassulfato em pH fisiológico. A atividade enzimática da catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 12,5 dL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240 nm.

A concentração de hidroperóxido de lipídio foi determinada pela oxidação do Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal). O Fe^{3+} formado reage com alaranjado de xilenol formando composto colorido. Leituras foram realizadas a 560 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação de proteína total

A determinação do teor total de proteínas nas amostras de tecido muscular e hepático das três espécies estudadas, com os dois processos de extração e precipitação utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração proteica em mg mL^{-1} nos pellets dos tecidos muscular e hepático obtidos nas extrações 1 e 2 de cada espécie.

Tecido (mg mL^{-1})	DM	PM	CM	DH	PH	CH
Pellet Extração 1	22,80	31,50	16,50	5,38	10,53	5,80
Pellet Extração 2	19,00	14,95	19,00	19,70	6,18	19,70

DM: Pellet proteico de tecido muscular de Dourada; PM: Pellet proteico de tecido muscular de Pacu; CM: Pellet proteico de tecido muscular de Curimatã; DH: Pellet proteico de tecido hepático de Dourada; PH: Pellet proteico de tecido hepático de Pacu; CH: Pellet proteico de tecido hepático de Curimatã.

Pode-se observar na tabela 1 que a concentração proteica nos tecidos muscular de cada espécie tanto na extração 1 são maiores do que nos tecidos hepáticos. Já a extração 2 as concentrações ficaram bem próximas com exceção do tecido hepático do Pacu. A partir desses dados os pellets foram solubilizados e utilizou-se uma alíquota de 250 μL para aplicação nas fitas de IEF, garantindo a massa de 375 μg de proteína em cada fita de IEF.

4.2. Determinação de Mercúrio Total

Nessa etapa do trabalho quantificamos o mercúrio total presente nos tecidos e nos pellets proteicos utilizados para a aplicação nas fitas de IEF.

Apresentamos abaixo a Tabela 2 contendo as concentrações de mercúrio total.

Tabela 2. Concentração de Mercúrio quantificada em tecido muscular e hepático de Dourada, Pacu e Curimatã e em seus respectivos pellets com diferentes extrações.

Amostra/Espécie	Dourada [Hg]	Pacu [Hg]	Curimatã [Hg]
Tecido Muscular	^a 85,00±1,50 µg kg ⁻¹	^a 35,00±1,00 µg kg ⁻¹	^a 63,50±1,50 µg kg ⁻¹
Pellet 1 TM	^c 52,00±4,00 µg kg ⁻¹	^a 26,00±25,00 µg kg ⁻¹	^c 44,30±2,90 µg kg ⁻¹
Pellet 2 TM	^b 74,00±2,00 µg kg ⁻¹	^a 33,00±1,00 µg kg ⁻¹	^b 56,00±2,00 µg kg ⁻¹
Tecido Hepático	^a 1196,00±16,00 µg kg ⁻¹	^a 635,00±15,00 µg kg ⁻¹	^a 740,00±20,00 µg kg ⁻¹
Pellet 1 TH	^c 910,00±10,00 µg kg ⁻¹	^c 543,00±28,00 µg kg ⁻¹	^c 437,00±41,00 µg kg ⁻¹
Pellet 2 TH	^b 983,00±3,00 µg kg ⁻¹	^b 588,00±2,00 µg kg ⁻¹	^b 650,00±10,00 µg kg ⁻¹

Pellet 1 TM: Pellet proteico obtido na extração 1 do tecido muscular; Pellet 1 TH: Pellet proteico obtido na extração 1 do tecido hepático; Pellet 2 TM: Pellet proteico obtido na extração 2 do tecido muscular; Pellet 2 TH: Pellet proteico obtido na extração 2 do tecido hepático. [Hg] = concentração de mercúrio total determinado em micrograma por quilograma de amostra.

Com base nos dados apresentados na Tabela 2 e fazendo-se o cálculo de balanço de massa, em relação às duas precipitações, tanto para o tecido muscular como para o tecido hepático das três espécies estudadas, observou-se que em média 71% e 89 % do mercúrio está ligado as proteínas dos pellets proteicos obtidos na extração 1 e 2, respectivamente. Esses dados demonstram que o processo de extração foi satisfatório, podendo-se inferir que 29% do Hg nos tecidos da extração 1 e os 11% do Hg nos tecidos da extração 2 podem estar presentes na fração lipídica, considerando-se que não foi detectado mercúrio nas determinações feitas nos pellets das proteínas de massa molecular maior que 90,00 kDa.

Podemos visualizar também que o Hg se concentra mais no tecido hepático do que no tecido muscular, sendo em média 14 vezes maior a concentração de mercúrio presente no fígado em relação ao mercúrio presente no músculo. Essa média praticamente se manteve nas extrações, sendo na primeira extração cerca de 15 vezes maior a concentração de Hg no fígado do que no músculo; e na segunda extração cerca de 13 vezes. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos da literatura, que destacam maior acúmulo de metais tóxicos (como o mercúrio) no fígado do que no

músculo de peixes (Lebel et al., 1998; Afonso et al., 2007; Bebiano et al., 2007; Afonso et al., 2008; Syversen et al., 2012).

A extração 2 foi mais eficaz para os dois tecidos sendo 90% a recuperação de Hg para o músculo e 87,5% para o fígado, resultando na média de 88,7%. Já na extração 1 obtivemos 68,41% para o músculo e 73,6% para o fígado, resultando em média 71%.

Para uma análise mais precisa analisamos as médias de cada tecido e espécie estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade; as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna correspondente a cada espécie.

4.3. Otimização das separações eletroforéticas

Como o presente estudo tem por objetivo localizar metalotioneínas como possíveis biomarcadores de toxicidade de mercúrio, vários testes foram feitos trabalhando com diferentes concentrações de gel de poliacrilamida, e diferentes programações de corrida eletroforética na segunda fase (SDS-PAGE).

Abaixo demonstraremos as figuras (23 a 29) e suas respectivas discussões.

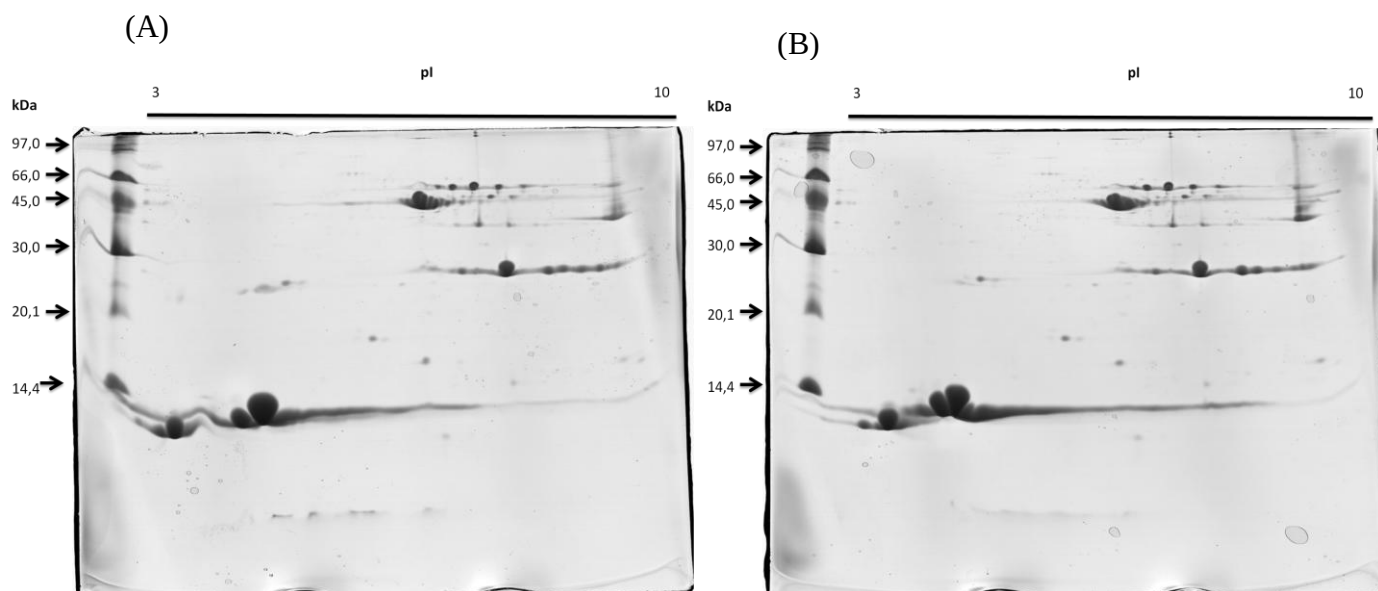


Figura 23: Géis de músculo de Curimatã com concentração de 18% de poliacrilamida e pH 3-10, o gel A corresponde a extração 1 e o gel B corresponde a extração 2.

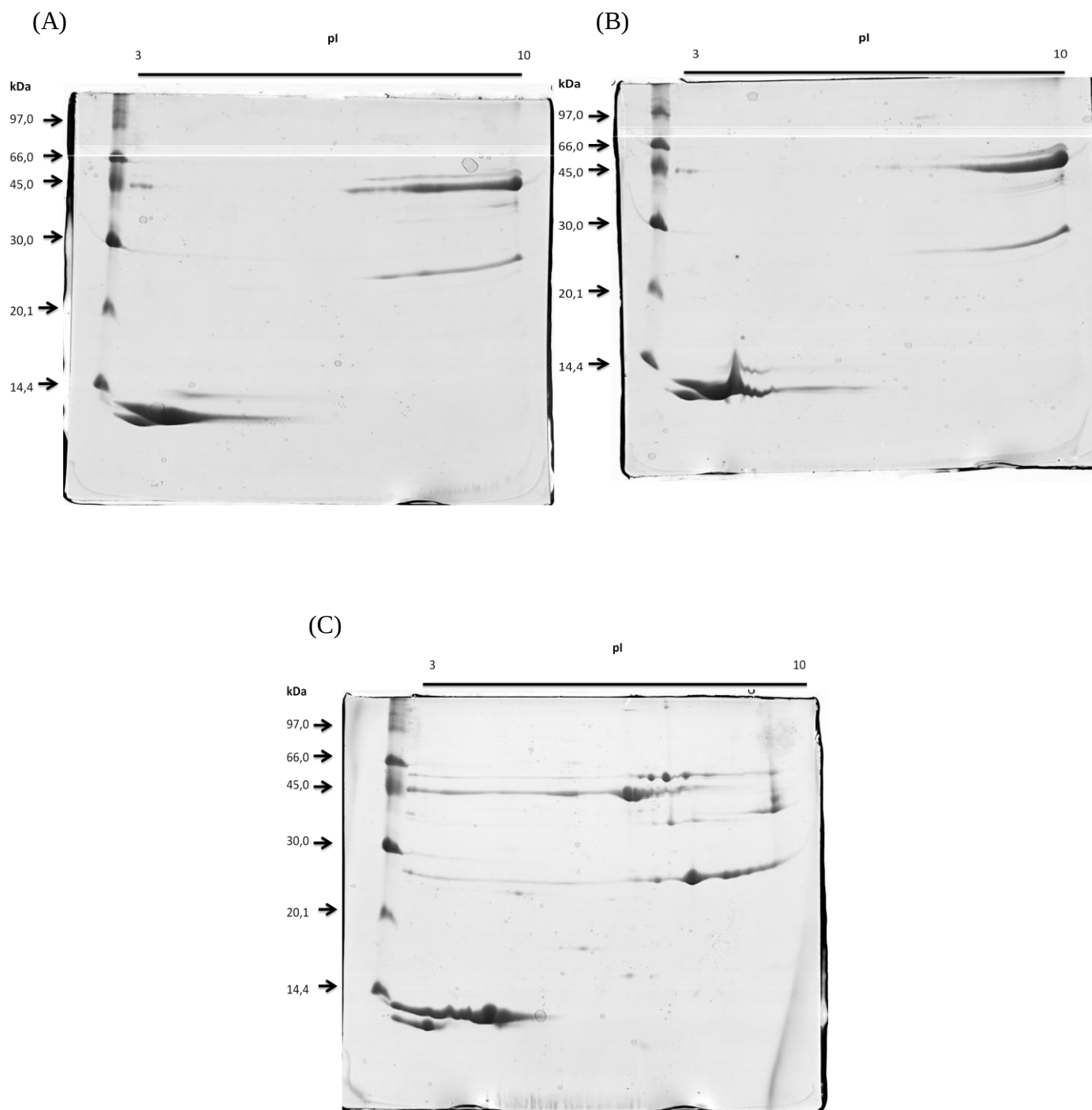


Figura 24: Géis de músculo de Dourada (A), músculo de Pacu (B) e músculo de Curimatã (C) com concentração de 15% de poliacrilamida e fitas pH 3-10, corrida A, extração 1.

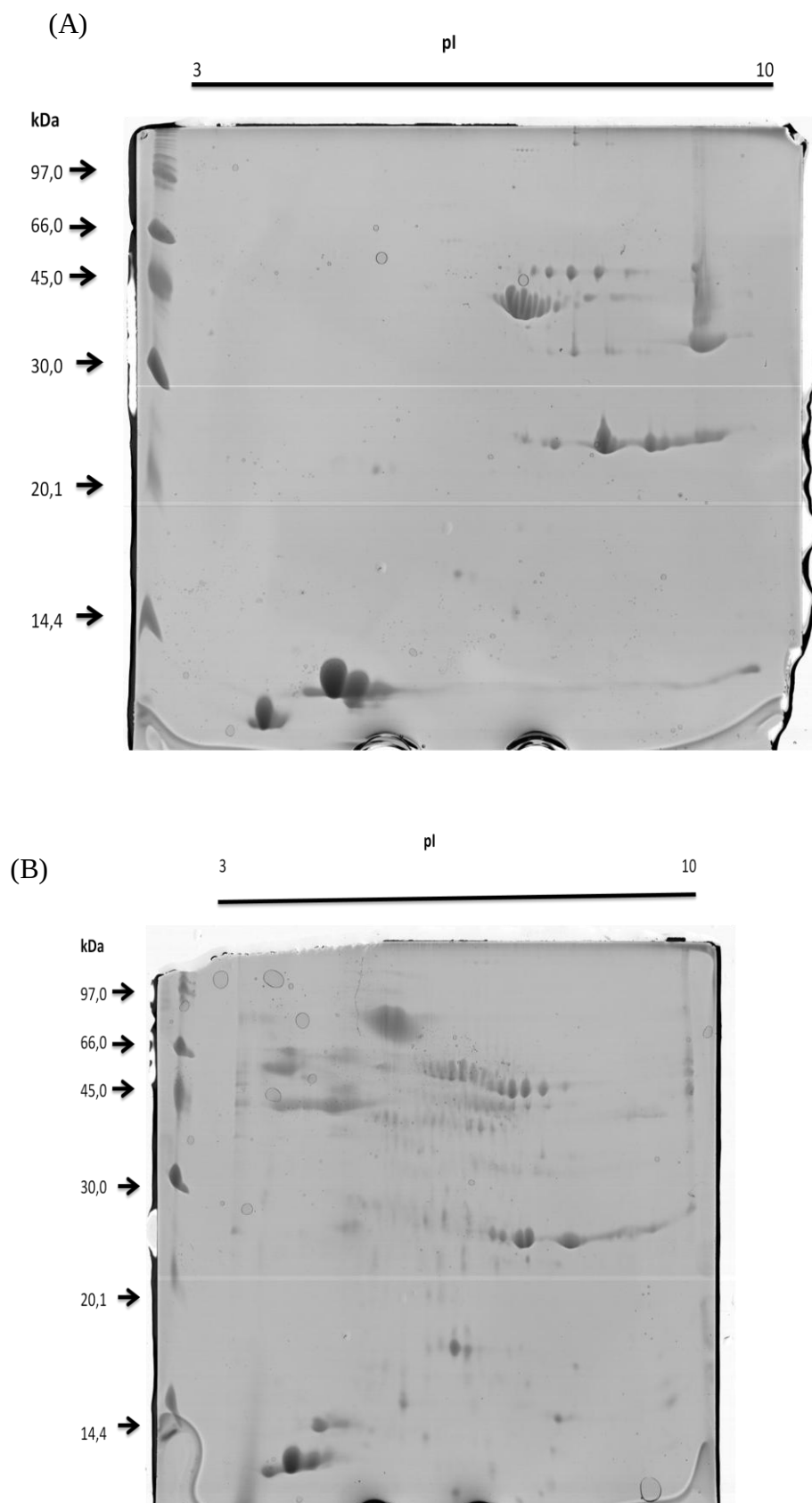


Figura 25: Géis de tecido muscular (A) e tecido hepático e (B) de Dourada com concentração de 15% de poliacrilamida e fitas pH 3-10, corrida B, extração 1.

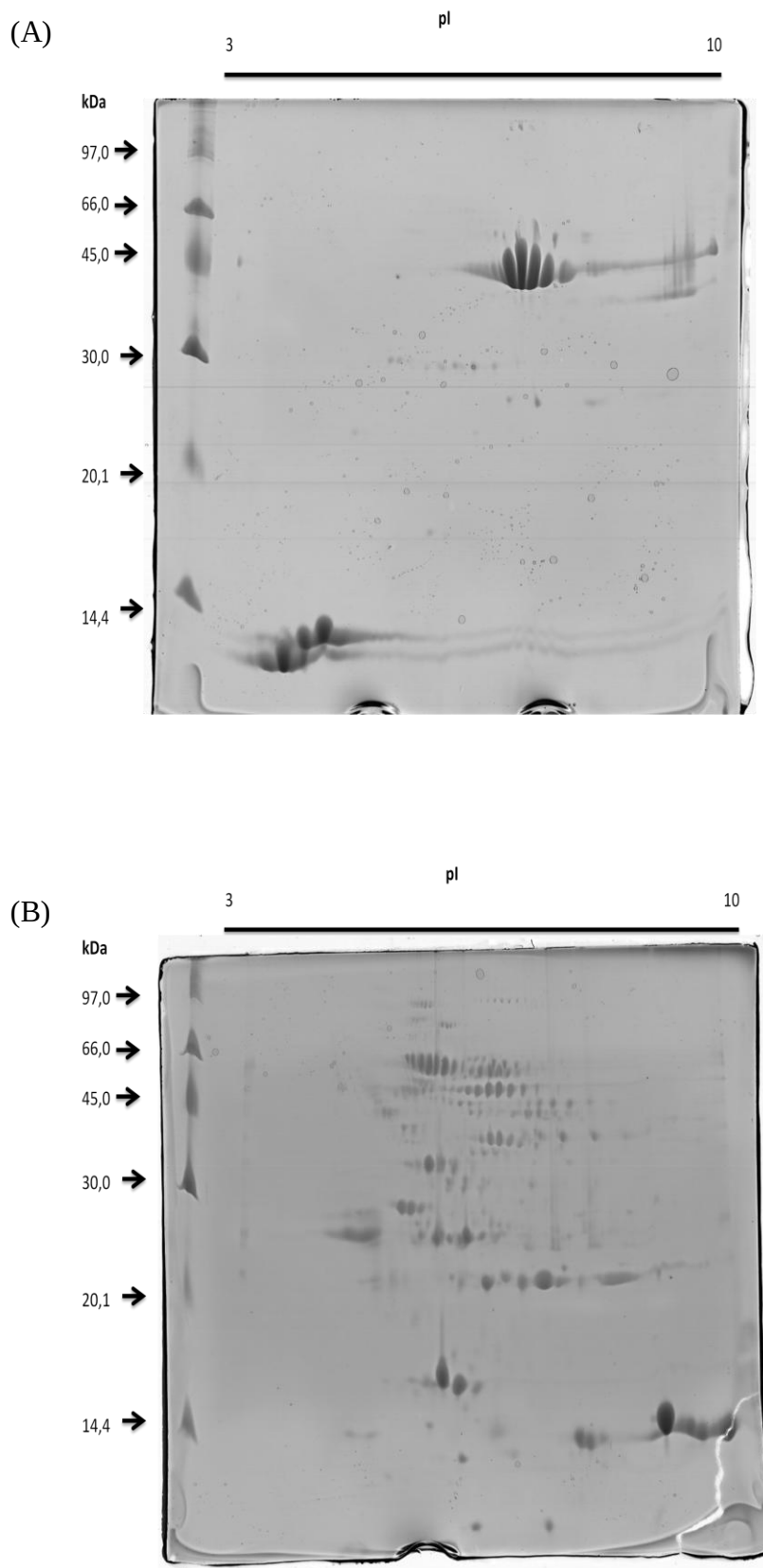
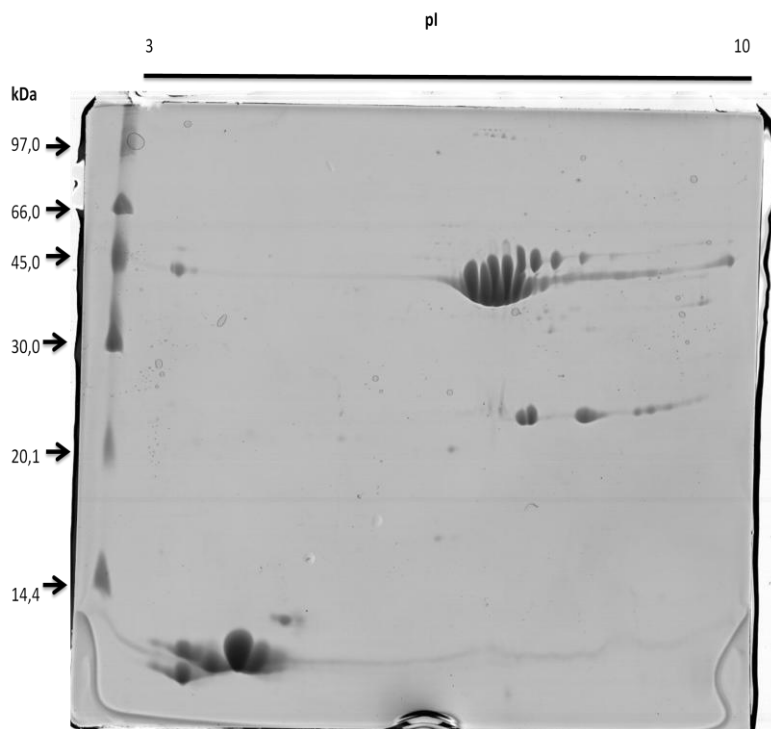


Figura 26: Géis de tecido muscular (A) e tecido hepático (B) de Pacu com concentração de 15% de poliacrilamida e fitas pH 3-10, corrida B, extração 1.

