

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

**NOVOS INSIGHTS NOS MECANISMOS DA AÇÃO PROTETORA DO
SELÊNIO EM RELAÇÃO À TOXICIDADE DO MERCÚRIO EM PEIXES DA
AMAZÔNIA: ESTUDO ENVOLVENDO ESTRATÉGIAS
METALOPROTEÔMICAS**

IZABELA DA CUNHA BATAGLIOLI

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção
do título de Doutora em Zootecnia.

BOTUCATU – SP
Junho 2024

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

**NOVOS INSIGHTS NOS MECANISMOS DA AÇÃO PROTETORA DO
SELÊNIO EM RELAÇÃO À TOXICIDADE DO MERCÚRIO EM PEIXES DA
AMAZÔNIA: ESTUDO ENVOLVENDO ESTRATÉGIAS
METALOPROTEÔMICAS**

IZABELA DA CUNHA BATAGLIOLI
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Pedro de
Magalhães Padilha
Co-orientadora: Prof. Dra. Fabíola
Xochilt Valdez Domingos
Moreira

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção
do título de Doutora em Zootecnia.

BOTUCATU – SP
Junho 2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bataglioli, Izabela da Cunha.

Novos insights nos mecanismos da ação protetora do selênio em relação à toxicidade do mercúrio em peixes da amazônia : estudo envolvendo estratégias metaloproteômicas / Izabela da Cunha Bataglioli. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Coorientador: Fabiola Xochilt Valdez Domingos Moreira

Capes: 50403001

1. Efeito da poluição da água sobre os peixes. 2. Mercúrio. 3. Selênio.
4. Proteínas de transporte. 5. Proteômica. 6. Amazônia.

Palavras-chave: 2D PAGE, GFAAS - Shotgun - LC-MS/MS; Hg e Se em peixes amazônicos; Hg/Se-associated protein; *Metal bindin proteins*; Metaloproteômica.

ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

Atestamos que **IZABELA DA CUNHA BATAGLIOLI**, RA nº: ZNP200182, RG nº 48.866.550-4, expedido pela SSP/SP, defendeu, no dia 03/06/2024, a tese intitulada **NOVOS INSIGHTS NOS MECANISMOS DA AÇÃO PROTETORA DO SELÊNIO EM RELAÇÃO À TOXICIDADE DO MERCÚRIO EM PEIXES DA AMAZÔNIA: ESTUDO ENVOLVENDO ESTRATÉGIAS METALOPROTEÔMICAS**, junto ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Curso de Doutorado, tendo sido 'APROVADA'.

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

Botucatu, 03 de junho de 2024



BIOGRAFIA DA AUTORA

Izabela da Cunha Bataglioli, filha de Vera Lucia Alves da Cunha, nasceu em 03 de dezembro de 1992 na cidade de Amparo – SP. Em fevereiro de 2012, ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, graduando-se em dezembro de 2016. Em abril de 2017 ingressou no Mestrado pelo programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Câmpus de Botucatu, sendo bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), na Área de Química e Bioquímica, com foco em metaloproteômica, visando quantificar e caracterizar proteínas associadas ao mercúrio em pirarucu (*Arapaima gigas*), concluindo o curso em outubro de 2019. Em agosto de 2020 iniciou o curso de Doutorado pelo programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Câmpus de Botucatu, onde inicialmente foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e no ano de 2022 foi contemplada com a bolsa pela FAPESP, processo nº 2021/01527-9.

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe,

Nenhuma palavra ou gesto pode expressar completamente a gratidão que sinto por todo o apoio incondicional que você me proporcionou ao longo dessa jornada. Seu amor, sua orientação e sua força foram os pilares que sustentaram meu crescimento pessoal e profissional. É graças a você que me sinto capaz de enfrentar desafios, seguir em frente e alcançar meus objetivos.

Sua presença constante e seu carinho infinito são verdadeiros tesouros em minha vida. Você é a luz que ilumina meus dias e a inspiração que impulsiona meus sonhos. Sei que posso sempre contar com você, não apenas como mãe, mas como minha maior aliada e amiga.

Que estas palavras sirvam como um pequeno reflexo do profundo amor e gratidão que habita em meu coração. Obrigado por ser a mãe extraordinária que você é.

Com todo o meu amor e admiração.