(A)



(B)

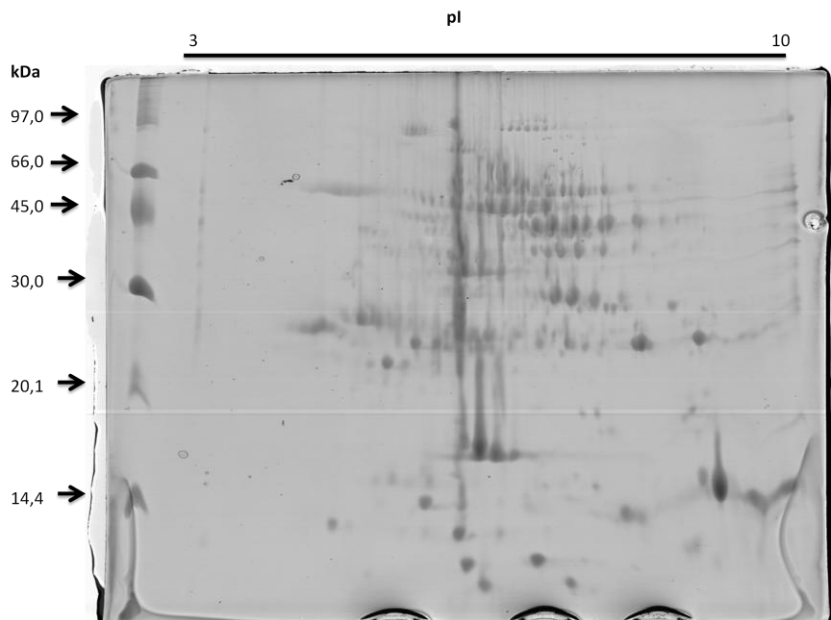
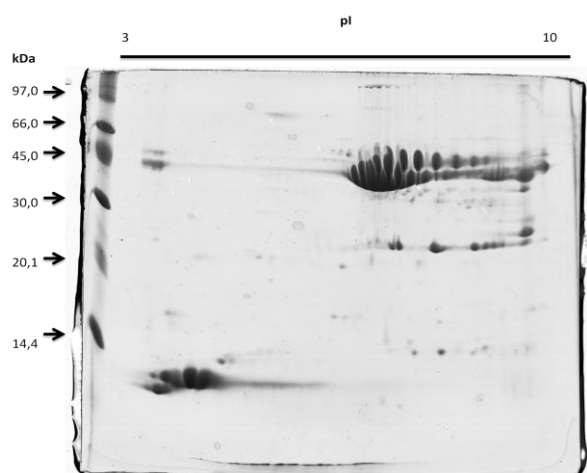
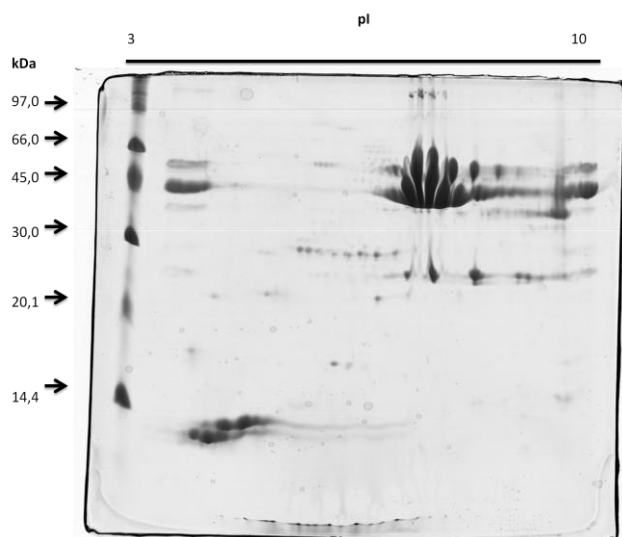


Figura 27: Géis de tecido muscular (A) e tecido hepático (B) de Curimatã com concentração de 15% de poliacrilamida e fitas pH 3-10, corrida B, extração 1.

(A)



(B)



(C)

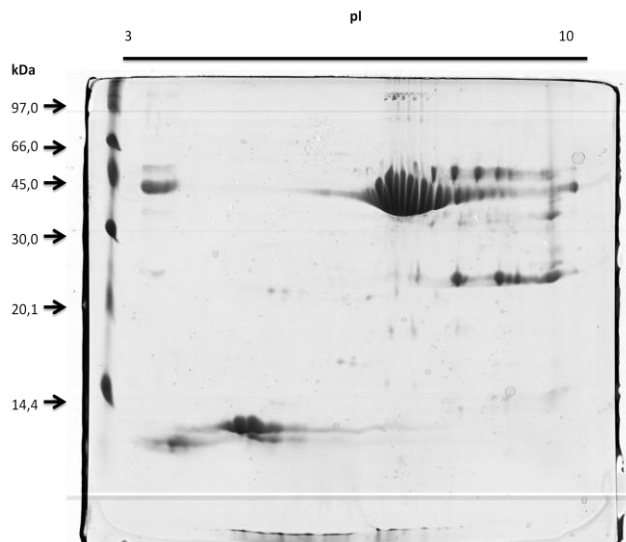


Figura 28: Géis 15% e pH 3-10, extração 2, corrida B, (A) tecido muscular Dourada, (B) tecido muscular Pacu, (C) tecido muscular Curimatã.

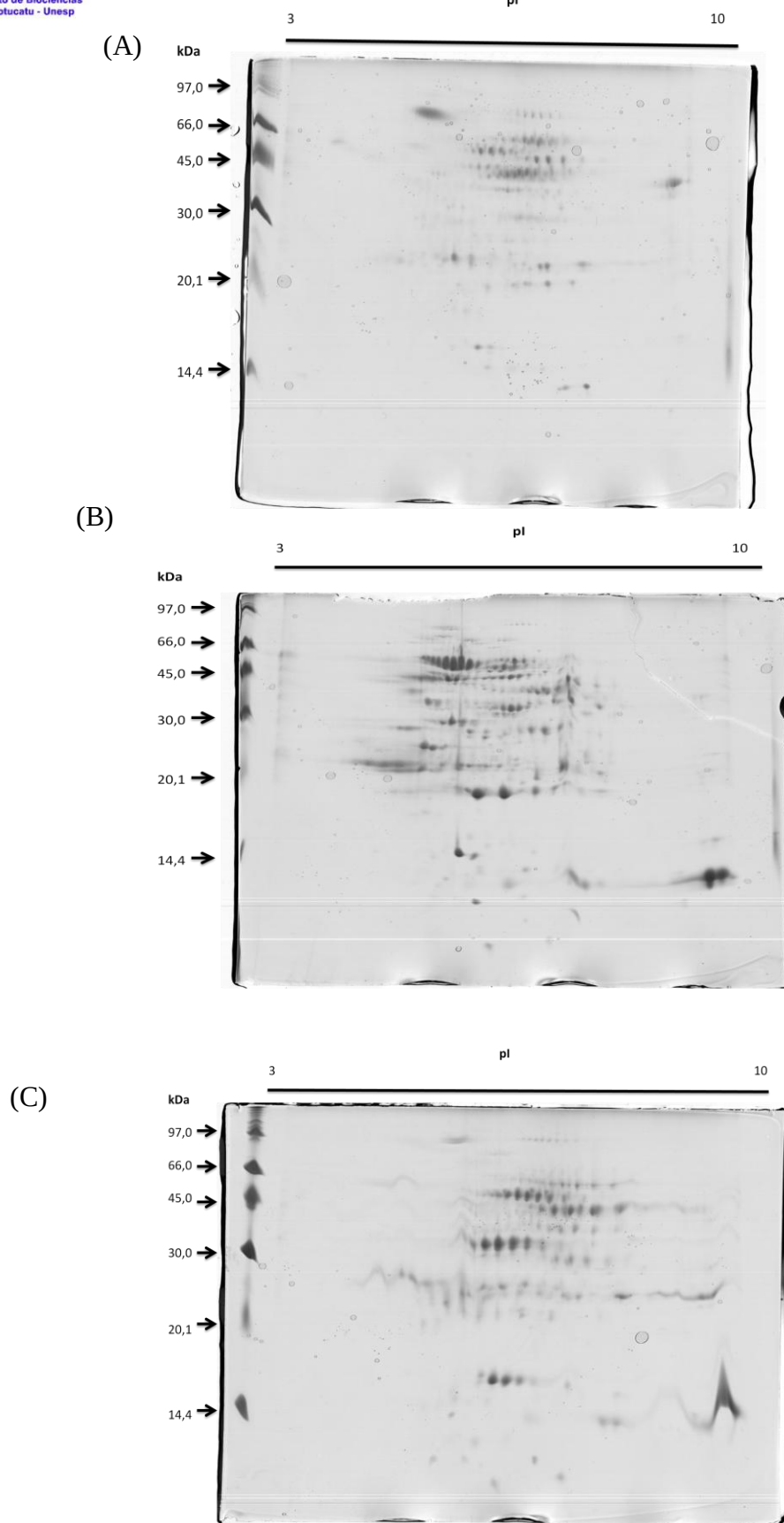


Figura 29: Géis 15% e fitas pH 3-10, extração 2, corrida B, (A) tecido hepático Dourada, (B) tecido hepático Pacu, (C) tecido hepático Curimatã.

Os primeiros testes foram com gel de concentração de 18% de poliacrilamida (Figura 23) e programação de 18 horas, com baixa voltagem (100 V) buscando obter uma separação onde os spots pudessem ficar mais definidos e também de forma que não perdêssemos as metalotioneínas durante a corrida eletroforética, pois elas estariam abaixo do nosso último marcador de massa molecular de 14,4 kDa.

Percebeu-se, no entanto, que não haviam tantas proteínas abaixo do padrão de 14,4 kDa e que os spots ficavam muito semelhantes a corridas realizadas de Braga et al. (2015) e Vieira et al. (2015). Dessa forma, a concentração do gel foi reduzida de 18 para 15% e com a programação “A”, as imagens com exemplares desses géis são mostrados na Figura 24.

As corridas com essa programação não foram satisfatórias, pois os spots não ficaram bem definidos; com base nesses géis outras corridas eletroforéticas foram testadas com a programação “B”, os géis dessa corrida estão apresentados nas figuras 25, 26 e 27.

A partir dessas condições de corrida com géis de concentração de 15% e programação B (6,5 horas de corrida com 0,5h de 100V e 6h de 160V) as corridas eletroforéticas foram otimizadas para todas as espécies e tecidos estudados usando a extração 1 (Figuras 25, 26 e 27) a extração 2 (Figuras 28 e 29). Contudo, baseando-se em resultados anteriores de Braga et al. (2015) e Vieira et al. (2015), as proteínas de massa molecular menor que 14,4 kDa e que estão ligadas ao mercúrio, tratam-se de proteínas metal-ligante (*metal binding protein*) e não de metalotioneínas.

Dando continuidade ao estudo e de posse das condições de corridas eletroforéticas (2D-PAGE) estabelecidas e otimizadas, foi utilizado o padrão de MTs (Metallothioneins -1 Rabbit Liver, Enzo Life Sciences; que apresenta a seguinte descrição do fabricante “Mixture of MT isoforms. Contains mainly MT-1a and MT-2e and a minor portion of MT-2d.”; “Quantify: 1mg contains 0.75 mg of the protein”) como amostra para observar como se comportou no processo de fracionamento das proteínas do padrão no gel. Obteve-se a Figura 30 representada abaixo.

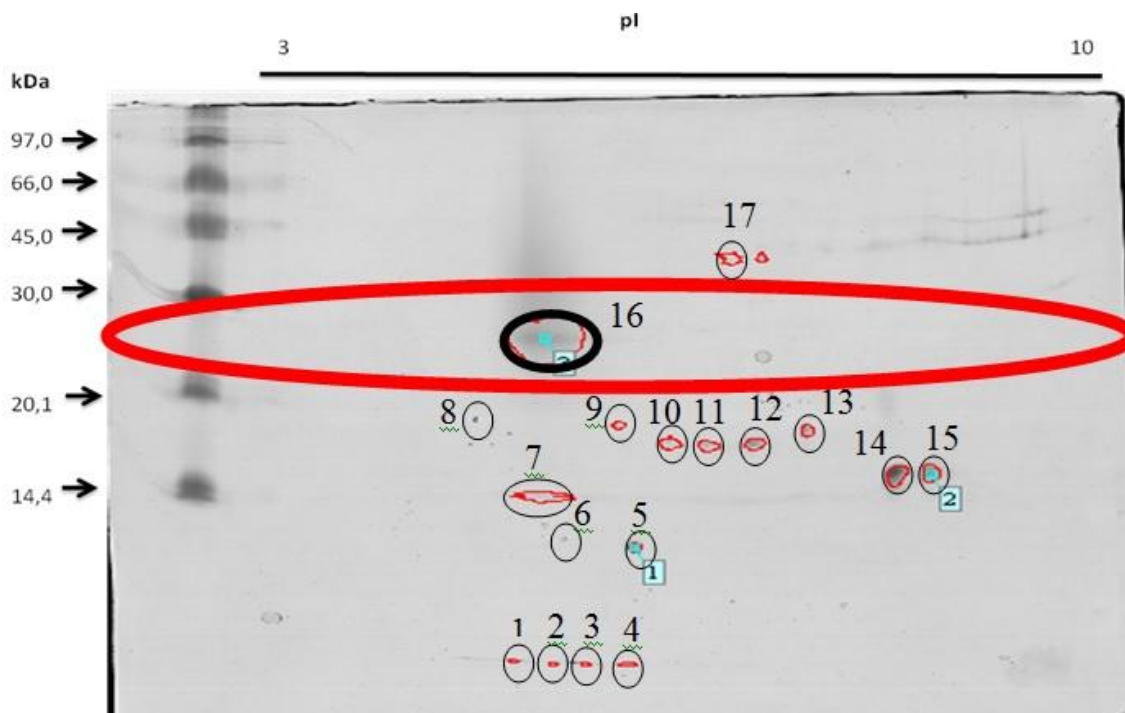


Figura 30: Gel 15% obtido na corrida eletroforética dos padrões de 14,4 a 97,0 kDa e pI 3-10, com o padrão de MTs.

O gel apresentado na Figura 30 é representativo de três corridas com três repetições do fracionamento do padrão de metalotioneínas. Nas condições de corridas 2D-PAGE, descritas anteriormente (programação B), obteve-se matching de 95% o que comprova a reprodutibilidade e a repetibilidade dessas corridas.

Os spots obtidos no processo de fracionamento por 2D-PAGE do padrão de MTs foram recortados e caracterizados por ESI-MS/MS. Dos 17 spots recortados e caracterizados apenas o spot circulado em preto, de número 16, foi caracterizado como sendo *Metallothionein-2C* (os demais spots caracterizados por ESI-MS/MS se encontram no anexo I), além dele outras duas proteínas foram caracterizadas, a *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* e a *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A*. Essas proteínas têm como função biológica realizar ligação entre cadeias peptídicas, o que reitera a hipótese das MTs estarem associadas a outras proteínas formando complexos. A proteína *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* auxilia no processo de montagem de polipeptídeos tanto covalente como não covalente de cadeia única ou de complexos de múltiplas subunidades formando estruturas terciárias. Já a *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A* interage seletivamente e de forma não covalente com peptídios, com

qualquer grupo de compostos orgânicos compreendendo dois ou mais aminoácidos ligados por ligações peptídicas.

Como foi observado que essa MT se encontrava na região do gel entre os padrões de massa molecular de 30,00 e 20,10 kDa, apesar de sua massa molecular de acordo com o resultado obtido por ESI-MS/MS ser de 7,55 kDa (conforme Tabela 3), podendo-se inferir que a MT caracterizada pode ter se conjugado a outras proteínas, conforme descrito no parágrafo anterior. Optou-se, portanto em recortar os spots presentes nessa região (30,00 e 20,10 kDa) dos géis das espécies de estudo.

Abaixo, parte da Tabela 3 é apresentada com o spot 16 caracterizado do padrão de MTs; o restante dessa tabela está apresentado no anexo I.

Tabela 3. Proteínas identificadas com padrão de metalotioneínas, spot 16.

	protein. Entry	protein. Accession	protein.Description	Protein dataBase Type	protein. Score	protein. avgMass	Protein Matched Products	Proteinseq Cover(%)	Protein AutoCurate
Spot 16	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	Regular	1682.463	18720.643	19	10.98	Green
	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	Regular	1682.463	18624.4871	19	10.98	Green
	MT2C_RABIT	P80290	Metallothionein-2C OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	Regular	252.2853	7554.7983	14	56.45	Green

4.4. Estudo das imagens dos géis de 2D-PAGE

As Figuras 31, 32, 34, 35, 37 e 39 (que se encontram nas páginas posteriores) apresentam as imagens dos géis obtidos nas corridas 2D-PAGE de cada espécie e tecido estudado. Os géis apresentados são representativos de 9 géis ao todo (3 corridas com 3 géis cada). As imagens e análises dos géis foram obtidas a partir do programa *Image Master Platinum 7.0*. A Tabela 4 apresenta os dados obtidos nas análises de imagem dos géis.

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 a extração e precipitação 2 e programação B.

Espécies de peixes		Nº médio de spots (n=9)	Correlação média entre os géis (<i>matching</i>)
Tecido Muscular	Dourada	106 ± 8	80 ± 4 %
	Pacu	63 ± 4	91 ± 4 %
	Curimatã	164 ± 4	82 ± 4 %
Tecido Hepático	Dourada	188 ± 6	93 ± 3 %
	Pacu	75 ± 6	89 ± 3 %
	Curimatã	238 ± 8	82 ± 3 %

Conforme pode ser observado na Tabela 4, a análise de correlação entre os géis, considerando as três corridas eletroforéticas, demonstrou que em média mais de 80% dos spots proteicos estavam presentes nos nove géis das amostras de tecido muscular e hepático das espécies de peixes estudadas. Deve-se destacar que o número médio de spots encontrados nos géis e o *matching* (correlação entre os géis), considerando três corridas eletroforéticas – com três géis por corrida – apresentaram desvios padrões menores que 5%. Além disso, os resultados apresentados na Tabela 4 demonstraram que as condições da 2D-PAGE otimizadas foram mais eficientes quando comparadas com outras condições de corridas da literatura (Beranova-Giorgianni, 2003; Garcia et al., 2006; Sussulini et al., 2007a; Sussulini et al., 2007b; Garcia et al., 2009; Da Silva et al., 2010; Lima et al., 2010; Mataveli et al., 2010; Santos et al., 2011; Moraes et al., 2012; Neves et al., 2012).

Na Tabela 5 são apresentados os resultados obtidos na determinação de mercúrio por GFAAS nos spots proteicos das amostras de tecido hepático de dourada, pacu e curimatã. Nos spots proteicos das amostras de tecido muscular as determinações por GFAAS não indicaram a presença de mercúrio.

Tabela 5. Valores obtidos na determinação da concentração de mercúrio por GFAAS nos spots proteicos das amostras de hepático de dourada, pacu e curimatã.

Spots Proteicos	Massa Molecular (kDa)	PI	Concentração de Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$)
DF 1	22,93	6,92	17,30
DF 2	23,06	7,07	25,03
DF 3	22,93	7,38	4,50
DF 4	22,93	7,50	5,11
DF 5	21,06	7,50	26,35
PF 1	25,67	4,17	21,05
CF 8	25,43	5,80	55,90

DF spots do fígado de dourada; PF spots do fígado de pacu; CF spots do fígado de curimatã.

De acordo com a Tabela 5 dos 44 spots da região entre os marcadores de 30,00 e 20,10 kDa (onde foi encontrada a MTs da corrida realizada com o padrão de MTs), foi determinada a presença de mercúrio em sete spots nas amostras de tecido hepático de dourada, pacu e curimatã. As concentrações de mercúrio apresentaram-se na faixa de $4,05 \mu\text{g g}^{-1}$ (spot 3 de fígado de Dourada) até $55,90 \mu\text{g g}^{-1}$ (spot 8 de fígado de Curimatã).

Os resultados apresentados na Tabela 2 indicaram maior concentração de mercúrio no fígado da espécie de peixe dourada, o que corrobora com os resultados obtidos em relação aos spots proteicos. Os resultados obtidos nas determinações de mercúrio nos spots proteicos na região proposta (30,00 - 20,10 kDa) para cada uma das espécies de peixes serão discutidos a seguir.

No gel apresentado na Figura 31, na região proposta (30,00 - 20,10 kDa) foram selecionados sete spots e caracterizados por ESI-MS/MS. As determinações de mercúrio por GFAAS não indicaram a presença do mesmo nesses spots.

Braga et al. (2015) realizaram determinações de mercúrio por GFAAS em spots proteicos na região abaixo de 20,10 kDa, justificando portanto a presença de mercúrio apresentada no tecido muscular ($85,00 \pm 1,50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e pellets proteicos 1- $52,00 \pm 4,00 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 2 - $74,00 \pm 2,00 \mu\text{g kg}^{-1}$) no presente estudo. Os spots com presença de mercúrio

foram analisados por ESI-MS/MS, sendo que em nenhum deles foram caracterizadas metalotioneínas. As concentrações médias de mercúrio nos oito spots apresentaram-se na faixa de $11,40 \text{ mg g}^{-1}$ a $35,10 \text{ mg g}^{-1}$. As proteínas caracterizadas nesses spots foram as seguintes: *protein NLRC5*; *39S ribosomal protein L36 mitochondrial*; *N-alpha-acetyltransferase 20*; *Mth938 domain-containing protein*; *ubiquitin-40S ribosomal protein S27a*; *parvalbumin α* e *parvalbumin β* .

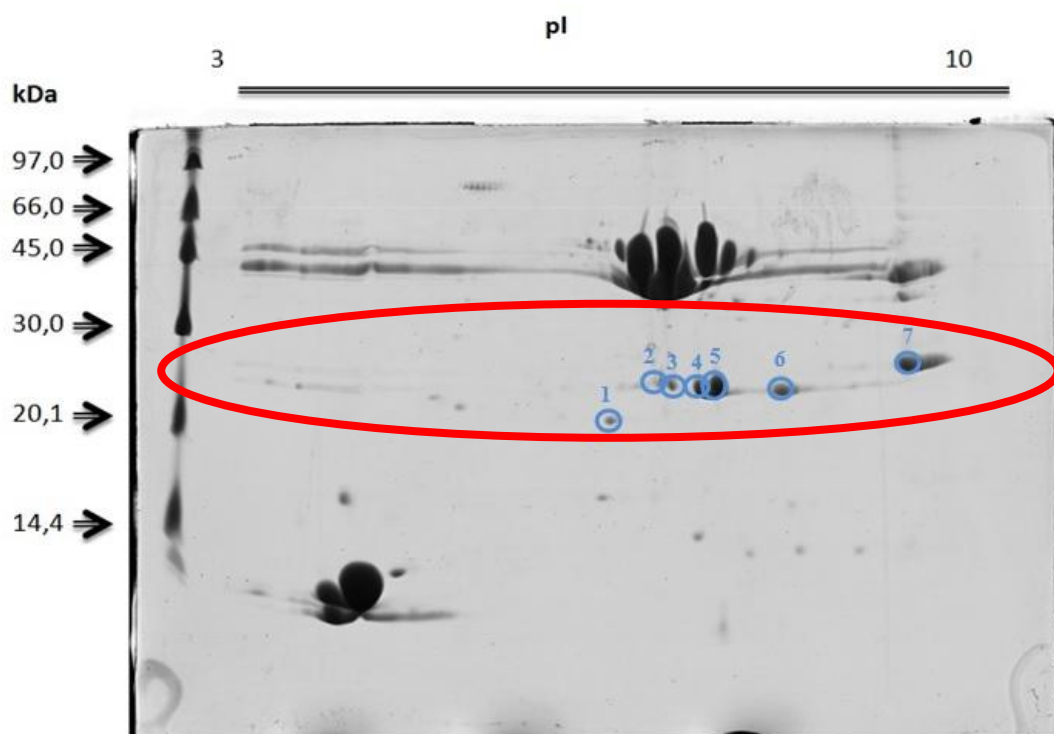


Figura 31: Gel 15%, pH 3-10, Músculo Dourada, não foi detectado mercúrio em nenhum spot (azul) da região proposta (destacada em vermelho).

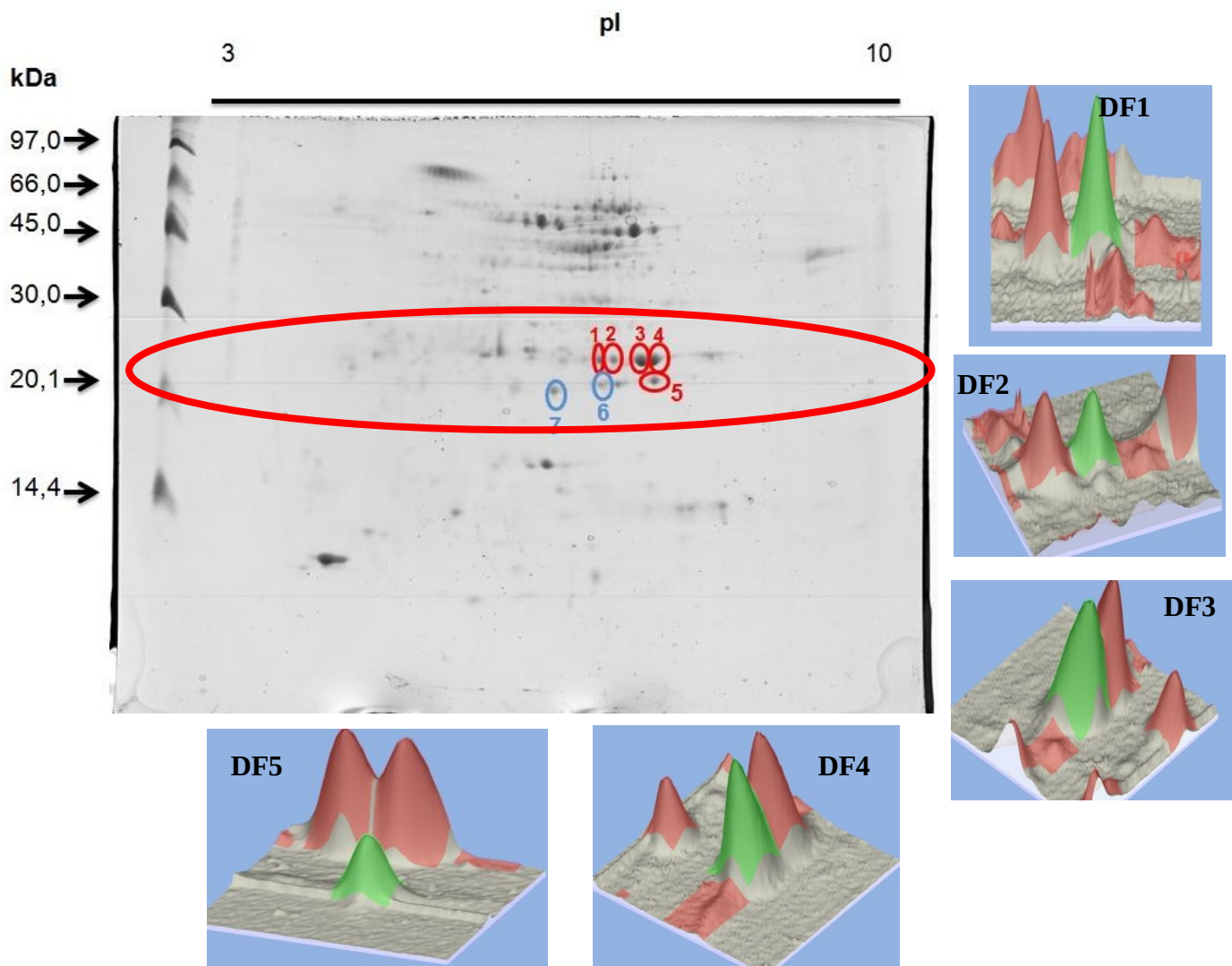


Figura 32: Gel 15%, pH 3-10, Fígado de Dourada, os spots marcados em vermelho (na região proposta) são os que apresentam mercúrio, juntamente com os spots em 3D (spot selecionado está com a cor verde).

Nas corridas 2D PAGE do tecido hepático de dourada (Figura 32), foram selecionados sete spots na região proposta (30,00 kDa a 20,10 kDa) dos quais cinco apresentaram mercúrio. Em estudo semelhante o fracionamento por 2D-PAGE (com o mesmo processo de extração descrito em Braga et al., 2015) apresentou também presença de mercúrio no gel do fígado de dourada com outra região de spots selecionada, abaixo de 14,40 kDa (Figura 33).

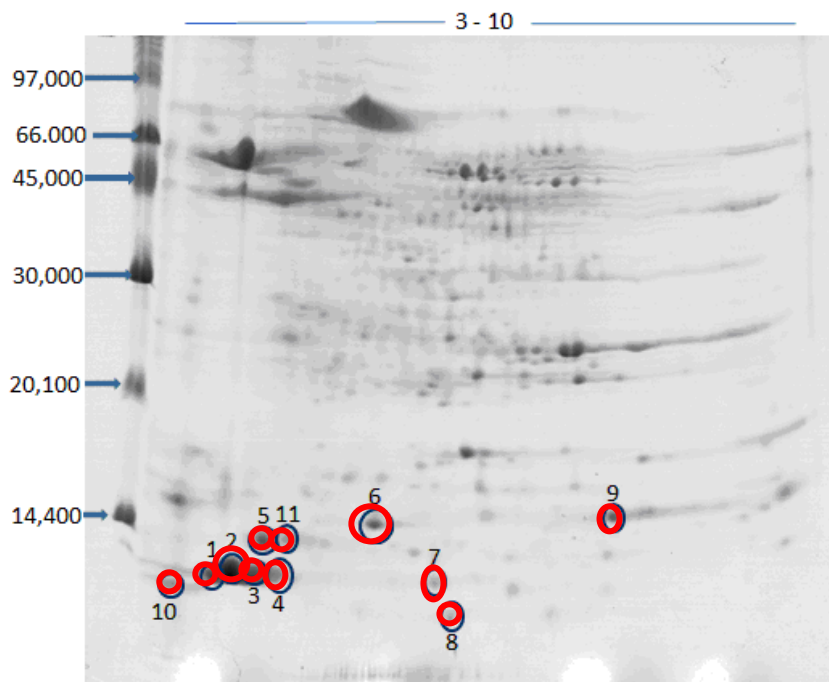


Figura 33. Gel 15%, pH 3-10, Fígado de Dourada, os spots marcados em vermelho são os que apresentam mercúrio.

No estudo foram selecionados 11 spots da região abaixo de 14,40 kDa, e em todos havia a presença de mercúrio na determinação por GFAAS, mas na caracterização por ESI-MS/MS não foi encontrada nenhuma MTs. A presença de mercúrio nas duas regiões de estudo (30,00 kDa até abaixo de 14,40 kDa) corrobora com a alta concentração de mercúrio encontrada no tecido hepático de dourada, apresentado nesse estudo ($1.196,00 \pm 16,00 \mu\text{g kg}^{-1}$, e pellets proteicos 1- $910,00 \pm 10,00 \mu\text{g kg}^{-1}$, 2- $983,00 \pm 3,00 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Na figura 33 a concentração de mercúrio nos spots foi de $11,70 \text{ mg g}^{-1}$ a $66,80 \text{ mg g}^{-1}$ e as proteínas caracterizadas por ESI-MS/MS foram: *Fatty acid-binding protein 10-A liver basic*; *Interleukin enhancer-binding factor 2 homolog*; *Parvalbumin β* ; *Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 11*; *5-hydroxyisourate hydrolase*; *Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a*. De acordo com os dados apresentados nenhuma MTs foi encontrada.

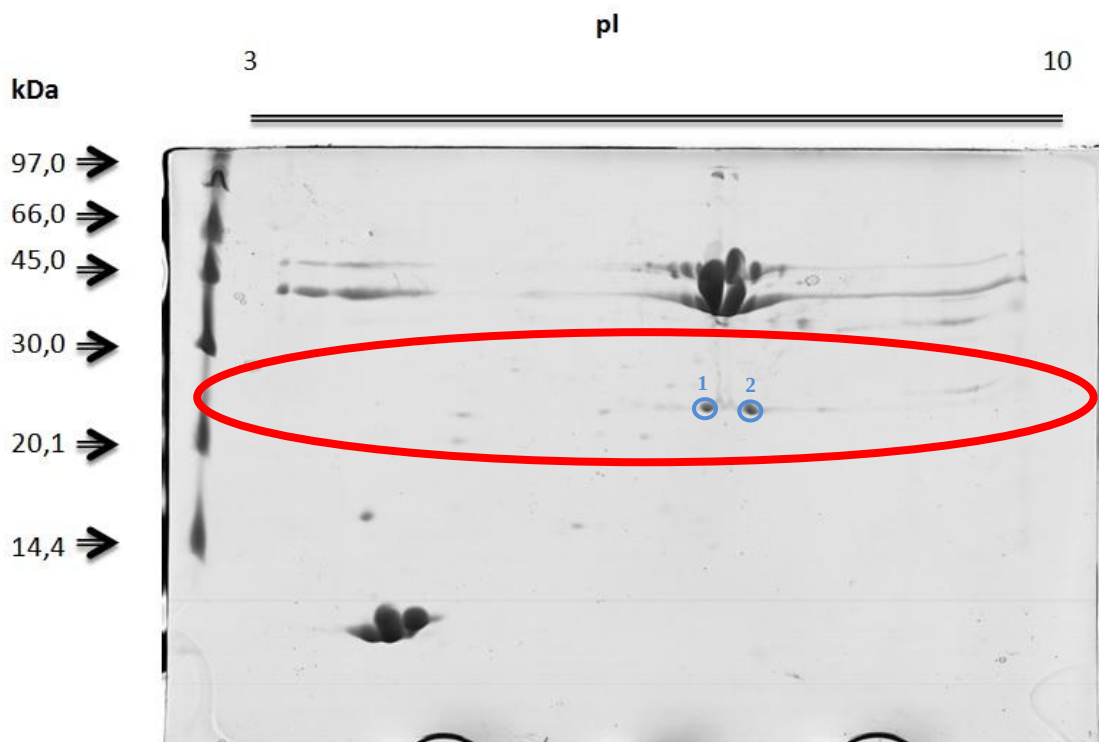


Figura 34: Gel 15% de Músculo de Pacu, não foi detectado Mercúrio em nenhum spot da região proposta.

A Figura 34 apresenta a imagem de um dos géis de músculo de pacu. Conforme apresentado na imagem os dois spots selecionados não apresentaram mercúrio e também em caracterização por ESI-MS/MS não foi detectada MTs. Moraes et al. (2014) também realizou estudo de tecido muscular de pacu, na região abaixo de 20,10 kDa; foram selecionados sete com presença de mercúrio que variou entre 11,30 mg g⁻¹ a 37,80 mg g⁻¹, o que demonstra que o resultado de presença de mercúrio no músculo de pacu na Tabela 2 corresponde ao que foi quantificado (35,00±1,00 µg kg⁻¹, e nos pellets 1- 26,00±25,00 µg kg⁻¹, e 2- 33,00±1,00 µg kg⁻¹). Na caracterização por ESI-MS/MS foram encontradas as seguintes proteínas: *Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a*; *Parvalbumin α*; *Parvalbumin-2*; *Parvalbumin β*. Nenhuma MTs foi caracterizada.

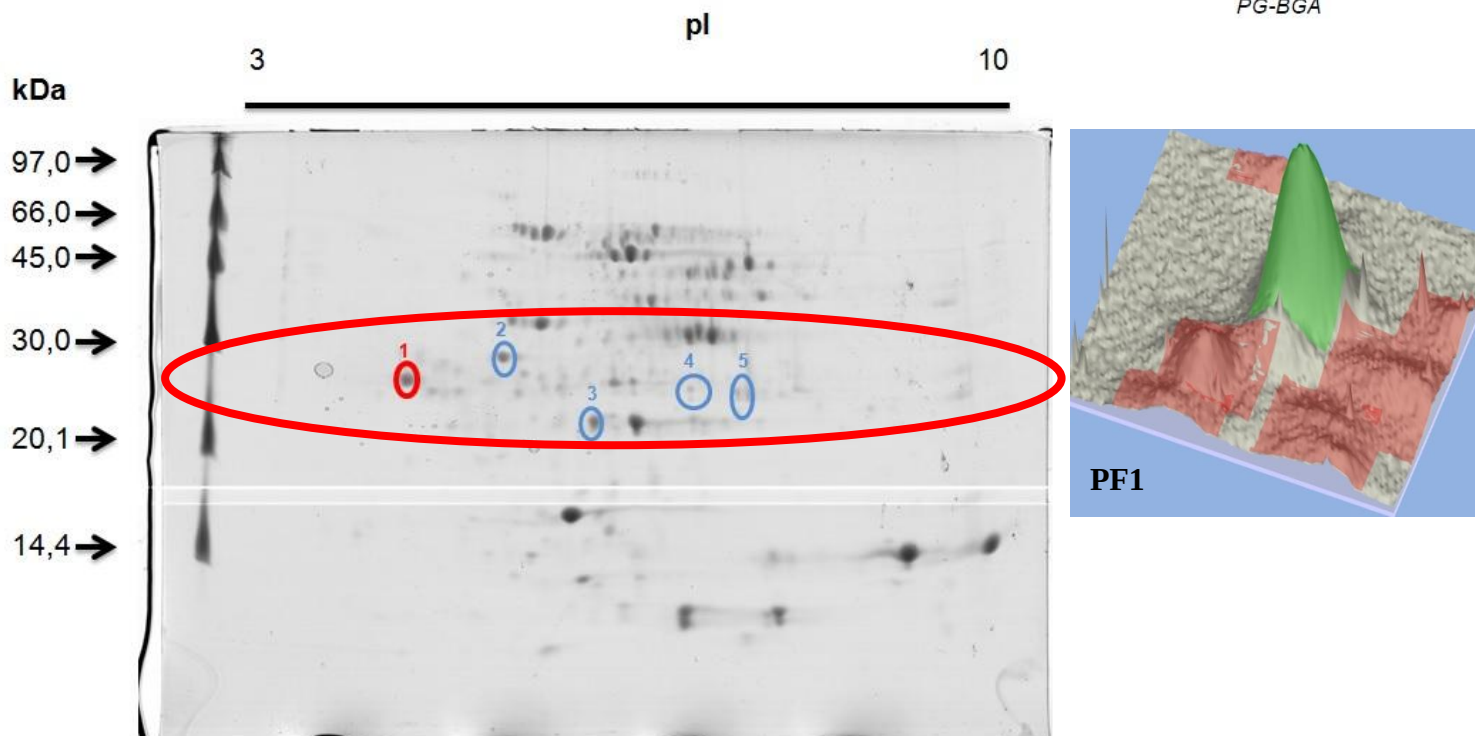


Figura 35: Gel 15%, pH 3-10, Fígado de Pacu, o spot marcado em vermelho é o que apresenta mercúrio, dentro da região proposta; a imagem ao lado representa o spot em 3D (spot selecionado está com a cor verde).

Ao todo foram selecionados cinco spots da região proposta e em apenas um detectou-se a presença de mercúrio (Spot 1). Em outro trabalho, o fígado de pacu foi objeto de estudo, com a região abaixo de 14,40 kDa sendo mapeada por GFAAS para detectar a presença de mercúrio; nele foram detectados oito spots (Figura 36) com presença de mercúrio que variou entre 13,80 mg g⁻¹ a 68,10 mg g⁻¹. Na caracterização por ESI-MS/MS foram identificadas as seguintes proteínas: *Parvalbumin-2*; *Parvalbumin α*; *Parvalbumin-3*; *Parvalbumin β*; *Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 2*; *Fatty acid-binding protein 10-A liver basic*; *Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a*; *Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1* e *Ig heavy chain V region 5A*. Mas não foram encontradas MTs. As condições para extração proteica foram as mesmas descritas em Braga et al., 2015.

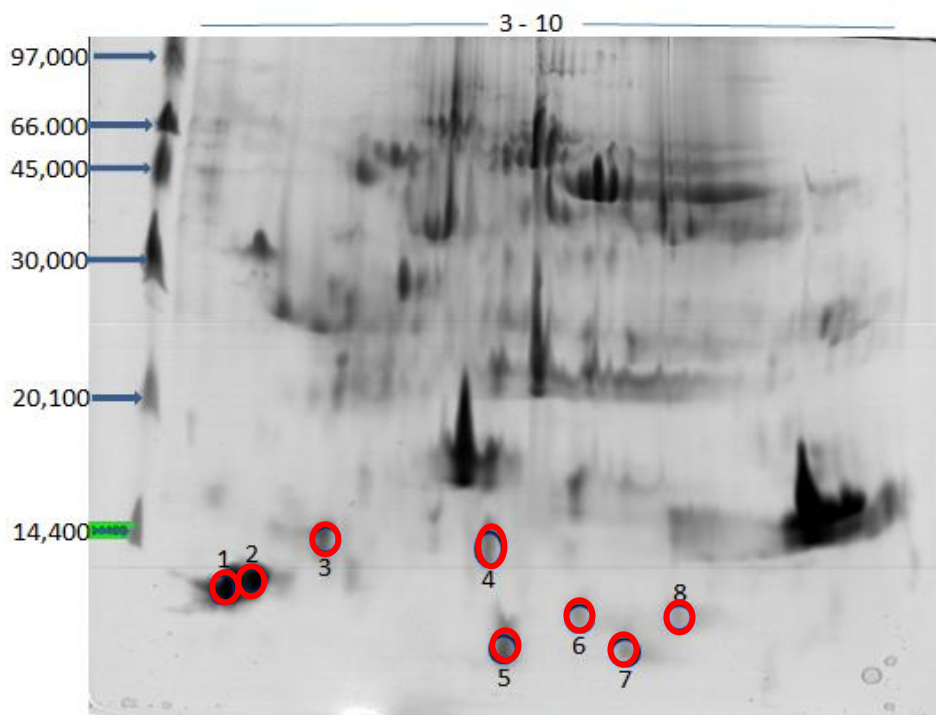


Figura 36: Gel 15%, pH 3-10, Fígado de Pacu, os spots marcados são os que apresentaram presença de mercúrio.