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador, Professor Pedro de Magalhães Padilha, agradeço pela oportunidade, confiança, por compartilhar conhecimentos, pela ajuda nas determinações de mercúrio e selênio e na redação do texto da tese, e pelo suporte financeiro aprovado junto aos órgãos de fomento FAPESP (Processo: 2019/02538-4), CNPq (Processos: 404404/2023-5, 408179/2022) e CAPES (AUXPE-Process: 88881.3107432018-0.1), o que ajudou na conclusão deste trabalho.

Ao meu grande amigo Dr. José Cavalcante Souza Vieira, sua presença e ajuda foram fundamentais para a realização desse projeto, sem você não seria possível. Agradeço por toda dedicação, infinita paciência (que eu vivia testando kk), por todos ensinamentos e suporte desde o meu primeiro dia de laboratório, por todas as dúvidas tiradas (mais de uma vez!!!), por todas as conversas extra lab, sou muito grata por nossa amizade!

Ao Dr. Armando Carlos Contin Neto, sua amizade é um presente valioso. Compartilhar momentos e conselhos de vida com você é inestimável. Se eu fosse agradecer por algo que a vida acadêmica me proporcionou, sua amizade estaria em primeiro lugar. Fortalecemos essa amizade desde que éramos apenas Ximit e Detefon.

Reconheço e agradeço à Cláudia Cristina Moreci por todos os conselhos, para além dos assuntos de pós-graduação, pelo apoio pessoal, pela torcida e todo suporte que fazem de você uma pessoa única.

À minha psicóloga Kauana Barreiro, uma excelente profissional cujo amor e dedicação aos seus pacientes a tornam ainda mais especial. Obrigada por nunca soltar minha mão, por estar sempre disponível com seu imenso carinho, por todas as risadas mesmo nos momentos tensos, e por todos os puxões de orelha necessários para meu desenvolvimento.

VII

Não posso expressar minha gratidão o suficiente ao meu alicerce, Vera (mãe), Daniela (irmã), Janaína (irmã) e Ticiane (cunhada). Mesmo diante das adversidades da vida, vocês nunca deixaram de acreditar em mim e me apoiar incondicionalmente. Comemoraram minhas conquistas como se fossem suas, me sustentaram e me guiaram através das dificuldades. Vocês foram sempre a luz que iluminou meu caminho. E ao meu grande presente, Murilo (sobrinho), que chegou e virou meu mundo de cabeça para baixo, ensinando-me que o amor só cresce e que a vida se torna mais bela e divertida em sua presença.

A todos os professores que já tive e que contribuíram para que eu chegasse até aqui e aos que me ajudaram nessa jornada.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo FAPESP: Nº 2021/01527-9.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

RESUMO GERAL

O mercúrio é um metal tóxico que se acumula ao longo da cadeia trófica, representando um risco para humanos e ecossistemas. O consumo de peixes contaminados é a principal fonte de exposição ao mercúrio (Hg) para as populações tradicionais da região Amazônica. Estudos mostram que a presença de selênio (Se) pode atenuar os efeitos deletérios do Hg no organismo humano e animal, no entanto, os mecanismos dessa ação protetora do Se ainda não foram completamente elucidados. Nesse contexto, a metalômica que tem como objetivo principal esclarecer o papel biológico de espécies metálicas e/ou metalóides que se ligam às biomoléculas e sua função no organismo poderá contribuir com novos *insights* para elucidar o efeito atenuante do Se em relação à toxicidade do Hg em peixes. Sendo assim, esta tese foi dividida em dois capítulos principais (Artigo 1 e 2). **Artigo 1** – Reporta os resultados do estudo metalômico do Hg e Se no tecido hepático das espécies *Psectrogaster amazonica* (Branquinha) e *Raphiodon vulpinus* (Cachorra) do rio Madeira, Rondônia/Brasil utilizando a associação das técnicas de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) - eletroforese bidimensional (2D PAGE) - espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC – MS/MS). Os resultados obtidos permitiram identificar cinco *metal binding proteins* (MBP) nos *spots* proteicos associadas ao Hg e Se no proteoma hepático de *Psectrogaster amazonica* e oito de *Raphiodon vulpinus*, indicando a possível formação de complexos Hg-Se na estrutura das MBP, e que a ligação com Se poderia mitigar os efeitos tóxicos do Hg. Análises de atividades das enzimas CAT (Catalase), SOD (Superóxido Dismutase), GPx (Glutathione Peroxidase), e de LPO (Lipoperoxidação de Lipídeos), demonstraram não ocorrência de estresse oxidativo induzido pela concentração de Hg, o que corrobora com os dados metaloproteômicos. **Artigo 2** – Reporta os resultados do estudo metalômico do Hg e Se no tecido muscular das espécies *Psectrogaster amazonica* (Branquinha) e *Raphiodon vulpinus* (Cachorra) do rio Madeira, Rondônia/Brasil utilizando a associação da técnica GFAAS com *Shotgun* – Espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (*Shotgun* – LC – MS/MS). As determinações de Hg e Se por GFAAS no tecido muscular e frações proteicas permitiram o cálculo dos valores de Se para benefícios à saúde (Se HBVs). Os valores de Se HBVs foram superiores a cinco para *Psectrogaster amazonica* e superiores a dez para *Raphiodon vulpinus*, indicando que ambas as espécies de peixes possuem reservas de Se no tecido muscular necessárias para controlar os efeitos tóxicos do Hg. As