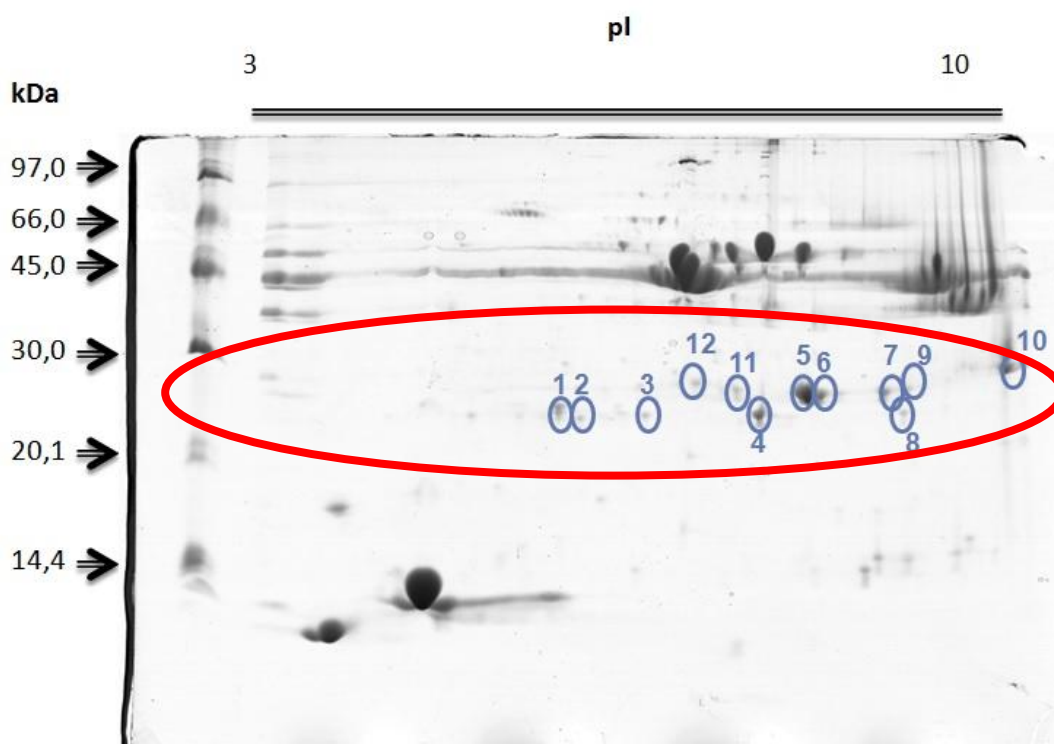


Figura 37: Gel 15%, pH 3-10, Músculo Curimatã, não foi detectado mercúrio em nenhum spot da região proposta.

Na Figura 37 observa-se que dos 12 spots selecionados, nenhum apresentou mercúrio. Nos resultados do tecido muscular apresentados na Tabela 2 há a presença de mercúrio na concentração de $63,50 \pm 1,50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e nos pellets proteicos 1- $44,30 \pm 2,90 \mu\text{g kg}^{-1}$, e 2- $56,00 \pm 2,00 \mu\text{g kg}^{-1}$. Em trabalho do grupo encontrou-se mercúrio na região abaixo de 14,40 kDa (Figura 38).

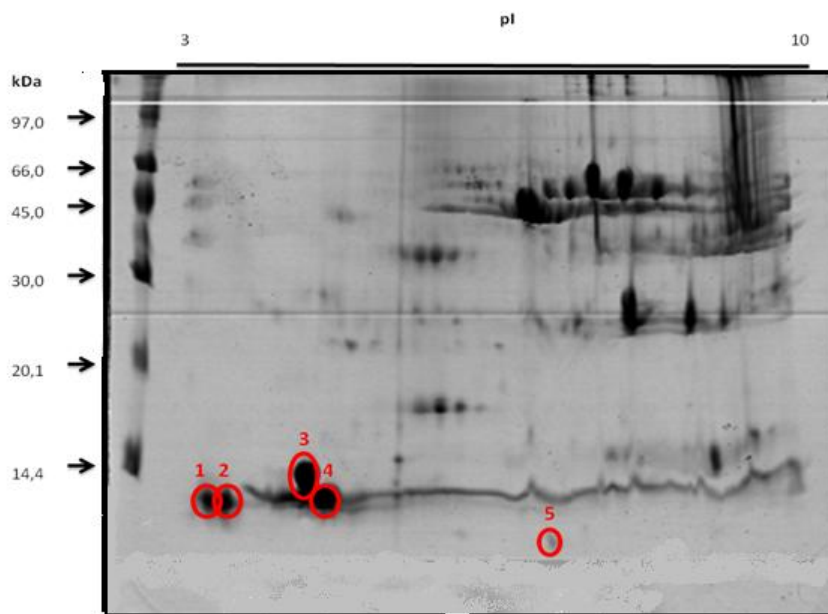


Figura 38: Gel 15%, pH 3-10, Músculo Curimatã, os spots marcados apresentaram mercúrio.

Na figura 38 cinco spots apresentaram a presença de mercúrio, as concentrações variaram entre $14,80 \text{ mg g}^{-1}$ a $17,20 \text{ mg g}^{-1}$. A caracterização por ESI-MS/MS identificou: *Parvalbumin-2*; *Parvalbumin α* ; *Parvalbumin β* ; *Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a*. Mas nenhuma MTs foi identificada.

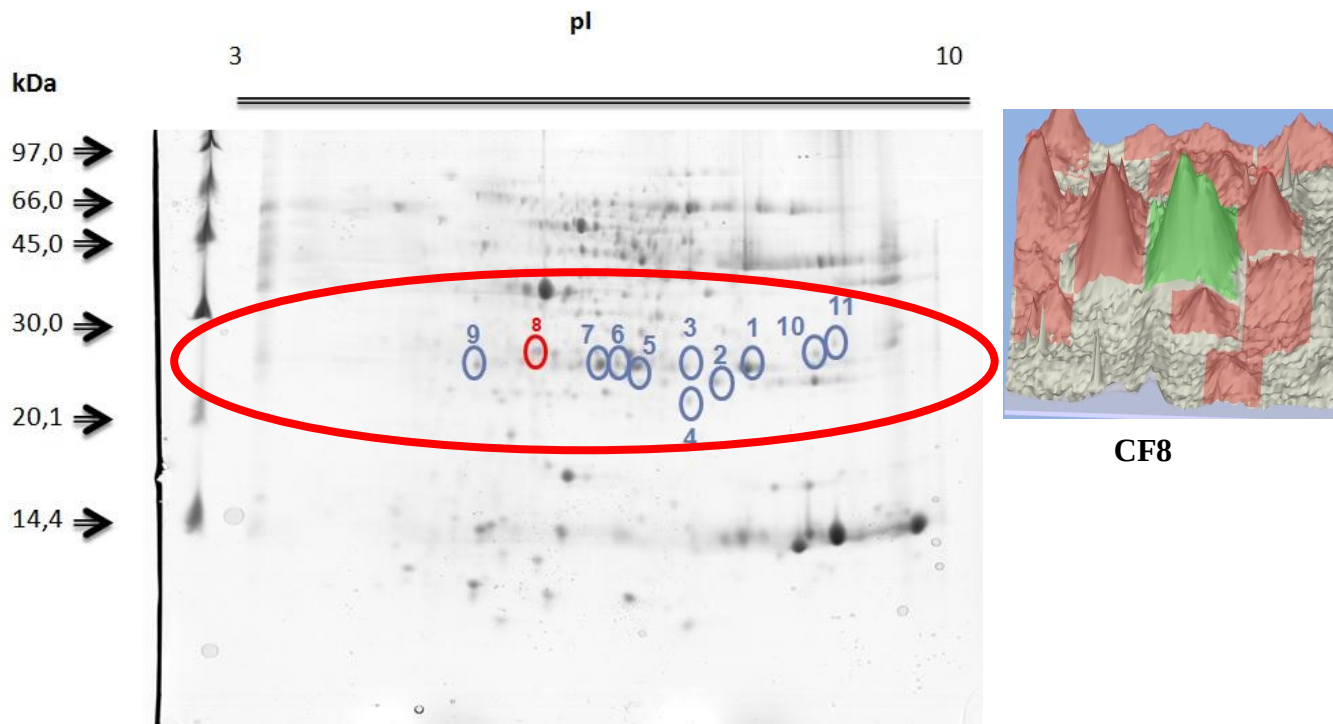


Figura 39: Gel 15%, pH 3-10, Fígado de Curimatã, o spot marcado em vermelho apresenta mercúrio. A imagem ao lado representa o spot em 3D (spot selecionado está com a cor verde).

Constata-se na Figura 39 que dos 11 spots selecionados apenas um (spot 8) apresentou mercúrio. Essa proteína identificada por ESI-MS/MS foi a *Protein FAM45A*, que será discutida a seguir.

4.5. Caracterização dos spots proteicos na região de 20,10 kDa a 30,00 kDa por ESI-MS/MS

A Tabela 6 apresenta os dados obtidos na caracterização dos spots proteicos na região de 20,10 kDa a 30,00 kDa dos géis obtidos no processo de fracionamentos das proteínas presentes nas amostras de tecido muscular e hepático de dourada, pacu e curimatã, onde há presença de mercúrio, as demais proteínas identificadas se encontram no anexo II.

Conforme descrito na Tabela 5 apenas sete spots apresentaram a presença de mercúrio determinada por GFAAS e desses spots duas proteínas foram identificadas a *Triosephosphate isomerase A* em seis spots (DF 1, DF 2, DF 3, DF 4, DF 5 e PF 1), e a *Protein FAM45A* no spot CF 8.

A proteína *Triosephosphate isomerase A* com massa molecular de 26,86 kDa possui 248 aminoácidos em sua estrutura, e quatro sítios de ligação. O primeiro localizado no décimo primeiro aminoácido da estrutura (asparagina – radical hidrófilo) que se liga a substratos e o segundo no décimo terceiro aminoácido (lisina) que também se liga a substratos; o terceiro sítio é eletrofílico e está na posição 95 da estrutura (histidina) e se ativa com a presença de elétrons; o quarto é um sítio receptor de próton e está na posição 165 (ácido glutâmico), é ativado recebendo cátions. Devido a essas características da molécula e presença desses aminoácidos pode formar ligações com o mercúrio originando *metal-binding protein* (Pearson, 1963; Garcia et al., 2006).

A segunda proteína identificada por ESI-MS/MS e que apresenta presença de mercúrio é a *Protein FAM45A*, sua massa molecular 39,67 kDa e composta por 349 aminoácidos, dentre esses aminoácidos encontram-se resíduos de metionina que podem atuar como uma base mole e formar complexos estáveis com íons Hg^{2+} (Pearson, 1963; Garcia et al., 2006). A *Protein FAM45A* devido as suas características estruturais de base mole, podem também formar ligações com o mercúrio originando *metal-binding protein* (Pearson, 1963; Garcia et al., 2006).

As demais proteínas caracterizadas por ESI-MS/MS na região de 20,10 a 30,00 kDa e apresentadas no anexo II, não apresentaram mercúrio nos seus respectivos spots conforme desmonstraram os resultados obtidos nas determinações por GFAAS. As proteínas caracterizadas nos spots proteicos que não apresentaram mercúrio foram as seguintes: *WASH complex subunit CCDC53*; *β -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase*; *lunatic fringe*; *Loss of heterozygosity 12 chromosomal region 1 protein homolog*;

Adenylate kinase isoenzyme 1; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Alcohol dehydrogenase [NADP(+)] A; Synapse differentiation-inducing gene protein 1-like; Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase; 60S ribosomal protein L15; Proteasome subunit alpha type-2; Methyltransferase-like protein 2-A; Hemoglobin subunit β ou A/B.

Observa-se que algumas proteínas possuem ligação com íons metálicos o que favorece sua ligação com átomos de mercúrio, já a maioria das proteínas descritas nos estudos e trabalhos anteriores, e também nesse atual estudo demonstram que a presença de certos aminoácidos em sua estrutura favorecem a ligação com átomos de mercúrio formando ligações do tipo *metal-binding*.

Em todas as condições propostas nesse estudo e nos estudos e trabalhos apresentados várias condições de extração e fracionamento foram utilizadas, porém em nenhuma delas encontrou-se por ESI-MS/MS a presença de metalotioneínas. No entanto, outras proteínas com características semelhantes as metalotioneínas (baixa massa molecular, resíduos de cisteínas e grupos tióis) foram caracterizadas por ESI-MS/MS. Para confirmarmos esses resultados, utilizamos a técnica de shotgun e não foi encontrada nenhuma metalotioneína em nenhum dos tecidos das espécies estudadas.

Tabela 6. Proteínas identificadas por ESI-MS/MS com presença de mercúrio das 3 espécies de estudo.

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	MM ESI	MM teórica Uniprot	Cobertura (%)	Peptídeos sequenciados
DF 1	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	2.281,73	6,92/22,93	27,84	26,86	18,55	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSE TASPEQAQEVHEK MSSRK
DF 2	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	2.120,92	7,07/23,06	27,84	26,86	31,85	DCGIDWVILGHSER VVLAYEPVWAIGTGK GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSE ELAAQADVDFLVGGASLKPEFVDIINAR VIADNVK
DF 3	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1.707,85	7,38/22,93	27,84	26,86	20,16	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSE VVLAYEPVWAIGTGK VIADNVK
DF 4	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1.194,39	7,50/22,93	27,84	26,86	34,27	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK TASPEQAQEVHEK DCGIDWVILGHSE ELAAQADVDFLVGGASLKPEFVDIINAR
DF 5	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	565,27	7,50/21,06	27,84	26,86	17,34	DCGIDWVILGHSER DCGIDWVILGHSE VVLAYEPVWAIGTGK

								GAFTGEISPAMIK
PF 1	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	293,99	4,17/25,67	27,84	26,86	6,05	DCGIDWVILGHSER
								DCGIDWVILGHSERR
								SDLFDVVFVNLDPSEITVSQNAKEAMSMGK
CF 8	Protein FAM45A	FA45A_DANRE	51,36	5,80/25,43	41,30	39,66	18,05	EIGNFIVQAAEDADR
								TKEILSNLMSLADHADNSK
								TWYYITTVEVQEPTVLKK

4.6. Gráficos obtidos através do programa Blast2go

Os gráficos foram construídos levando-se em conta as proteínas que apresentavam presença de mercúrio, unindo os dados obtidos nesse trabalho e nos estudos e trabalhos trazidos nas páginas anteriores.

4.6.1. Tecido hepático de Dourada

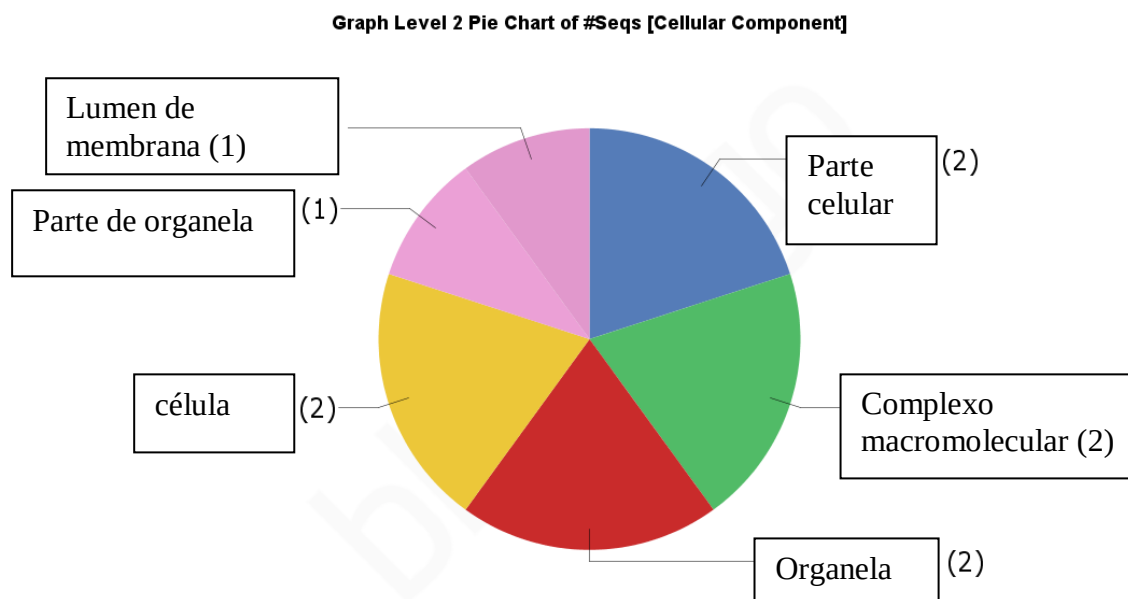


Figura 40: Gráfico dos componentes celulares das proteínas do tecido hepático de Dourada com presença de mercúrio.

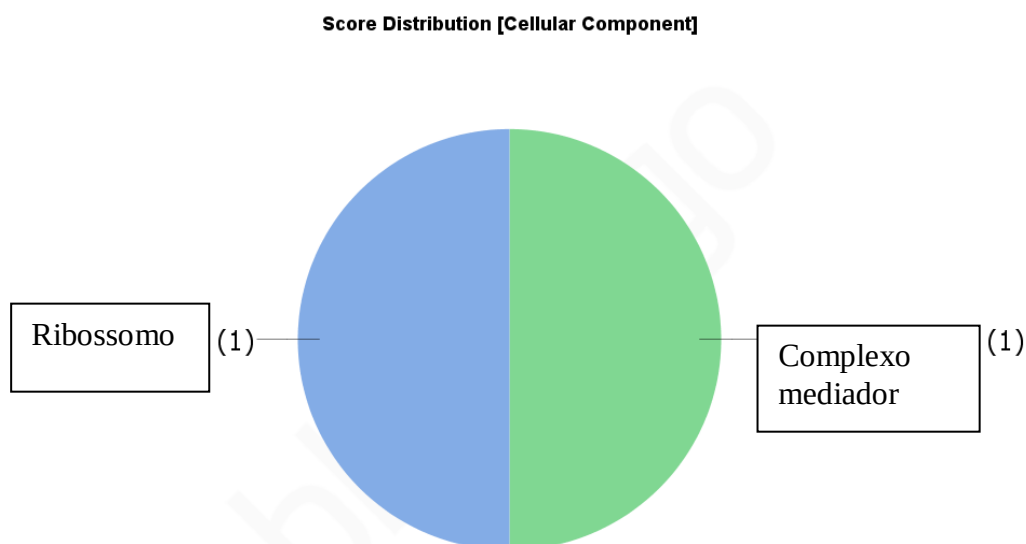


Figura 41: Score da distribuição dos componentes celulares.

Graph Level 2 Pie Chart of #Seqs [Biological Process]

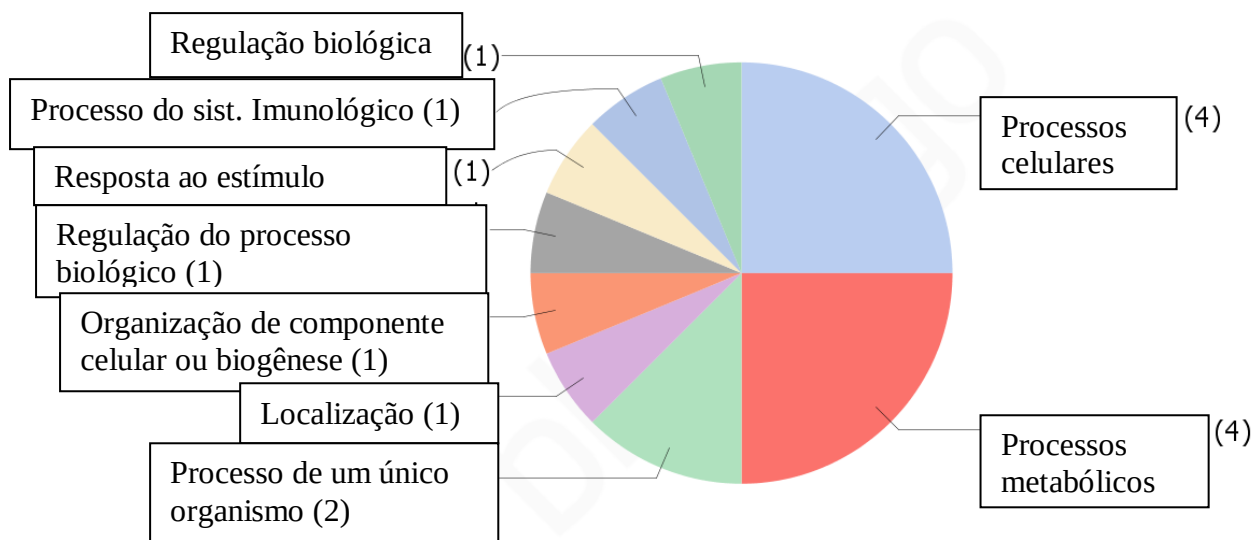


Figura 42: Processos biológicos das proteínas ligadas ao mercúrio

Score Distribution [Biological Process]

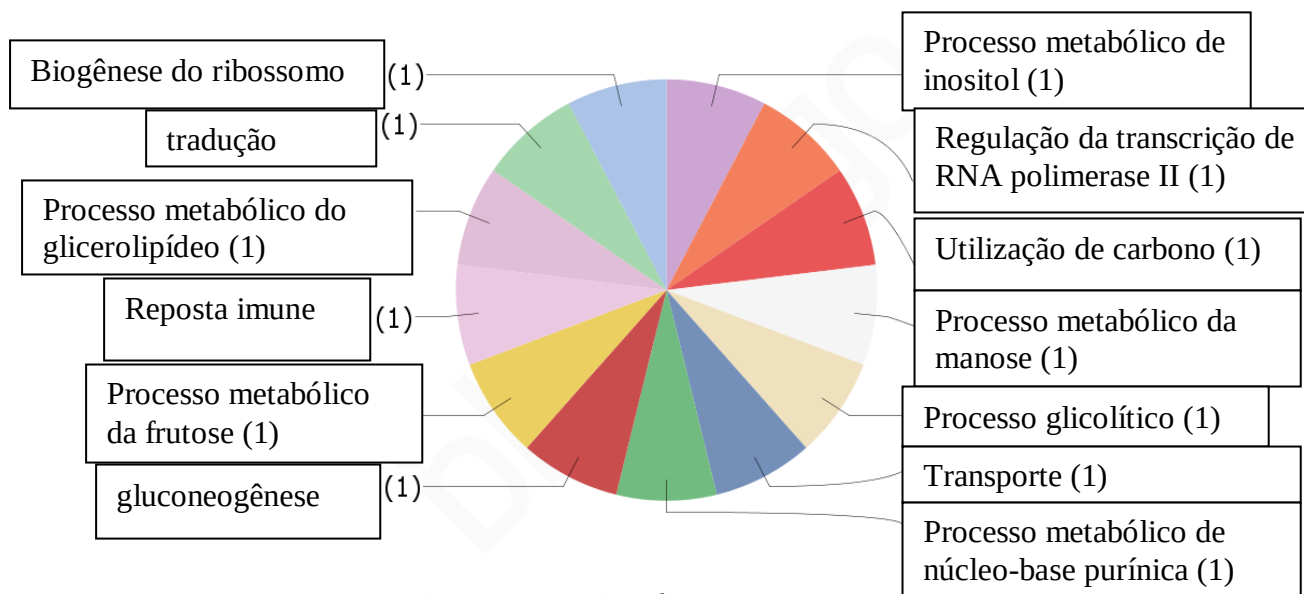


Figura 43: Score dos processos biológicos.