análises da variação da abundância relativa de proteínas *Shotgun* – LC – MS/MS no proteoma muscular das duas espécies de peixes realizadas por comparação de indivíduos dos grupos com menores e maiores concentrações de Hg e Se (C_{Hg}/C_{Se} – controle; $>C_{Hg}/C_{Se}$), indicaram que 15 e 20 proteínas foram expressas apenas nos grupos com $>C_{Hg}/C_{Se}$ (proteínas Uniques) de tecido muscular de *Psectrogaster amazonica* e *Raphiodon vulpinus*, respectivamente. Os resultados preliminares reportados na presente pesquisa fornecem novos insights para elucidar os mecanismos complexos do efeito protetor do Se em relação à toxicidade do Hg em peixes.

Palavras-chave: Hg e Se; peixes amazônicos; *metal bindin proteins*; Hg/Se-associated; 2D PAGE; *Shotgun*; metaloproteômica; segurança alimentar.

ABSTRACT

Mercury (Hg) is a toxic metal that accumulates throughout the food chain, posing risks to both humans and ecosystems. Consumption of contaminated fish represents the primary exposure route to mercury for traditional populations in the Amazon region. Studies indicate that the presence of selenium (Se) may mitigate the deleterious effects of Hg in both human and animal organisms; however, the mechanisms underlying this protective action remain incompletely understood. In this context, metalloproteomics, aimed at elucidating the biological role of metallic and/or metalloid species binding to biomolecules and their function in the organism, may provide new insights into the attenuating effect of Se on Hg toxicity in fish. Accordingly, this thesis is divided into two main chapters (Article 1 and 2). **Article 1** – Reports the results of a metalloproteomic study of Hg and Se in the liver tissue of *Psectrogaster amazonica* (Branquinha) and *Raphiodon vulpinus* (Cachorra) from Madeira River, Rondônia/Brazil, employing a combination of techniques including graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS), two-dimensional gel electrophoresis (2D PAGE), and tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography (LC-MS/MS). The results identified in the protein spots five metal binding proteins (MBPs) associated with Hg and Se in the hepatic proteome of *Psectrogaster amazonica* and eight in *Raphiodon vulpinus*, suggesting the possible formation of Hg-Se complexes with the MBP structure and indicating that Se binding could mitigate the toxic effects of Hg. Enzyme activity analyses of CAT (Catalase), SOD (Superóxido Dismutase), GPx (Glutathione Peroxidase), and LPO (Lipoperoxidase) showed no occurrence of oxidative stress induced by Hg concentration, corroborating the metalloprotein data. **Article 2** – Reports the results of a metalloproteomic study of Hg and Se in the muscle tissue of *Psectrogaster amazonica* (Branquinha) and *Raphiodon vulpinus* (Cachorra) from Madeira River, Rondônia/Brazil, using a combination of GFAAS and *Shotgun* – LC-MS/MS. Hg and Se determinations in muscle tissue and protein fractions were used in the calculation of Se values that are beneficial for health (Se HBVs). The Se HBV values were above five for *Psectrogaster amazonica* and above ten for *Raphiodon vulpinus*, indicating that both fish species possess Se reserves in muscle tissue necessary to control the toxic effects of Hg. Analyses of the relative abundance variation of *Shotgun* – LC-MS/MS proteins in the muscle proteome of both fish species, comparing individuals from groups with lower and higher concentrations of Hg and Se ($<C_{\text{Hg}}/C_{\text{Se}}$ – control; $>C_{\text{Hg}}/C_{\text{Se}}$), indicated that 15 and 20

1 proteins were expressed only in groups with $>C_{\text{Hg}}/C_{\text{Se}}$ (Unique proteins) in the muscle
2 tissue of *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus*, respectively. The
3 preliminary results reported in this research provide new insights into elucidating the
4 complex mechanisms of the protective effect of Se against Hg toxicity in fish.