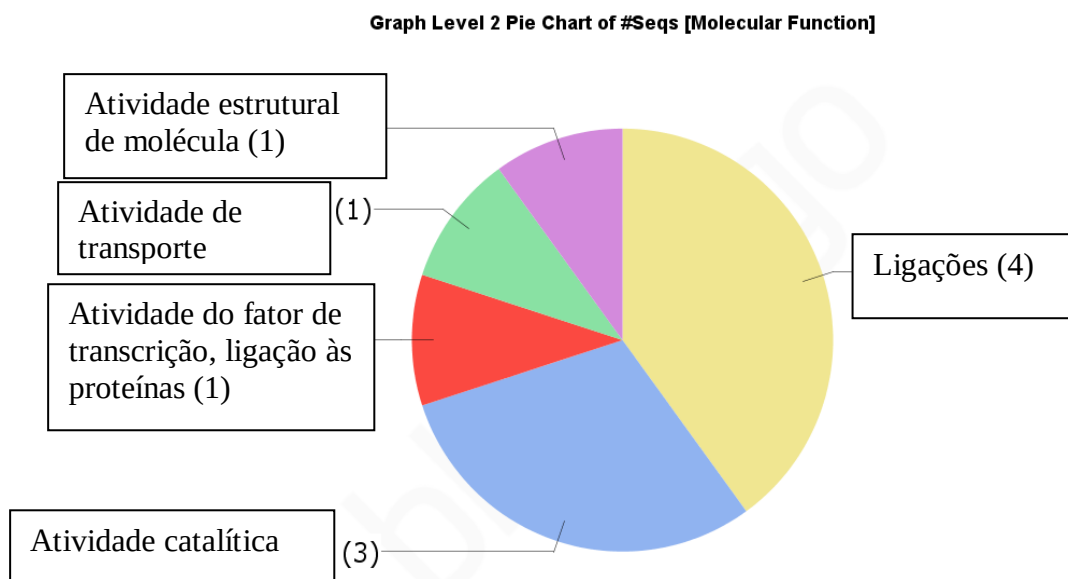


Figura 44: Funções moleculares das proteínas ligadas ao mercúrio.

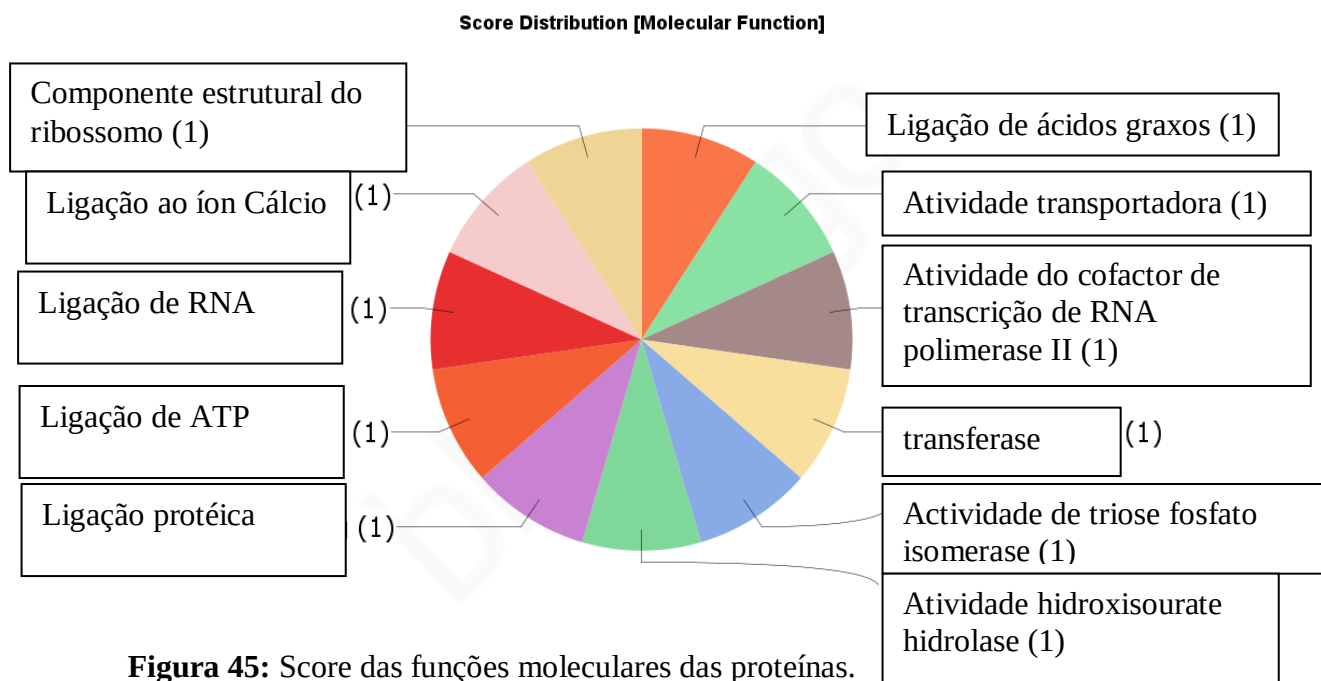


Figura 45: Score das funções moleculares das proteínas.

4.6.2. Tecido hepático de Pacu

Graph Level 2 Pie Chart of #Seqs [Cellular Component]

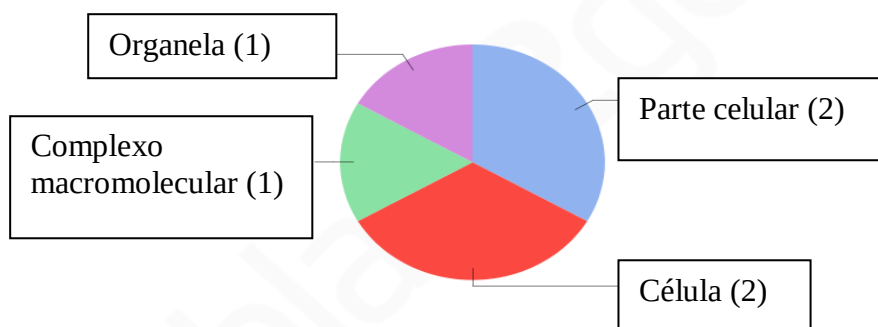


Figura 46: Gráfico dos componentes celulares das proteínas do tecido hepático de Dourada com presença de mercúrio.

Score Distribution [Cellular Component]

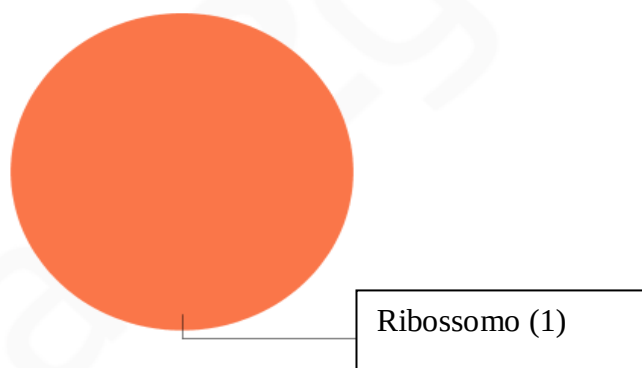


Figura 47: Score do componente celular

Graph Level 2 Pie Chart of #Seqs [Biological Process]

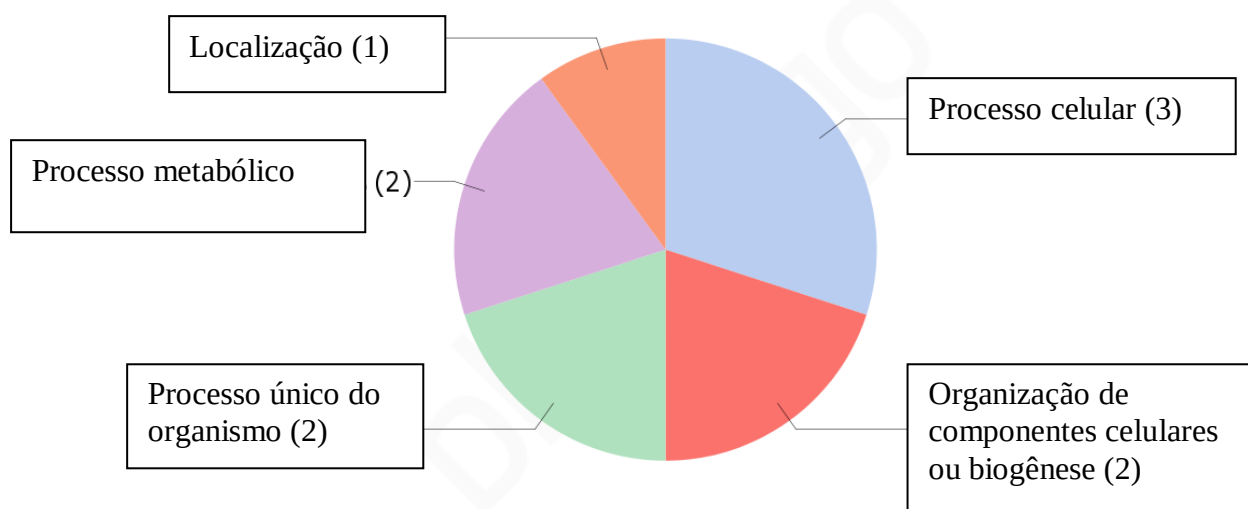


Figura 48: Processos biológicos das proteínas do fígado de pacu com presença de mercúrio.

Score Distribution [Biological Process]

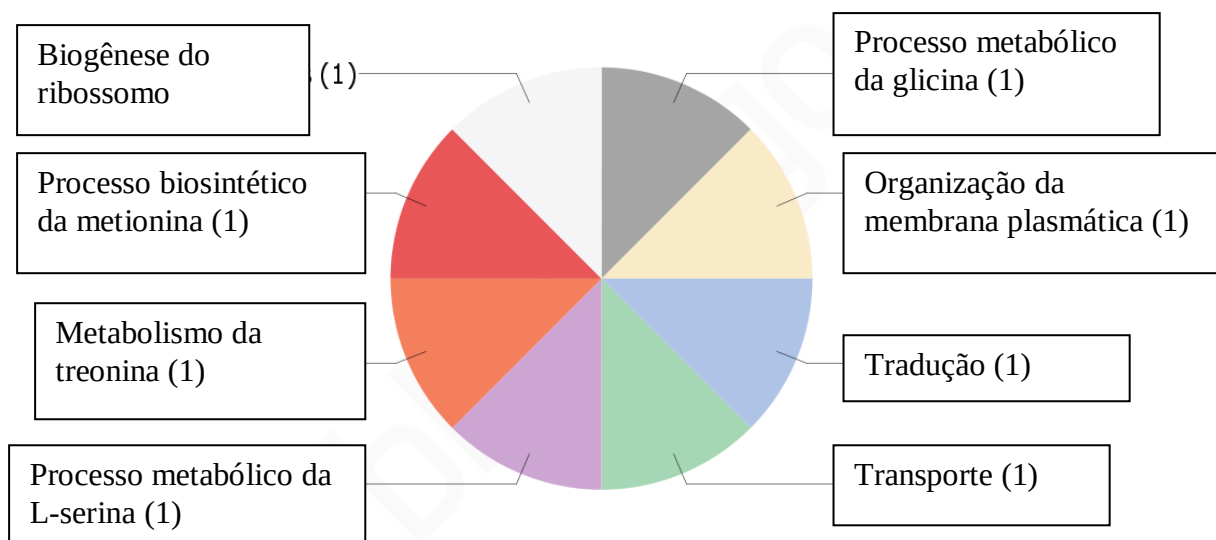


Figura 49: Score do processo biológico das proteínas.

Graph Level 2 Pie Chart of #Seqs [Molecular Function]

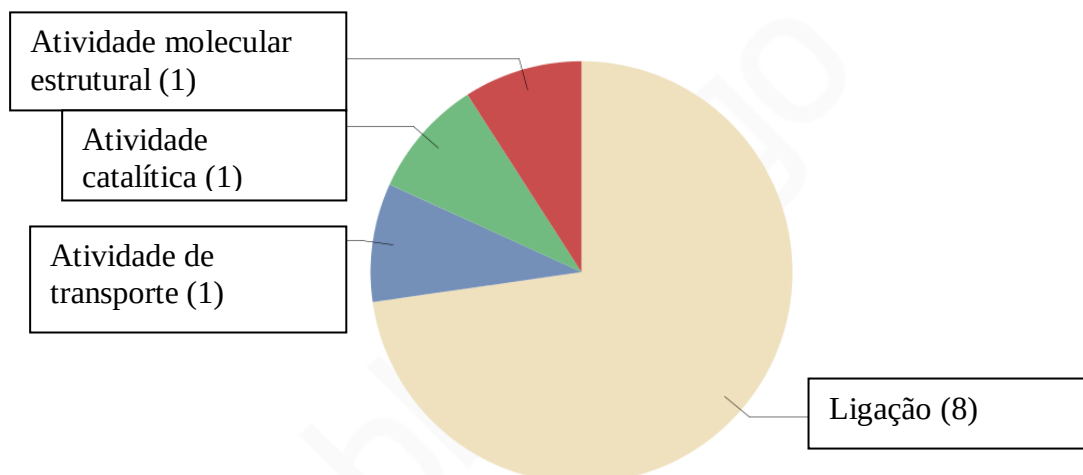


Figura 50: Função molecular das preteínas.

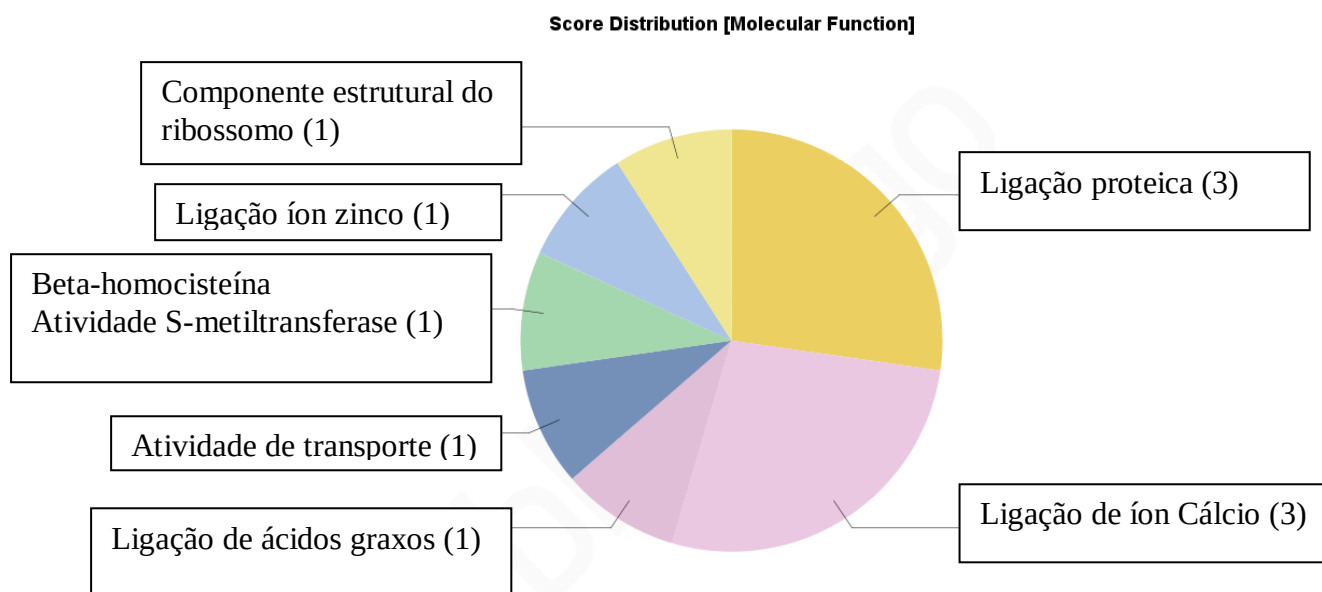


Figura 51: Score da função molecular.

As figuras representantes do tecido hepático de Dourada como as Figuras 40 e 41 mostram a quais componentes celulares as proteínas ligadas ao Hg fazem parte e sua distribuição (Figura 41: Score). Podemos inferir que se esses componentes celulares estão afetados tanto na questão da produção de proteína (ribossomo) e de complexos celulares (mediador de complexos) algumas funções estão prejudicadas, pois quando a proteína se liga ao mercúrio ela perde a sua função. As Figuras 42 e 43 mostram cada proteína envolvida no processo biológico e um score de sua distribuição respectivamente; podemos ver que 25% das proteínas estão relacionadas aos processos celulares e outros 25% a processos metabólicos do fígado da Dourada (Figura 42), já no Score (Figura 43) treze processos biológicos são demonstrados, dentre eles a resposta imune que nos leva a inferir o quanto o mercúrio está interferindo negativamente nos processos biológicos desse órgão. A função molecular das proteínas ligadas ao Hg, e que portanto não estão sendo realizadas, estão representadas nas Figuras 44 e 45; essas figuras justificam o porquê do Hg estar ligado a elas, pois em sua maioria a função é estar ligada a algum composto como o íon Cálcio, RNA, ATP, proteína, ácidos graxos.

Com relação ao tecido hepático de Pacu as proteínas encontradas nesse trabalho ligadas ao mercúrio juntamente com as demais proteínas *metal binding* de demais estudos resultaram nas Figuras 46 a 51; as Figuras 46 e 47 trazem os componentes celulares aos quais as proteínas estão relacionadas sendo duas de partes da célula, outras duas da célula em si,

uma de organela e outra de complexo macromolecular, todas elas distribuídas no ribossomo o que nos leva a inferir que a produção de proteínas está prejudicada nesse órgão. As Figuras 48 e 49 estão relacionadas com os processos biológicos dos quais as proteínas estão ligadas ao Hg, 30% estão relacionadas a processos celulares, 20% a organização de componentes celular ou biogênese, outros 20% a processos metabólicos, dentro da distribuição do score dos processos biológicos (Figura 49) vemos o quanto de vários processos estão afetados pelo não funcionamento dessas proteínas. As Figuras 50 e 51 trazem a função molecular das proteínas e seu score respectivamente, as duas Figuras justificam o porquê do mercúrio se ligar a essas proteínas aproximadamente 73% das proteínas tem função de ligação (Figura 50), o score (Figura 51) confirma o porquê dessa ligação ao Hg demonstrando que das 11 proteínas, três são proteínas ligantes, outras três se ligam ao íon Cálcio, uma ao íon Zinco e outra a ácidos graxos.

4.7. Avaliação do estresse oxidativo

Esta etapa do trabalho é importante, pois demonstra realmente que está ocorrendo uma resposta aos estímulos exógenos estudados, como o mercúrio. Ao se avaliar a resposta das enzimas que combatem ROS pode-se inferir, fisiologicamente, se o organismo está assimilando esta exposição que está sofrendo, produzindo enzimas relacionadas ao estresse oxidativo.

A Tabela 7 apresenta a atividade enzimática de glutathiona peroxidase (GSH-Px) (EC 1.11.1.9), Hidroperóxido de Lipídio (HP) (LOOH), da enzima catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) e da enzima superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1).

Tabela 7. Atividade enzimática e de HP de cada espécie e tecido e [Hg].

Espécie/Enzima	GSH-Px nmol g ⁻¹ Ptn ⁻¹ min ⁻¹	HP nmol g ⁻¹ Ptn ⁻¹ min ⁻¹	CAT nmol g ⁻¹ Ptn ⁻¹ min ⁻¹	SOD nmol g ⁻¹ Ptn ⁻¹ min ⁻¹	[Hg] µg kg ⁻¹
<i>Dourada tecido muscular</i>	72,77	55,94	87,00	63,96	85,00±1,50
<i>Dourada tecido hepático</i>	60,43	47,73	83,91	62,60	1.196,00±16,00
<i>Pacu tecido muscular</i>	70,98	47,21	75,66	62,04	35,00±1,00
<i>Pacu tecido hepático</i>	12,51	85,02	34,92	24,03	635,00±15,00
<i>Curimatã tecido muscular</i>	8,25	70,81	48,67	32,59	63,50±1,50
<i>Curimatã tecido hepático</i>	22,97	67,74	35,96	38,49	740,00±20,00

Para avaliar adequadamente os dados da atividade enzimática nos tecidos muscular e hepático é necessário correlacionar com os dados de concentração de mercúrio total quantificados nesses tecidos das espécies de peixes estudadas essas concentrações estão apresentadas na sexta coluna da tabela 7.

De acordo com Hultberg et al. (2001) a enzima GSH corresponde a primeira linha de defesa quando um animal está exposto ao mercúrio. A GSH-Px reduz a enzima HP que por

sua vez reduz H_2O_2 (ROS) em água. Portanto na segunda e terceira coluna podemos ver essa relação, onde o aumento da atividade enzimática de GSH-Px diminui a atividade de HP e vice-versa. As enzimas CAT e SOD (colunas 4 e 5) acompanham o comportamento da GSH-Px (coluna 2), a CAT também reduz H_2O_2 . Como as medidas de Hg estão em ppb as pequenas variações são compreensíveis.

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.

ANEXO I

Tabela com os spots proteicos do padrão de Metalotioneínas caracterizados por ESI-MS/MS

	protein. Entry	protein. Accession	protein.Description	Protein dataBase Type	protein. score	protein. avgMass	Protein Matched Products	Proteinseq Cover(%)	Protein AutoCurate
Spot 1	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	Regular	515.3669	59241.7947	64	15.47	Green
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	Regular	353.9767	49559.1506	33	10.62	Green
	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	Regular	304.6099	49509.2266	25	11.06	Green
	G1U9T6_RABIT	G1U9T6	Troponin T_ fast skeletal muscle (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=TNNT3 PE=4 SV=1	Regular	298.9175	25481.582	10	7.96	Green
	TNNT3_RABIT	P02641	Troponin T_ fast skeletal muscle OS=Oryctolagus cuniculus GN=TNNT3 PE=1 SV=4	Regular	298.9175	34711.3728	10	5.73	Green
	G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	Regular	279.3552	45973.1284	17	3.99	Green
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	Regular	206.4519	50682.4752	22	6.68	Green
	G1SWB0_RABIT	G1SWB0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT25 PE=4 SV=1	Regular	140.7615	50788.3631	9	2	Green
Spot 2	G1SWB8_RABIT	G1SWB8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT27 PE=4 SV=1	Regular	140.7615	51260.7945	9	1.96	Green
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	Regular	855.3911	59241.7947	92	16.87	Green
	G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	Regular	456.636	65708.7683	28	7.53	Green
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	Regular	361.463	49559.1506	39	10.62	Green
	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	Regular	337.5455	49509.2266	34	13.09	Green
	G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	Regular	247.5824	45973.1284	16	3.99	Green

	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	Regular	214.4007	50682.4752	30	8.69	Green
	G1TAY6_RABIT	G1TAY6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT19 PE=3 SV=1	Regular	183.9282	44683.0173	19	6.25	Green
	G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	Regular	183.9282	86148.3415	22	3.35	Green
	G1SDN2_RABIT	G1SDN2	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT17 PE=3 SV=1	Regular	183.9282	48298.1605	22	5.83	Green
	K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_ type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	Regular	146.7177	46714.8636	13	3.89	Green
	G1SWB0_RABIT	G1SWB0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT25 PE=4 SV=1	Regular	139.9417	50788.3631	9	2	Green
	G1SWB8_RABIT	G1SWB8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT27 PE=4 SV=1	Regular	139.9417	51260.7945	9	1.96	Green
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	Regular	210.2457	59241.7947	36	7.56	Yellow
	G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	Regular	155.6325	65708.7683	17	4.91	Green
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	Regular	139.2667	50682.4752	17	6.24	Yellow
Spot 3	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	Regular	124.8869	49559.1506	18	6.19	Yellow
	G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	Regular	119.6649	86148.3415	16	4.69	Yellow
	K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_ type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	Regular	119.6649	46714.8636	16	8.52	Yellow
Spot 4	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	Regular	721.7393	49509.2266	64	24.83	Green
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	Regular	689.8272	59241.7947	78	13.88	Green
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus	Regular	490.1113	49559.1506	48	11.95	Green

GN=KRT13 PE=3 SV=2

	G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	Regular	436.6606	65708.7683	36	9	Green
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	Regular	429.4333	50682.4752	47	14.25	Green
	G1TAY6_RABIT	G1TAY6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT19 PE=3 SV=1	Regular	379.8722	44683.0173	25	6.25	Green
	G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	Regular	379.8722	86148.3415	30	3.61	Green
	G1SDN2_RABIT	G1SDN2	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT17 PE=3 SV=1	Regular	379.8722	48298.1605	30	6.29	Green
	G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	Regular	375.1459	45973.1284	20	3.99	Green
	K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_ type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	Regular	336.3712	46714.8636	19	3.89	Green
	G1TDN6_RABIT	G1TDN6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT5 PE=3 SV=1	Regular	306.893	63656.6505	33	9.52	Green
	G1SWB0_RABIT	G1SWB0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT25 PE=4 SV=1	Regular	288.3725	50788.3631	13	2	Green
	G1SWB8_RABIT	G1SWB8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT27 PE=4 SV=1	Regular	288.3725	51260.7945	13	1.96	Green
Spot 5	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	Regular	149.7053	59241.7947	43	10.9	Yellow
Spot 6	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	Regular	165.815	59241.7947	35	7.03	Yellow
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	Regular	116.5775	49559.1506	17	5.53	Yellow
Spot 7	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	Regular	1045.082	59241.7947	116	13.88	Green
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	Regular	527.5901	49559.1506	61	10.62	Green

G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	Regular	428.9557	50682.4752	48	14.25	Green
G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	Regular	417.0717	65708.7683	37	11.29	Green
G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	Regular	398.1713	49509.2266	50	18.06	Green
G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	Regular	320.0319	86148.3415	39	7.9	Green
G1TAY6_RABIT	G1TAY6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT19 PE=3 SV=1	Regular	287.7429	44683.0173	27	6.25	Green
G1SDN2_RABIT	G1SDN2	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT17 PE=3 SV=1	Regular	287.7429	48298.1605	30	6.29	Green
K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_ type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	Regular	290.7323	46714.8636	35	19.71	Green
G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	Regular	287.6369	45973.1284	28	3.99	Green
G1TMP1_RABIT	G1TMP1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=LOC100008885 PE=4 SV=1	Regular	181.3962	49365.3273	13	1.62	Green
G1TL31_RABIT	G1TL31	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=LOC100340601 PE=3 SV=1	Regular	181.3962	50598.7026	13	1.61	Green
G1T6X1_RABIT	G1T6X1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT31 PE=3 SV=1	Regular	181.3962	49409.183	13	1.68	Green
G1T4P0_RABIT	G1T4P0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT32 PE=3 SV=1	Regular	181.3962	51985.2971	13	1.57	Green
G1T6X4_RABIT	G1T6X4	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=LOC100343678 PE=3 SV=1	Regular	181.3962	53054.3114	13	1.54	Green
G1T4Q6_RABIT	G1T4Q6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT33B PE=3 SV=1	Regular	181.3962	47935.3771	13	1.73	Green
G1U758_RABIT	G1U758	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT18 PE=3 SV=1	Regular	181.3962	50670.7374	13	1.58	Green
G1SWS0_RABIT	G1SWS0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus	Regular	181.3962	52246.3629	13	1.56	Green

GN=LOC100343422 PE=3 SV=1

Spot 8	G1T4P5_RABIT	G1T4P5	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT35 PE=3 SV=1	Regular	181.3962	52245.3675	13	1.54	Green
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	Regular	263.2363	59241.7947	36	7.56	Green
	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	Regular	211.6544	49509.2266	28	7.67	Green
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	Regular	211.401	50682.4752	25	8.69	Green
	G1TAY6_RABIT	G1TAY6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT19 PE=3 SV=1	Regular	201.0362	44683.0173	17	4	Green
	G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	Regular	201.0362	86148.3415	21	3.61	Green
	G1SDN2_RABIT	G1SDN2	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT17 PE=3 SV=1	Regular	201.0362	48298.1605	21	6.29	Green
Spot 9	K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_ type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	Regular	201.0362	46714.8636	17	3.89	Green
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	Regular	2104.282	59241.7947	140	17.93	Green
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	Regular	1198.428	49559.1506	78	11.95	Green
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	Regular	920.3139	50682.4752	57	8.69	Green
	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	Regular	901.9568	49509.2266	68	19.19	Green
	G1TKH3_RABIT	G1TKH3	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Oryctolagus cuniculus GN=SOD1 PE=3 SV=1	Regular	623.7729	16212.6037	10	6.54	Green
	G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	Regular	611.5447	45973.1284	31	3.99	Green
	G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	Regular	500.6521	65708.7683	38	12.44	Green

G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	Regular	471.7038	86148.3415	37	3.61	Green
G1TAY6_RABIT	G1TAY6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT19 PE=3 SV=1	Regular	470.6822	44683.0173	29	6.25	Green
G1SDN2_RABIT	G1SDN2	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT17 PE=3 SV=1	Regular	470.6822	48298.1605	36	6.29	Green
K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	Regular	403.4654	46714.8636	29	11.19	Green
G1SWB0_RABIT	G1SWB0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT25 PE=4 SV=1	Regular	387.3921	50788.3631	18	2	Green
G1SWB8_RABIT	G1SWB8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT27 PE=4 SV=1	Regular	387.3921	51260.7945	18	1.96	Green
G1TMP1_RABIT	G1TMP1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=LOC100008885 PE=4 SV=1	Regular	224.1526	49365.3273	13	1.62	Green
G1TL31_RABIT	G1TL31	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=LOC100340601 PE=3 SV=1	Regular	224.1526	50598.7026	13	1.61	Green
G1T6X1_RABIT	G1T6X1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT31 PE=3 SV=1	Regular	224.1526	49409.183	13	1.68	Green
G1T4P0_RABIT	G1T4P0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT32 PE=3 SV=1	Regular	224.1526	51985.2971	13	1.57	Green
G1T6X4_RABIT	G1T6X4	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=LOC100343678 PE=3 SV=1	Regular	224.1526	53054.3114	13	1.54	Green
G1T4Q6_RABIT	G1T4Q6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT33B PE=3 SV=1	Regular	224.1526	47935.3771	13	1.73	Green
G1U758_RABIT	G1U758	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT18 PE=3 SV=1	Regular	224.1526	50670.7374	13	1.58	Green
G1SWS0_RABIT	G1SWS0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=LOC100343422 PE=3 SV=1	Regular	224.1526	52246.3629	13	1.56	Green
G1T4P5_RABIT	G1T4P5	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT35 PE=3 SV=1	Regular	224.1526	52245.3675	13	1.54	Green
G1TDN8_RABIT	G1TDN8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus	Regular	183.7841	60364.2297	25	21.5	Green

GN=KRT73 PE=3 SV=1

Spot 10	G1SRX8_RABIT	G1SRX8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=GFAP PE=3 SV=1	Regular	170.6446	49482.7961	30	17.3	Green
	G1SS18_RABIT	G1SS18	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT8 PE=3 SV=1	Regular	159.1737	43444.8617	12	2.94	Green
	G1SPP3_RABIT	G1SPP3	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT4 PE=3 SV=1	Regular	159.1737	65951.3716	11	1.85	Green
	G1SHZ4_RABIT	G1SHZ4	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT7 PE=3 SV=2	Regular	159.1737	41730.8616	11	3.01	Green
	G1TDN6_RABIT	G1TDN6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT5 PE=3 SV=1	Regular	143.5414	63656.6505	44	11.9	Green
	REVERSE5355	REVERSE5355	Reversed Sequence 5355	Reverse	138.7256	52920.9991	11	4.01	Green
	G1TB09_RABIT	G1TB09	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KCTD20 PE=4 SV=1	Regular	96.3445	48646.3348	12	7.64	Yellow
	G1U0K9_RABIT	G1U0K9	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT222 PE=3 SV=1	Regular	91.9084	35150.9061	10	7.12	Green
	G1TE79_RABIT	G1TE79	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=1	Regular	78.2095	50053.8596	14	2.55	Green
	G1T9C9_RABIT	G1T9C9	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=CCM2 PE=4 SV=1	Regular	55.1712	49222.3853	6	3.21	Yellow
	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	Regular	2745.12	18624.4871	70	48.78	Green
	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	Regular	2524.246	18720.643	57	28.66	Green
	G1TC44_RABIT	G1TC44	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus PE=3 SV=1	Regular	2483.398	18684.6258	57	37.8	Green
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	Regular	454.1237	59241.7947	80	16.7	Green
	G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	Regular	291.8872	65708.7683	30	12.27	Green

	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	Regular	212.8118	49559.1506	28	13.72	Green
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	Regular	186.8301	50682.4752	24	6.24	Green
	G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	Regular	111.3469	86148.3415	12	2.14	Green
	K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	Regular	111.3469	46714.8636	12	3.89	Green
	G1TAY6_RABIT	G1TAY6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT19 PE=3 SV=1	Regular	107.4454	44683.0173	11	4	Green
	G1SDN2_RABIT	G1SDN2	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT17 PE=3 SV=1	Regular	107.4454	48298.1605	11	3.73	Green
	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	Regular	107.4454	49509.2266	11	3.61	Green
	G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	Regular	97.1009	45973.1284	7	1.75	Green
	G1SI20_RABIT	G1SI20	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Oryctolagus cuniculus GN=IDH1 PE=3 SV=1	Regular	95.9893	48829.0722	17	14.94	Green
Spot 11	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	Regular	9846.166	18624.4871	122	65.24	Green
	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	Regular	9642.029	18720.643	98	32.93	Green
	G1TC44_RABIT	G1TC44	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus PE=3 SV=1	Regular	5246.1	18684.6258	92	54.27	Green
Spot 12	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	Regular	14290.26	18624.4871	111	48.78	Green
	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	Regular	14157.96	18720.643	101	32.93	Green
	G1TC44_RABIT	G1TC44	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus PE=3 SV=1	Regular	6540.87	18684.6258	79	37.8	Green
Spot 13	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus	Regular	15401.4	18624.4871	120	60.37	Green

cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3

Spot 14	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	Regular	15022.94	18720.643	99	32.93	Green
	G1TC44_RABIT	G1TC44	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus PE=3 SV=1	Regular	9511.501	18684.6258	88	49.39	Green
	G1SDY5_RABIT	G1SDY5	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=YWHAZ PE=3 SV=1	Regular	180.4884	28875.488	17	21.54	Green
	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	Regular	4532.2	18624.4871	37	25	Green
	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	Regular	4524.529	18720.643	35	19.51	Green
	G1TPH4_RABIT	G1TPH4	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=MSRB1 PE=4 SV=1	Regular	780.5851	13642.0573	10	7.09	Green
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	Regular	237.7597	59241.7947	51	11.07	Green
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	Regular	175.4622	49559.1506	22	8.19	Green
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	Regular	127.8581	50682.4752	12	4.23	Green
	G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	Regular	116.4369	45973.1284	13	3.99	Green
Spot 15	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	Regular	116.4369	49509.2266	13	3.61	Green
	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	Regular	1496.712	18720.643	22	10.98	Green
	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	Regular	1496.712	18624.4871	22	10.98	Green
	G1TPH4_RABIT	G1TPH4	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=MSRB1 PE=4 SV=1	Regular	300.7414	13642.0573	7	7.09	Green
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	Regular	185.9896	59241.7947	47	11.07	Yellow

Spot 17	G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	Regular	193.5002	65708.7683	19	4.91	Green
	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	Regular	169.2333	18720.643	9	10.98	Yellow
	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	Regular	169.2333	18624.4871	9	10.98	Yellow

ANEXO II

Tabela com spots proteicos caracterizados por ESI-MS/MS das 3 espécies de estudo sem a presença de mercúrio

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	MM ESI	MM teórica Uniprot	Cobertura (%)	Peptídeos sequenciados
DM 1	WASH complex subunit CCDC53	CCD53_DANRE	118,80	6,49/20,10	22,05	21,57	11,50	MMMEGLDPNLLDTPDAAVPDASK
DM 2	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1.347,88	6,97/23,42	27,84	26,86	22,18	DCGIDWVILGHSER
DM 3	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1.366,50	7,10/23,23	27,84	26,86	33,87	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK TASPEQAQEVHEK ELAAQADVDGFLVGGASLKPEFVDIINAR
DM 4	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	3.353,26	7,37/22,84	27,84	26,86	22,58	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSERR VVLAYEPVWAIGTGK TASPEQAQEVHEK
DM 5	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	3.789,79	7,52/23,60	27,84	26,86	39,52	DCGIDWVILGHSER VVLAYEPVWAIGTGK GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSERR GAFTGEISPAMIKDCGIDWVILGHSER TASPEQAQEVHEK ELAAQADVDGFLVGGASLKPEFVDIINAR HVFGEDELIGQK ILGHSERR
DM 6	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	2.435,26	8,16/22,80	27,84	26,86	28,23	DCGIDWVILGHSER DCGIDWVILGHSERR GAFTGEISPAMIK GAFTGEISPAMIKDCGIDWVILGHSER

								ELAAQADVDGFLVGGASLKPEFVDIINAR HVFGESEDELIGQK ILGHSERR
DM 7	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	323,32	9,53/26,03	27,84	26,86	11,29	DCGIDWVILGHSER DCGIDWVILGHSERR GAFTGEISPAMIKDCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK
DF 6	Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase lunatic fringe	LFNG_DANRE	64,04	6,98/20,66	43,49	41,88	10,16	SLQSLGDSSETDDGAQPEQNAKK IGSHAINTNCSAAHSR IGSHAINTNCSAAHSRQALSCK
DF 7	WASH complex subunit CCDC53	CCD53_DANRE	80,56	6,41/20,15	22,05	21,57	11,50	MMMEGLDPNLLDTPDAAVPDASK
PM 1	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	796,11	7,04/22,97	27,84	26,86	11,29	DCGIDWVILGHSER DCGIDWVILGHSERR GAFTGEISPAMIK GAFTGEISPAMIKDCGIDWVILGHSER
PM 2	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1.452,61	7,47/22,72	27,84	26,86	11,29	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSERR GAFTGEISPAMIKDCGIDWVILGHSER
PF 2	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	133,46	5,14/27,93	27,84	26,86	5,65	DCGIDWVILGHSER
PF 3	Loss of heterozygosity 12 chromosomal region 1 protein homolog	L12R1_DANRE	201,02	6,06/21,92	24,30	23,54	6,76	IQMGIDQTVPLMER YAKYAEQIQK
PF 4	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	796,96	7,10/25,80	27,84	26,86	11,29	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSERR
PF 5	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	977,47	7,47/24,35	27,84	26,86	15,73	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSERR VIADNVKDWTR

CM 1	Adenylate kinase isoenzyme 1	KAD1_CYPKA	1.955,68	5,75/24,00	22,49	21,49	38,14	GYLIDGYPR
								YGYTHLSSGDLLR
								QLQAIMQK
								GELVPLDTVLDMIK
								AEVASGSR
								GYLIDGYPREVK
CM 2	Adenylate kinase isoenzyme 1	KAD1_CYPKA	739,13	5,92/23,30	22,49	21,49	18,04	IVFVVGPGSGKGTQCEK
								DGYPR
								IDGYPR
								LIDGYPR
								GYLIDGY
								GYLI
CM 3	Adenylate kinase isoenzyme 1	KAD1_CYPKA	646,47	6,15/23,43	22,49	21,49	11,34	GYPR
								GYLIDGYPR
								YGYTHLSSGDLLR
								GYLIDGYPR
								QLQAIMQK
								GQTSGRSDDNEETIK
CM 4	Adenylate kinase isoenzyme 1	KAD1_CYPKA	3.858,73	7,60/23,75	22,49	21,49	21,32	ADVSKGYLIDGYPR
								GYLIDGYPR
								YGYTHLSSGDLLR
								GYLIDGYPR
								QLQAIMQK
								GELVPLDTVLDMIK
CM 5	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	2.550,84	8,03/25,88	27,84	26,86	7,26	AEVASGSR
								DGYPR
								GYLIDGY
								GAFTGEISPAMIK
								MSSRK
								GAFTGEISPAMIK
CM 6	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	398,76	8,14/25,88	27,84	26,86	5,24	VIADNVKDWTR

CM 7	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1.107,91	8,66/26,16	27,84	26,86	16,13	GAFTGEISPAMIK ANVSDAVADSVR TASPEQAQEVHEKLR
CM 8	Adenylate kinase isoenzyme 1	KAD1_CYPKA	980,54	8,86/24,20	22,49	21,49	15,46	GYLIDGYPR YGYTHLSSGDLLR QLQAIMQK DLLR IDGYPR
CM 9	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	466,03	8,92/26,16	28,11	26,83	5,24	GAFTGEISPAMIK
CM 10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	288,33	9,72/28,51	37,13	35,78	8,41	VPTPNVSVVDLTVR LVTWYDNEFGYSNR
CM 11	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	265,03	7,40/26,16	28,11	26,83	5,24	GAFTGEISPAMIK
CM 12	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	309,17	7,00/26,66	28,11	26,83	5,24	GAFTGEISPAMIK
CF 1	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1.570,24	7,99/24,27	27,84	26,86	27,82	GAFTGEISPAMIK EAGTTEDVVFEQTK VIADNVKDWTR DCGIDWVILGHSERR GWLRRANVSDAVADSVR WVILGHSERR
CF 2	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)] A	A1A1A_DANRE	467,87	7,67/23,17	37,88	36,76	8,95	QAVLAALDCGYR DTWAAMEK RDDIFVTSK
CF 3	Synapse differentiation-inducing gene protein 1-like	SYN1L_DANRE	59,88	6,65/24,72	28,83	27,81	6,59	DKEVVVETPSTEDPQAK
CF 4	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	DECR2_DANRE	140,09	6,62/23,60	32,79	31,99	7,67	VNTVAPGPISGTEGYR IAEVLMR
CF 5	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA	DECR2_DANRE	87,59	6,48/24,72	32,79	31,99	11,67	VNTVAPGPISGTEGYR LGGSHAETAGAFHSIPLQR

	reductase							VNTVAPGPISGTEGYRR DHGGSIVNISATLGYR
CF 6	60S ribosomal protein L15	RL15_CARAU	74,81	6,27/24,72	24,92	23,99	4,41	NPDTQWITK GATYGKPVHHGVNQIK NTLQLHRYR
CF 7	Proteasome subunit alpha type-2	PSA2_CARAU	864,94	6,16/24,40	26,54	25,88	17,09	LAQQYFLVYQPIPTGQLVQR DYLAIA ASNGVVLATEKK SYVNGKTFLEK
CF 9	Methyltransferase-like protein 2-A	MEL2A_DANRE	54,20	5,64/24,72	41,60	40,49	12,18	VQENSQPLPAEK AAPVVAADSPVIENMPETAGGATENSAEAQK
CF 10	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	880,06	8,70/24,28	27,84	26,86	16,94	GAFTGEISPAMIK LEEREAGTTEDVVFEQTK VIADNVKDWTR
CF 11	Hemoglobin subunit alpha	HBA_ELEEL	1.898,87	8,71/25,43	15,86	15,34	7,75	ADDIGAEAFGR

6. Atividades desenvolvidas

6.1. Disciplinas Cursadas

- **Biologia do Músculo Estriado Esquelético**, 1º semestre/2014, Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada/UNESP, Botucatu/SP. 60 h. Conceito A, freq: 100%
- **Biossensores: Definição e aplicações**, 1º semestre/2014, Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada/UNESP, Botucatu/SP. 60 h. Conceito A, freq: 85%
- **Carcinogênese Experimental**, 1º semestre/2014, Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada/UNESP, Botucatu/SP. 45 h. Conceito A, freq: 100%.
- **Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada**, 1º semestre/2014, Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada/UNESP, Botucatu/SP. 30 h. Conceito A, freq: 92,3%
- **O cientista e o professor universitário**, 1º semestre 2015, Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada/UNESP, Botucatu/SP. 30h. Conc. A. freq 100%

6.2. Formação complementar

- **2014** - Métodos para caracterização de Proteínas. (Carga horária: 8h). Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, IBB, Brasil.
- **2015** - GE DAY UNESP Botucatu. (Carga horária: 8h). Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, IBB, Brasil.