5
6 **Keywords:** Hg and Se; Amazonian fish; metal binding proteins; Hg/Se-associated; 2D
7 PAGE; *Shotgun*; metalloproteomics, food safety.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	15
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1 Espécies estudadas.....	17
1.1.1. Psectrogaster amazônica.....	17
1.1.2. Rhaphiodon vulpinus.....	18
1.2. Contaminação por mercúrio na Amazônia	19
1.3. Possível efeito mitigador do selênio sobre o mercúrio.....	21
1.4. Proteômica e metaloproteômica	22
1.5. Abordagens proteômicas	23
1.6. Biomarcadores de toxicidade	27
2. OBJETIVO GERAL	29
2.1. Obejetivos específicos	29
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO II	
Abordagem metalômica de mercúrio e selênio em tecido hepático de Psectrogaster amazonica e Rhaphiodon vulpinus da Amazônia brasileira.....	38
Resumo	39
1. Introdução	40
2. Material e métodos	41
2.1. Animais experimentais, coleta de amostras e processamento	41
2.2. Determinações de mercúrio e selênio	41
2.3. Fracionamento do proteoma hepático por 2D PAGE.....	42
2.4. Caracterização dos spots proteicos associados ao Hg e Se	44
2.5. Análises dos parâmetros relacionados com estresse oxidativo	44
2.6. Análises estatísticas	45
3. Resultados e discussão.....	46
3.1. Determinação de Hg _{total} e Se _{total}	46
3.2. Fracionamento do proteoma hepático por 2D PAGE.....	49
3.3. Caracterização dos spots proteicos associadas a Hg/Se por LC-MS/MS.....	51
3.4. Análise dos parâmetros relacionados com estresse oxidativo	55
4. Conclusões	58
5. Referências bibliográficas.....	59

CAPÍTULO III

Mercury deleterious effects study through selenium on the muscle of *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* from Brazilian Amazon: New insights using metalomics strategies..... 64

Abstract 65

1. Introduction 66

2. Material and methods 67

2.1. Fish collection and sample processing 67

2.2. Mercury and selenium determinations 68

2.3. Protein relative abundance variance analysis by Shotgun – LC–MS/MS 68

2.4. Parameters analysis related to oxidative stress 70

2.5. Statistical analysis 71

3. Results and Discussion 71

3.1. Hg and Se determinations 71

3.3. Analysis of parameters related to oxidative stress 80

4. Conclusions 83

References 84

CAPÍTULO IV

Implicações 88

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os biomarcadores são indicadores biológicos utilizados para medir a exposição, efeitos e resposta dos organismos a substâncias tóxicas. Nesse caso, eles podem ser usados para identificar os efeitos do mercúrio nos peixes e a influência do selênio na mitigação desses efeitos.

O mercúrio é um metal tóxico que pode ser liberado na água através de atividades industriais, como a mineração de ouro e através da mobilização do solo nas construções de hidrelétricas. Os peixes são particularmente vulneráveis à contaminação por mercúrio, pois o metal pode se acumular em seus tecidos ao longo do tempo. A exposição ao mercúrio pode ter efeitos adversos na saúde humana, especialmente em populações que consomem peixes contaminados como parte de sua dieta.

O selênio, por outro lado, é um elemento essencial e pode ter um papel protetor contra os efeitos tóxicos do mercúrio. Estudos mostraram que o selênio pode se ligar ao mercúrio, formando compostos menos tóxicos e reduzindo sua disponibilidade para os organismos. Portanto, a presença de selênio no organismo dos peixes pode ajudar a mitigar os efeitos negativos da contaminação por mercúrio.

A avaliação dos biomarcadores em peixes contaminados por mercúrio pode incluir a medição de níveis de mercúrio nos tecidos dos peixes, bem como a análise de indicadores de estresse oxidativo. Esses biomarcadores podem fornecer informações sobre a gravidade dos efeitos da contaminação por mercúrio nos peixes e sobre a eficácia do selênio na redução desses efeitos.