6.3. Artigos Publicados

1. DOS SANTOS, FELIPE ANDRÉ ; CAVECCI, BRUNA ; VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA ; FRANZINI, VANESSA PEZZA ; SANTOS, ADEMIR ; DE LIMA LEITE, ALINE ; BUZALAF, MARÍLIA AFONSO RABELO ; ZARA, LUIZ FABRÍCIO ; DE MAGALHÃES PADILHA, PEDRO . A Metalloproteomics Study on the Association of Mercury With Breast Milk in Samples From Lactating Women in the Amazon Region of Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **JCR**, v. xx, p. xx, 2015.

Arch Environ Contam Toxicol
DOI 10.1007/s00244-015-0161-8



A Metalloproteomics Study on the Association of Mercury With Breast Milk in Samples From Lactating Women in the Amazon Region of Brazil

Felipe André dos Santos¹ · Bruna Cavecci² · José Cavalcante Souza Vieira² ·
Vanessa Pezza Franzini³ · Ademir Santos³ · Aline de Lima Leite⁴ ·
Marília Afonso Rabelo Buzalaf⁴ · Luiz Fabrício Zara⁵ · Pedro de Magalhães Padilha²

Received: 12 December 2014 / Accepted: 4 May 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract This study aimed to identify metalloproteins that lose their metal ions in the presence of mercury (Hg) and bind to Hg in breast milk samples collected from the riverine population of the Madeira River, a tributary of the Amazon River. Initially, total Hg was determined from the hair of lactating women to identify individuals who were contaminated followed by a proteomic analysis of breast milk samples through two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis after acetone precipitation. The presence of Hg in the obtained protein spots was determined by cold vapor atomic absorption spectrometry and cold vapor atomic fluorescence spectrometry. These determinations indicated the presence of Hg in one protein spot, which was then characterized through electrospray ionization tandem mass spectrometry. Based on searches in the UniProt database, this protein spot was identified as lysozyme C.

The development of a hydroelectric complex on the Madeira River has led to scientific discussions about the possible remobilization and bioavailability of mercurial species in reservoirs in the Amazon region. Studies in several Brazilian reservoirs have shown that the mercury (Hg) present in suspended particulate matter, sediments, and plankton occurs mainly in its inorganic form. This form is primarily found at the origin (upstream) of the reservoir with an increasing concentration of the organic form observed during the course of time with greater levels in the deep-water areas near the dam walls. The Hg contamination present in the Madeira River basin constitutes a socio-environmental problem for the Amazon, and, in this respect, the basin can be considered to be a natural laboratory where the results obtained can serve as a reference for the entire region (Bastos et al. 2009).

The Hg contamination introduced into the Amazon from the 1980s to the mid-1990s due to gold-mining activities and its potential contamination is a topic of discussion regarding the risk to society (Bastos et al. 2009; Guimarães et al. 1999). The high Hg levels found in the soil, sediment, fish, and human residents of the Amazon region were initially attributed to this mining activity. Recent studies have shown that the Hg concentrations observed during the gold rush in the Amazon region are similar to the concentrations found at present (Franzini and Jardim 2001). However, regardless of the source of contamination, studies aimed at clarifying the mechanisms of Hg toxicity are essential for the socio-environmental development of the Amazon region (Bastos et al. 2009; Guimarães et al. 1999).

Organic Hg is the most toxic form of Hg and causes the most harmful effects on human health, most likely due to its slow elimination. The central nervous system is the main target of this organic compound, which mainly affects specific areas of the brain such as the cerebellum and

✉ Bruna Cavecci
brunacavecci@gmail.com

¹ Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul (INQU/UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

² Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Bioscience, São Paulo State University (IB/UNESP), Botucatu, São Paulo 13618-970, Brazil

³ Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, São Paulo State University (IQ/UNESP), Araraquã, São Paulo, Brazil

⁴ Department of Biochemistry, Bauri Dental School, University of São Paulo (FOB/USP), Bauri, São Paulo, Brazil

⁵ Planaltina Campus, University of Brasília (UnB), Planaltina, Distrito Federal, Brazil

Published online: 16 May 2015

Springer

2. VIEIRA, JOSÉ C. S. ; CAVECCI, BRUNA ; QUEIROZ, JOÃO V. ; BRAGA, CAMILA P. ; PADILHA, CILENE C. F. ; LEITE, ALINE L. ; FIGUEIREDO, WLLYANE S. ; BUZALAF, MARÍLIA A. R. ; ZARA, LUIZ F. ; PADILHA, PEDRO M. . Determination of the Mercury Fraction Linked to Protein of Muscle and Liver Tissue of Tucunaré (*Cichla* spp.) from the Amazon Region of Brazil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **JCR**, v. xx, p. xx, 2015.

Arch Environ Contam Toxicol
DOI 10.1007/s00244-015-0160-9



Determination of the Mercury Fraction Linked to Protein of Muscle and Liver Tissue of Tucunaré (*Cichla* spp.) from the Amazon Region of Brazil

José C. S. Vieira¹ · Bruna Cavecci¹ · João V. Queiroz² · Camila P. Braga¹ · Cílene C. F. Padilha¹ · Aline L. Leite³ · Wilyane S. Figueiredo⁴ · Marília A. R. Buzalaf¹ · Luiz F. Zara⁴ · Pedro M. Padilha¹

Received: 22 January 2015 / Accepted: 2 May 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract This study used metalloproteomic techniques to characterize mercury (Hg)-bound proteins in the muscle and liver tissue of Tucunaré (*Cichla* spp.) collected at the Jirau Hydroelectric Power Plant in Madeira River Basin, Brazil. The proteome of the muscle and liver tissue was obtained after two steps of fractional precipitation and separating the proteins by 2-D polyacrylamide gel electrophoresis. Hg was identified and quantified in the protein spots by graphite furnace atomic absorption spectrometry after acid mineralization in an ultrasound bath. Hg with a molecular weight <20 kDa and a concentration between 13.30 and 33.40 mg g⁻¹ was found in the protein spots. These protein spots were characterized by electrospray ionization tandem mass spectrometry after trypsin digestion. From a total of 12 analyzed spots, seven proteins showing Hg biomarker characteristics were identified: parvalbumin and its isoforms, ubiquitin-40S ribosomal protein S27a, zinc (Zn) finger and BTB domain-containing protein 24, and dual-specificity protein phosphatase 22-B.

Gold-mining in the Amazon region peaked in the 1980s–1990s when an average of 200 tons of mercury (Hg)/y was released into the river and lake bottoms. The Rio Madeira basin was one of the most affected areas (Dorea 2003; Moraes et al. 2013). The river communities that use fish as an essential part of their protein diet were exposed to high levels of Hg through the consumption of contaminated fish (Dorea 2003). Hg can accumulate in the tissues of organisms that compose the aquatic ecosystems and, consequently, in the entire food chain, thus increasing its levels in the apex predators (Harris and Snodgrass 1993; Nevado et al. 2010). According to Weiner and Spry (1996), >75 % of the Hg accumulated in freshwater fish tissue is found in its organic form, methylmercury, which is more likely to be absorbed from the water and diet than inorganic Hg (Bloom 1992; Ikegura and Akagi 2003). Methylation of forms of inorganic Hg is performed mainly by anaerobic bacteria stimulated by the large amounts of organic carbon in flooded plants and land soils (Hsu-Kim et al. 2013).

In recent years, large areas of the Brazilian Amazon have been flooded due to the increase in the construction of hydroelectric dams and plants in Amazonian river basins. This flooding has led to scientific discussions on the possible remobilization and bioavailability of Hg species that have previously been thought to be inert (Mailman et al. 2006; Braga et al. 2015).

When bioaccumulated in an organism, Hg can bind to metalloproteins, thus displacing atoms of elements essential to the proper function of the metalloproteins. This binding process can inactivate enzymes and alter cell activity resulting in the loss of skin sensitivity and muscle coordination, deafness, and death (Bakir et al. 1973; Clarkson 1990; Pollard and Hultman 1997; Jesus and Carvalho 2008). The aim of our research group was to perform a metalloproteomic study (Santos et al. 2011;

✉ Bruna Cavecci
brunacavecci@gmail.com

¹ Department of Chemistry and Biochemistry, Bioscience Institute – UNESP, São Paulo State University, Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo 18618-970, Brazil

² College of Veterinary and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil

³ Department of Biological Science, University of São Paulo, Bauri, São Paulo, Brazil

⁴ College of Planaltina, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

3. CAVECCI, B.; LIMA, PAULA M. ; VIEIRA, JOSÉ C. S. ; BRAGA, CAMILA P. ; QUEIROZ, J. V. ; BITTARELLO, A. C. ; PADILHA, PEDRO M. . USE OF ULTRASONIC EXTRACTION IN DETERMINING APPARENT DIGESTIBILITY IN FISH FEED. *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. xx, p. xx-xx, 2015.

Food Measure
DOI 10.1007/s11694-015-9269-9



ORIGINAL PAPER

Use of ultrasonic extraction in determining apparent digestibility in fish feed

Bruna Cavecci¹ · Paula Monteiro de Lima² · José Cavalcante Souza Vieira¹ · Camila Pereira Braga¹ · João Vitor de Queiroz² · Alis Correia Bittarello² · Pedro Magalhães de Padilha¹

Received: 12 December 2014 / Accepted: 30 July 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract The feeds supplied to farmed fish should be rich in protein and minerals, such as animal protein, but more expensive alternatives comprising vegetable protein have emerged in recent years. However, the minerals essential to the proper development of fish must be assessed. To determine whether the minerals supplied in the diet are being fully exploited, the equation of the apparent digestibility coefficient is typically used with an external marker such as chromium. Moreover, the concentrations of the metals of interest are usually obtained using an acid digestion in the digester block; however, this digestion is harmful to both the analyst and the environment. An alternative to this digestion is described in this work. Four types of feeds were made with different types of protein substrates.

Keywords *Oreochromis niloticus* · Nutrients · Extraction of minerals · Aquaculture

Introduction

Aquaculture has grown more rapidly worldwide than any other sector of animal production. In 2006, FAO data [1] showed that this increase in production, including that of

fish, crustaceans, and molluscs, was only 3.9 % in 1970 but 33.0 % in 2005.

The growth of the sector has been accompanied by increased demand for feed [2]. Thus, the development of ingredients that promote technological and sustainable fish production without compromising production performance will be a priority in the future [3].

The replacement of certain agro-industry products and by-products as ingredients in fish diets by other products as yeast, rapeseed meal, and pinion tannin, was spurred by studies on the nutrient digestibility of these foods; this replacement has also been presented as an economically viable alternative to using agro-industry products [4, 5].

We use the so-called fecal indicators to determine the digestibility of fish feed. Chromium (III) oxide (Cr_2O_3) is the most widely used indicator in studies on digestibility. It is completely indigestible, non-absorbable, and has no pharmacological effect on, and passes freely through, the digestive tract. The percentage of Cr_2O_3 in fish feces and in the initially mixed diet can be compared; the coefficient of total or partial digestibility of the nutrients metabolized can then be estimated on the basis of this comparison [6, 7].

As such, this study aimed to develop a new methodology that enables the safe measurement of inorganic nutrients and chromium (III) oxide, and comparisons were made with conventional methodology.

Materials and methods

Samples

Samples of fish feeds were developed by the Fish Nutrition Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences/UNESP-Botucatu (Aquamini) and formulated from

✉ Bruna Cavecci
brunacavecci@gmail.com

¹ Present Address: Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Rubião Junior District, Botucatu, São Paulo 13618-970, Brazil

² College of Veterinary and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil

4. DE LIMA, PAULA MONTEIRO ; CAVECCI, BRUNA ; ROLDAN, PAULO DOS SANTOS ; BRAGA, CAMILA PEREIRA ; PADILHA, CILENE DO CARMO FEDERICI ; PEZZATO, LUIZ EDIVALDO ; PADILHA, PEDRO DE MAGALHÃES . Zinc determination in samples fish by GFAAS using acid digestion in an ultrasound bath. Journal of Food Measurement and Characterization, v. xx, p. xx, 2015.

Food Measure
DOI 10.1007/s11694-015-9283-y



ORIGINAL PAPER

Zinc determination in samples fish by GFAAS using acid digestion in an ultrasound bath

Paula Monteiro de Lima¹ · Bruna Cavecci² · Paulo dos Santos Roldan³ ·
Camila Pereira Braga² · Cílene do Carmo Federici Padilha² · Luiz Edivaldo Pezzato¹ ·
Pedro de Magalhães Padilha^{1,2}

Received: 27 March 2015 / Accepted: 19 October 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract The aim of this paper was to determine the zinc concentrations in muscle samples of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) produced in aquaculture and fed diets containing inorganic and organic zinc sources. In the sample preparation step, the samples were lyophilized and ground cryogenically to produce particles smaller than 60 µm. The zinc extraction was conducted by acid mineralization using concentrated nitric acid and hydrogen peroxide in a thermostatically controlled ultrasonic bath reactor. The zinc determinations were performed by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry at a drying temperature of 90–250 °C, pyrolysis temperature of 1400 °C, atomization temperature of 2400 °C, and cleaning temperature of 2800 °C. Niobium nitrate was used as a chemical modifier co-injected with the samples, and tungsten was employed as a permanent modifier. Among the muscle tissue samples of Nile tilapia that were analyzed, zinc concentrations were determined in the range of 3.70–19.00 mg kg⁻¹ (LOD 0.012 µg L⁻¹ and LOQ 0.041 µg L⁻¹). The accuracy and precision of the proposed method of zinc determination was validated using the DORM-certified standard Fish Protein 4 NRC.

Keywords Chemical modifier · GFAAS · Zinc · Fish

Introduction

The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is quite a versatile species of fish in fish farming because it is amenable to both extensive farming without any technology employed, and high-tech production using a breeding system in cages with full rations. In addition, this fish is well-appreciated by the filleting industry, thanks to its organoleptic qualities and the absence of spines on the “Y” in your file [1]. Due to its potential for aquaculture, the distribution of tilapia has expanded in the last 50 years. Because it is a species suitable for subsistence fish farming in developing countries and because of its importance in aquaculture many aspects of nutrition of this species have been investigated [2]. There has been a considerable increase in tilapia production in Brazil in recent years. This increase has led researchers working in aquaculture to develop their knowledge of the related behavior, physiology, genetics and nutrition of this species [1, 3, 4].

There is a consensus in the scientific community regarding the fundamental importance of metal ions to organisms. These ions are essential structural components and are active in many vital processes. The ions can act as signaling agents, such as catalysts, or alter gene expression [5]. By considering their proportions and amounts in the body tissue of animals, the metal ions are classified as macro elements (elements that the body needs in large amounts, concentration range in percent) and trace elements (elements that the body needs in smaller quantities, concentration range in mg kg⁻¹ and/or µg kg⁻¹) [5–7]. Calcium, phosphorus, magnesium, potassium, sodium, chlorine and sulfur are considered to be essential macroelements, and copper, cobalt, iron, iodine, manganese, selenium and zinc are considered to be essential trace elements [5, 6].

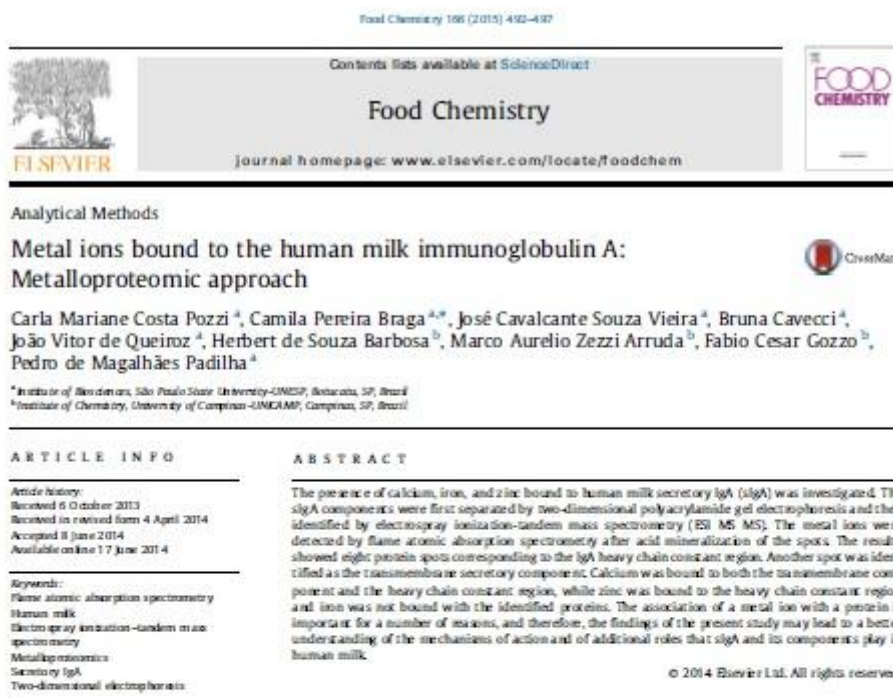
✉ Pedro de Magalhães Padilha
brucavinci@gmail.com

¹ College of Veterinary and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil

² Department of Chemistry and Biochemistry, Bioscience Institute, São Paulo State University (UNESP), Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo 13618-970, Brazil

³ Federal University of Alagoas - Institute of Chemistry and Biotechnology, Maceió, Alagoas, Brazil

5. POZZI, CARLA MARIANE COSTA ; BRAGA, CAMILA PEREIRA ; VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA ; CAVECCI, BRUNA ; QUEIROZ, JOÃO VITOR DE ; BARBOSA, HERBERT DE SOUZA ; ARRUDA, MARCO AURELIO ZEZI ; GOZZO, FABIO CESAR ; PADILHA, PEDRO DE MAGALHÃES . Metal ions bound to the human milk immunoglobulin A: metalloproteomic approach. Food Chemistry **JCR**, p. 492-497, 2014.



1. Introduction

There increased appreciation of feeding human milk in recent years, because composition promote optimizing infant growth and healthy development (Ballard & Morrow, 2013 and Innis, 2014). Breast milk provides all nutrients, vitamins, and minerals that newborns need for growth during the first six months of life, and no other fluids or food are necessary; therefore exclusive human milk feeding for the first 6 months of life, with continued breastfeeding for 1–2 years of life or longer, is recognized as the normative standard for infant feeding (World Health Organization, 2003 and Ballard & Morrow, 2013). Moreover, breast milk contains antibodies and many protective factors that assist in fighting diseases (WHO, 2009).

The most abundant proteins of human milk are casein, α -lactalbumin, lactoferrin, secretory IgA (sIgA), lysozyme, and serum albumin. The predominant antibody in breast milk is the secretory immunoglobulin A (sIgA) (>90%) (Lönnertal, 2010 and

Newburg, 2005). Each monomer of the 420-kDa dimeric immunoglobulin sIgA consists of two light chains, which are the same for all immunoglobulin classes, and a heavy chain known as the alpha chain, which has a molecular mass of approximately 60 kDa. The heavy chain consists of four domains: one variable and three constant domains. The two monomeric portions are held together by two polypeptides, a protein known as the "J chain" and the secretory component. The secretory component protects sIgA from being degraded by proteolytic enzymes, allowing its survival in the gastrointestinal tract and enabling it to combat infectious agents (Kerr, 1990; Lönnertal, 2003; Rojas & Apodaca, 2002 and Newburg, 2005). When the child is breastfed, sIgA, which is resistant to digestion, accumulates in the intestine and prevents binding and invasion by bacteria, viruses, parasites, and toxins in the mucosal surfaces (Newburg & Walker, 2007).

Many proteins require a metal ion to perform their catalytic activities, stabilize their tertiary or quaternary structures and/or promote redox reactions (Mounicou, Szpunar, & Lobinski, 2009). In milk, two examples of proteins that utilize metals are serum albumin, which contributes to the bioavailability of zinc (Blindauer et al., 2009; Lönnertal, Hoffman, & Hurley, 1982 and Farali et al., 2012), and lactoferrin. When bound to iron, lactoferrin helps fight pathogens by depriving them of an essential nutrient

* Corresponding author. Address: Institute of Biociências, Department of Chemistry and Biochemistry, São Paulo State University-UNESP, Distrito de Rubião Júnior, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil. Tel.: +55 (14) 3880 0909; fax: +55 (14) 3880 0573. E-mail addresses: br.aga_caf@ibb.unesp.br, br.aga_caf@ibb.unesp.br (C.P. Braga).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.040>
0304-4146/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

6. CAVECCI, BRUNA ; LIMA, PAULA M. DE ; QUEIROZ, JOÃO V. DE ; BRAGA, CAMILA P. ; PADILHA, CILENE C. F. ; LEITE, ALINE L. ; BUZALAF, MARÍLIA A. R. ; PEZZATO, LUIZ E. ; PADILHA, PEDRO M. . Metalloproteomic Profile Determination of Muscle Samples from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Using AAS and ESI-MS/MS after 2D-PAGE Separation. Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso) JCR, v. xx, p. 1-8, 2014.

Article

<http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140260>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 36, No. 2, 239-246, 2015.
Printed in Brazil - ©2015 Sociedade Brasileira de Química
0103-5053/2015 \$6.00+0.00



Metalloproteomic Profile Determination of Muscle Samples from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Using AAS and ESI-MS/MS after 2D-PAGE Separation

Bruna Cavecci,^a Paula M. de Lima,^a João V. de Queiroz,^a Camila P. Braga,^b Cilene C. F. Padilha,^b Aline L. Leite,^c Marília A. R. Buzalaf,^c Luiz E. Pezzato^a and Pedro M. Padilha^{a,b}

^aCollege of Veterinary and Animal Science, ^bDepartment of Chemistry and Biochemistry, Institute of Bioscience and ^cDepartment of Biological Science, University of São Paulo State University (UNESP), 18618-970 Botucatu-SP, Brazil

This study evaluated the metalloproteomic profile of muscle tissue samples from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) methods was used for protein fractionation and identification based on image analysis. Determination of Ca, Cu, Fe, Mn and Zn was performed in the protein spots by flame and/or graphite furnace atomic absorption spectrometry (FAAS, GFAAS), the protein spots were characterized by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). FAAS and GFAAS determinations have indicated the presence of calcium in seven protein spots, iron in only one spot, manganese in six spots, and zinc in two spots. Of the seventeen protein spots where the presence of metal ions was detected, ten were characterized by ESI-MS/MS.

Keywords: metalloproteins, ESI-MS/MS, 2D-PAGE

Introduction

There is consensus in the literature about the importance of metal ions as structural and functional components of fish. From the structural viewpoint, calcium, copper, iron, manganese and zinc are present in metallothioneins. The catalytic role of these ions in enzymatic systems is essential.¹

Although metal ions constitute only a small proportion of body tissue (4%), they are essential structural and functional components in many vital processes. One important functional aspect is their role as catalysts in enzymatic systems, by binding to substrates and thus directing the reaction, and as mediators in redox reactions by means of reversible changes in the oxidation state of the metal ion. Regarding the structural aspect, the role of metals as a component of organic compounds is worth mentioning, such as iron in hemoglobin, iodine in thyroxine, cobalt in B12 vitamin, and sulfur in thiamine and biotin. Metal ions stabilize these biomolecules by neutralizing and/or protecting negative charges.^{1,2}

Ion balance is important for bone formation, such as the amounts and ratio of calcium and phosphorus for muscle activity and in the extracellular fluid. Electrolytes, among

which sodium and potassium salts are the most important, represent the main factors for the osmotic control of water metabolism.^{2,3}

The literature estimates that approximately 40% of all proteins and enzymes require the presence of a metal ion, to perform biological activity. Such ions are responsible for many processes, such as energy conversion during photosynthesis and respiration, gene regulation and expression, substrate binding and activation, transportation, and storage, in addition to catalytic processes.⁴ Metalloproteins are considered distinct from metal-binding proteins. The former are characterized by their high metal-protein interaction affinity. In the latter, the metal-protein interaction has low affinity, and therefore this bond is easily broken.^{5,7}

The study of metalloproteomics in living organisms provides information on how a metal ion is distributed and coordinated to proteins, its essentiality and/or toxicity, and the individual concentration of the metal species, thus contributing to a better understanding of the physiological and functional aspects of these biomolecules.^{8,9}

This study aimed to obtain the proteome of muscle samples from Nile tilapia using protein fractionation by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE); determination by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) and/or graphite furnace atomic

*e-mail: padilha@ibb.unesp.br

6.4. Textos em Jornais de notícias/revistas

1. BRAGA, C. P. ; VIEIRA, JOSÉ C.S. ; MORAES, PAULA M. ; **CAVECCI, BRUNA** ; FERNANDES, A. A. ; OKOSHI, M. P. ; PADILHA, P. M. . Metalomics and proteins expression of diabetic rats. The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, San Diego, p. 241 - 241, 27 abr. 2014.

6.5. Comunicações em Congressos

1. **Bruna Cavecci**; VIEIRA, J. C. S. ; QUEIROZ, J. V. ; BITTARELLO, A. C. ; PADILHA, CILENE C. F. ; ZARA L. F. ; PADILHA, P. M. . Characterization of Mercury-Bound Protein in Fish of the Amazon. In: 6º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes AquaNutri, 2015, Botucatu. Anais 6º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes AquaNutri, 2015.

2. VIEIRA, JOSÉ C.S. ; QUEIROZ, JOÃO V. ; **CAVECCI, B.** ; BITTARELLO, A. C. ; BRAGA, CAMILA P. ; OLIVEIRA, G. ; LIMA, P.M. ; ZARA, LUIZ F. ; PADILHA, P. M. . Mercury determination in the fish species usually traded of the Madeira River, The Brazilian Amazon. In: 6º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes AquaNutri, 2015, Botucatu. Anais 6º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes AquaNutri, 2015.

3. SILVA, T. M. ; FIGUEIREDO, W. S. ; BITTARELLO, A. C. ; CAVECCI, B. ; VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA ; ZARA L. F. ; PADILHA, PEDRO DE MAGALHÃES . Determinação de mercúrio total em amostras de leite de lactantes residentes no alto rio Madeira, Rodônia, Brasil. In: 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal - RN. 54º CBQ, 2014.

4. QUEIROZ, JOÃO VITOR DE ; CAVECCI, BRUNA ; VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA ; BRAGA, CAMILA PEREIRA ; BITTARELLO, A. C. ; PADILHA, I. F. ; PADILHA, CILENE C. F. ; PADILHA, P. M. . Estudo de biomarcadores de toxicidade de mercúrio em Tucunaré (*Cichla spp.*). In: 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal - RN. 54º CBQ, 2014.

5. BITTARELLO, A. C. ; CAVECCI, BRUNA ; VIEIRA, J. C. S. ; BRAGA, C. P. ;

QUEIROZ, J. V. ; PADILHA, I. F. ; PADILHA, CILENE C. F. ; PADILHA, P. M. . Estudos iniciais do metaloma de curimatã (*Prochilodus sp.*) da região amazônica buscando biomarcadores de toxicidade de mercúrio. In: 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal - RN. 54º CBQ, 2014.

6. VIEIRA, J. C. S. ; BRAGA, C. P. ; CAVECCI, BRUNA ; BITTARELLO, A. C. ; QUEIROZ, J. V. ; PADILHA, P. M. . Quantificação de Mercúrio em Fígado de Peixe Filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) da Região de Porto Velho/Brasil por GFAAS. In: 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal - RN. 54º CBQ, 2014.

7. VIEIRA, J. C. S. ; BRAGA, C. P. ; CAVECCI, BRUNA ; BITTARELLO, A. C. ; QUEIROZ, J. V. ; PADILHA, P. M. . Biomarcadores Proteicos de Mercúrio em Tecido Hepático de Peixe Jaraqui (*Semaprochilodus sp*) do rio Madeira/Brasil. In: 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal - RN. 54º CBQ, 2014.

8. CAVECCI, BRUNA ; VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA ; BRAGA, CAMILA PEREIRA ; QUEIROZ, J. V. ; BITTARELLO, A. C. ; PADILHA, I. F. ; PADILHA, CILENE C. F. ; PADILHA, P. M. . Relação estequiométrica entre moléculas de proteínas e átomos de mercúrio em amostra de Dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) utilizando 2D-PAGE e GFAAS. In: 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal - RN. 54º CBQ, 2014.

9. VIEIRA, J. C. S; BRAGA, C. P; CAVECCI, BRUNA; BITTARELLO, A. C; QUEIROZ, J. V; OLIVEIRA, G; PADILHA, P. M. Quantificação de Mercúrio em tecido hepático de peixes amazônicos. Botucatu, SP, XIV Workshop da Pós-Graduação, realizado no período de 10 a 12 de Junho de 2015 em Botucatu – São Paulo, Pôster.

10. VIEIRA, J. C. S; BRAGA, C. P; CAVECCI, BRUNA; BITTARELLO, A. C; QUEIROZ, J. V; OLIVEIRA, G; PADILHA, P. M. Quantificação de Mercúrio em tecido hepático de peixes amazônicos. Botucatu, SP, XIV Workshop da Pós-Graduação, realizado no período de 10 a 12 de Junho de 2015 em Botucatu – São Paulo, Pôster.

6.6. Resumo publicados em Anais de congressos

1. CAVECCI, B. ; BRAGA, CAMILA P. ; BITARELLO, A. C. ; DE SOUZA VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE ; QUEIROZ, J. V. ; PADILHA, P. M. . Estudos de Proteínas Associadas ao Mercúrio em Peixes da Região Amazônica. In: Congresso Brasileiro de Aquicultura e Biologia Aquática, AQUACIÊNCIA, 2016, Belo Horizonte. ANAIS AQUACIÊNCIA 2016, 2016.

2. BITARELLO, A. C. ; DE SOUZA VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE ; BRAGA, C. P. ; CAVECCI, B. ; QUEIROZ, J. V. ; FLEURI, L. F. ; PADILHA, P. M. . Concentração de Mercúrio em Diferentes Tecidos de Duas Espécies de Peixes de Interesse Comercial da Bacia Amazônica. In: Congresso Brasileiro de Aquicultura e Biologia Aquática, AQUACIÊNCIA, 2016, Belo Horizonte. ANAIS AQUACIÊNCIA 2016, 2016.

3. BITARELLO, A. C. ; VIEIRA, J. C. S. José C.S. Vieira ; BRAGA, C. P. ; CAVECCI, B. ; VITOR DE QUEIROZ, JOÃO ; FLEURI, L. F. ; PADILHA, PEDRO DE MAGALHÃES . Glutathione-S-Transferase (GST) Como Biomarcadora de Toxicidade do Mercúrio em Peixes da Região Amazônica. In: Congresso Brasileiro de Aquicultura e Biologia Aquática, AQUACIÊNCIA, 2016, Belo Horizonte. ANAIS AQUACIÊNCIA 2016, 2016.

4. QUEIROZ, J. V. ; VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA ; CAVECCI, B. ; BRAGA, CAMILA P. ; BITARELLO, A. C. ; ZARA, L. F. ; PADILHA, P. M. . Metallomic Study of Hg in Muscle Tissue of Jaraqui. In: 18th International Conference on Heavy Metals in the Environment, ICHMET 2016, 2016.

5. VIEIRA, J. C. S.; C.P. Braga; B. Cavecci; QUEIROZ, J. V.; G. Oliveira; A.C. Bitarello; L.F. Zara; P.M. Padilha. Mercury Fractionation in Tucunaré (*Cichla* spp) and Filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) from Brazilian Amazon. In 18th ICHMET, 2016.

6. VIEIRA, J. C. S. ; **CAVECCI, B.** ; QUEIROZ, J. V. ; BITARELLO, A. C. ; BRAGA, C. P. ; PADILHA, CILENE C. F. ; ZARA, LUIZ F. ; PADILHA, P. M. . Mercury fractionation in fish of the Madeira River-Brazil using metalloproteomic strategies. In: XVIII Euroanalysis, 2015, Bordeaux. Anais of the XVIII Euroanalysis 2015, 2015.

7. QUEIROZ, J. V. ; VIEIRA, JOSÉ C. S. ; **CAVECCI, B.** ; BITTARELLO, A. C. ; BRAGA, CAMILA P. ; PADILHA, CILENE C. F. ; ZARA, LUIZ F. ; PADILHA, PEDRO DE MAGALHÃES . MERCURY FRACTIONATION IN FILHOTE (*Brachyplatystoma filamentosum*) OF THE MADEIRA RIVER IN BRAZIL USING METALLOPROTEOMICS STRATEGIES. In: 6º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes AquaNutri, 2015, Botucatu. Anais 6º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes AquaNutri, 2015.

8. VIEIRA, JOSÉ C. S. ; QUEIROZ, JOÃO V. ; **CAVECCI, B.** ; BITTARELLO, A. C. ; BRAGA, CAMILA P. ; OLIVEIRA, G. ; PADILHA, PEDRO M. . Determinação de Mercúrio em Pellets e spots proteicos de peixes Jaraqui e Tucunaré do rio Madeira-Rondônia/Brasil. In: 18º Encontro Nacional de Biomedicina, 2015, Botucatu. Anais 18ª ENBM, 2015.

9. QUEIROZ, J. V. ; VIEIRA, J. C. S. ; **CAVECCI, B.** ; BITTARELLO, A. C. ; BRAGA, C. P. ; PADILHA, CILENE C. F. ; ZARA, LUIZ F. ; PADILHA, P. M. . Metalloproteomic speciation of Mercury in Amazonian Fish Samples - Madeira River Basin. In: 9th Congress of Toxicology in Developing Countries - CTDC9 / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTTox, 2015, Natal. 9th Congress of Toxicology in Developing Countries - CTDC9 / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTTox, 2015.

10. VIEIRA, J. C. S. ; QUEIROZ, J. V. ; **CAVECCI, B.** ; BITTARELLO, A. C. ; BRAGA, C. P. ; OLIVEIRA, G. ; ZARA, L. F. ; PADILHA, P. M. . Potential Protein Biomarkers of Mercury Toxicity in Amazonian Fish. In: 9th Congress of Toxicology in Developing Countries - CTDC9 / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTTox, 2015, Natal. 9th Congress of Toxicology in Developing Countries - CTDC9 / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTTox, 2015.

11. PADILHA, CILENE C. F. ; **CAVECCI, BRUNA** ; BITTARELLO, A. C. ; LIMA, PAULA M. ; VIEIRA, J. C. S. ; QUEIROZ, J. V. ; BRAGA, C. P. ; PEZZATO, L. E. ; PADILHA, P. M. . Perfil Metalômico de tecido de Tilápia do Nilo criadas em cativeiro. In: VI Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática (Aquaciência),

2014, Foz do Iguaçu. Anais Aquaciência 2014, 2014.

12. PADILHA, P. M. ; VIEIRA, J. C. S. ; BITTARELLO, A. C. ; QUEIROZ, J. V. ; BRAGA, C. P. ; **CAVECCI, BRUNA** ; PADILHA, CILENE C. F. ; Zara L. F. . Mapeamento de mercúrio em spots proteicos de tecido hepático de peixes da região Amazônica. In: VI Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática (Aquaciência), 2014, Foz do Iguaçu. Anais Aquaciência 2014, 2014.

13. BITTARELLO, A. C. ; VIEIRA, J. C. S. ; BRAGA, C. P. ; **CAVECCI, BRUNA** ; QUEIROZ, J. V. ; PADILHA, CILENE C. F. ; Zara L. F. ; PADILHA, PEDRO DE MAGALHÃES . Biomarcadores proteicos de mercúrio em peixes da bacia do rio Madeira. In: VI Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática (Aquaciência), 2014, Foz do Iguaçu. Anais Aquaciência 2014, 2014.

14. BITTARELLO, A. C. ; LIMA, PAULA M. ; **CAVECCI, BRUNA** ; BRAGA, C. P. ; PADILHA, CILENE C. F. ; FLEURI, L. F. ; PEZZATO, L. E. ; PADILHA, P. M. . Expressão proteica do tecido muscular de tilápias do Nilo alimentadas com fontes orgânica e inorgânica de zinco. In: VI Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática (Aquaciência), 2014, Foz do Iguaçu. Anais Aquaciência 2014, 2014.

15. VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA ; BRAGA, CAMILA PEREIRA ; **CAVECCI, BRUNA** ; BITTARELLO, A. C. ; QUEIROZ, JOÃO VITOR DE ; OLIVEIRA, G. ; PADILHA, PEDRO DE MAGALHÃES . Possíveis Proteínas Biomarcadoras de Mercúrio em Tecido Hepático de Peixes da Bacia do rio Madeira/Brasil. In: 17º Encontro Nacional de Biomedicina, 2014, Botucatu-SP. 17º Encontro Nacional de Biomedicina, 2014.

16. **CAVECCI, B.** ; VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA ; PADILHA, PEDRO M. . Metalon Proteomic Profile of Muscle Samples of Nile Tilapia.. In: XIII Workshop da Pós-Graduação, 2014, Botucatu-SP. ANAIS DO XIII WORKSHOP DA PÓS-GRADUAÇÃO, 2014.

17. SILVA, T. M. ; FIGUEIREDO, W. S. ; **CAVECCI, BRUNA** ; VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA ; PADILHA, CILENE C. F. ; Zara L. F. ; PADILHA, P. M. .

Estudo metaloproteômico quantitativo do mercúrio em amostras de leite de lactante residentes no alto rio Madeira, Rondônia, Brasil. In: VII Encontro Nacional de Química Ambiental, 2014, Brasília. Anais do VII Encontro Nacional de Química Ambiental, 2014.

6.7. Apresentação de trabalho

1. VIEIRA, JOSÉ C. S. ; **CAVECCI, B.** ; QUEIROZ, JOÃO V. ; BITTARELLO, A. C. ; BRAGA, CAMILA P. ; PADILHA, CILENE C. F. ; ZARA, LUIZ F. ; PADILHA, P. M. . Determination of mercury fraction linked to protein of muscle tissue and liver of fish Amazon region-Brazil. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

2. VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA ; BRAGA, CAMILA PEREIRA ; **CAVECCI, BRUNA** ; BITTARELLO, A. C. ; QUEIROZ, JOÃO VITOR DE ; OLIVEIRA, G. ; PADILHA, PEDRO DE MAGALHÃES . QUANTIFICAÇÃO DE MERCÚRIO EM TECIDO HEPÁTICO DE PEIXES AMAZÔNICOS. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

3. VIEIRA, JOSÉ C. S. ; QUEIROZ, JOÃO V. ; **CAVECCI, B.** ; BITTARELLO, A. C. ; BRAGA, CAMILA P. ; OLIVEIRA, G. ; PADILHA, PEDRO DE M. . Determinação de Mercúrio em Pellets e spots proteicos de peixes Jaraqui e Tucunaré do rio Madeira-Rondônia/Brasil. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

4. **CAVECCI, BRUNA** ; PADILHA, P. M. . Biomarcador de Toxicidade do Mercúrio Aplicados ao Setor Hidrelétrico na Região Amazônica. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

5. VIEIRA, J. C. S. ; BRAGA, C. P. ; **CAVECCI, BRUNA** ; OLIVEIRA, G. ; QUEIROZ, J. V. ; PADILHA, CILENE C. F. ; PADILHA, P. M. . Proteínas marcadoras de mercúrio em peixes do rio Madeira - Amazônia brasileira. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

6. OLIVEIRA, G. ; VIEIRA, J. C. S. ; BRAGA, CAMILA P. ; **CAVECCI, B.** ; BITTARELLO, A. C. ; QUEIROZ, J. V. ; PADILHA, P. M. . Análise quantitativa de mercúrio em fígado de jaraqui, tucunaré e filhote da região de Porto Velho-Brasil. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

7. **CAVECCI, BRUNA** ; VIEIRA, JOSÉ C.S. ; PADILHA, P. M. . Metalon Proteomic Profile of Muscle Samples of Nile Tilapia. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

8. SILVA, T. M. ; FIGUEIREDO, W. S. ; **CAVECCI, BRUNA** ; VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA ; PADILHA, CILENE C. F. ; Zara L. F. ; PADILHA, P. M. . Estudo metaloproteômico quantitativo do mercúrio em amostras de leite de lactante residentes no alto rio Madeira, Rondônia, Brasil. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

6.8. Palestras e/ou mini-cursos proferidos em eventos

1. Palestra: “Estudo de metalotioneínas associadas aos peixes da região amazônica” no I Workshop do projeto de P&D/ANEEL (6631-0001/2012). Biomarcador de Toxicidade do Mercúrio Aplicados ao Setor Hidrelétrico na Região Amazônica. 2014.

2. Palestra: “Caracterização de metalotioneínas ligadas ao mercúrio em amostras de peixes coletados na região da Bacia Amazônica/Brasil” II Workshop do projeto de P&D/ANEEL (6631-0001/2012). Biomarcador de Toxicidade do Mercúrio Aplicados ao Setor Hidrelétrico na Região Amazônica. 2015.

3. Ministrante minicurso "Proteômica e Metalômica: abordagens e estratégias de análise" realizado no dia 10 de junho de 2015 durante o XIV Workshop da Pós-Graduação em Botucatu “Internacionalização e Mercado do trabalho” – São Paulo, com duração de 8 horas.

6.9. Participação em eventos

1. 6º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes AquaNutri. Mercury determination in the fish species usually traded of the Madeira River, The Brazilian Amazon. 2015. (Simpósio).

2. III Congresso de Biociências. Proteínas marcadoras de mercúrio em peixes do rio Madeira - Amazônia brasileira. 2014. (Congresso).

3. Simpósio de Biologia Geral e Aplicada. Estudo de metalotioneínas associadas ao

mercúrio em peixes da região amazônica. 2014. (Simpósio).

4. 17º Encontro Nacional de Biomedicina. Possíveis Proteínas Biomarcadoras de Mercúrio em Tecido Hepático de Peixes da Bacia do rio Madeira/Brasil. 2014. (Encontro).

5. 17º Encontro Nacional de Biomedicina. Análise quantitativa de mercúrio em fígado de jaraqui, tucunaré e filhote da região de Porto Velho-Brasil. 2014. (Encontro).

6. I Workshop do projeto de P&D/ANEEL (6631-0001/2012). Biomarcador de Toxicidade do Mercúrio Aplicados ao Setor Hidrelétrico na Região Amazônica. 2014. (Outra).

7. XIII Workshop da Pós-Graduação. Metalon Proteomic Profile of Muscle Samples of Nile Tilapia. 2014. (Outra).

8. VII Encontro Nacional de Química Ambiental. Estudo metaloproteômico quantitativo do mercúrio em amostras de leite de lactante residentes no alto rio Madeira, Rondônia, Brasil. 2014. (Outra).

9. XIV Workshop da Pós-Graduação em Botucatu “Internacionalização e Mercado do trabalho”

6.10. Outras atividades realizadas

- Participou da defesa de dissertação de Mestrado, como ouvinte, de Bruna Caroline Miranda Maciel. Com o título: “Proteômica e metalômica comparativa de folhas de *Arabidopsis thaliana* transgênica e não transgênica.” (Programa de Pós-Graduação em Química) - INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP.

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"auser 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.

Cuyppers, 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.