É importante realizar estudos contínuos e monitoramento ambiental para entender melhor a contaminação por mercúrio em peixes e seus efeitos na saúde humana. Isso pode ajudar a desenvolver medidas de mitigação e garantir a segurança alimentar das comunidades que dependem da pesca na região de Jirau, no rio Madeira.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Espécies estudadas

Os critérios de escolha das espécies, *Psectrogaster amazonica* (branquinha) e *Rhaphiodon vulpinus* (cachorra) para o presente estudo, levaram em consideração seus níveis tróficos e importância para o estudo metaloproteômico, por serem espécies de grande valor na pesca de subsistência e esportiva (cachorra) (Pacheco *et al.*, 2009), e uma espécie muito consumida pela população ribeirinha (branquinha) (Lowe-McConnell 1999; Malabarba; Malabarba, 2020).

1.1.1. *Psectrogaster amazonica*

A espécie *Psectrogaster amazonica* possui algumas características em sua biologia. É um peixe detritívoro, alimentando-se de matéria orgânica floculada, algas, detritos e micro-organismos associados. Essa espécie forma cardumes e realiza migrações tróficas e reprodutivas. Em situações em que o nível da água diminui, espécies como *Potamorhina sp.* e *Psectrogaster sp.* se tornam predominantes, alimentando-se de uma mistura de perífiton (comunidade de organismos aquáticos que se fixam em substratos) e detritos (Siqueira-Souza; Freitas, 2004).

Psectrogaster amazonica é uma espécie de porte pequeno, alcançando até 20 cm de comprimento. Possui um corpo curto e alto, com escamas ctenóides que são ásperas ao toque, especialmente na região ventral. A região pós-pélvica apresenta uma série de espinhos que se projetam para trás e são formados pela modificação das escamas que compõem a margem da quilha. O corpo da espécie é uniformemente claro e prateado, exceto na base dos raios medianos da nadadeira caudal, que é pigmentada com uma coloração mais escura (Jansen *et al.*, 2006) (Figura 1). É uma espécie alvo tanto da pesca de subsistência quanto da pesca comercial (Lowe-McConnell, 1999; Malabarba; Malabarba, 2020). Além disso, a *Psectrogaster amazonica* possui uma importância ecológica significativa, pois serve como recurso alimentar para peixes de maior porte (Vari, 2003).

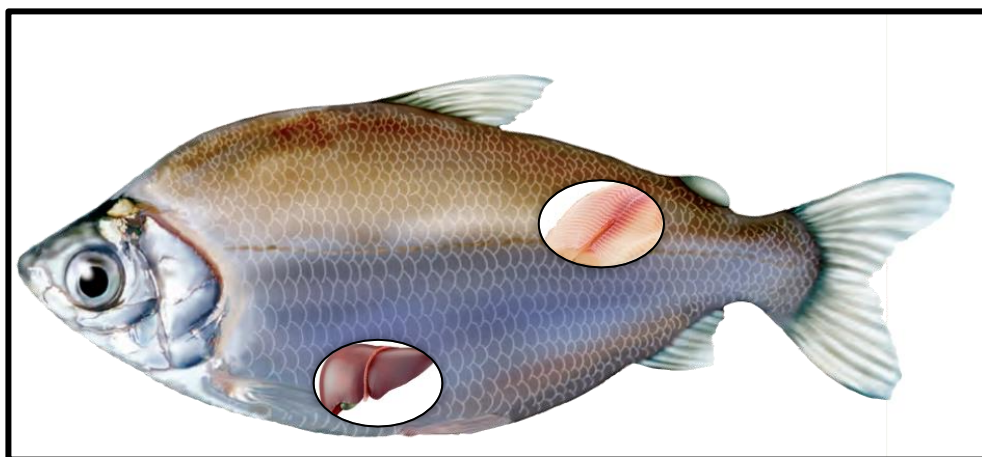


Figura 1. Exemplar da espécie *Psectrogaster amazonica*. Fonte: Adaptado de Santos *et al.*, 2009.

1.1.2. *Rhaphiodon vulpinus*

Rhaphiodon vulpinus é uma espécie de peixe de grande porte que pode atingir até 70 cm de comprimento (Figura 2). Uma característica distintiva dessa espécie é a capacidade de mover a cabeça para cima, em um ângulo de 45°, o que lhe confere um perfil característico (Lesiuk; Lindsey, 1978).

Habita águas tropicais e possui uma ampla distribuição na América do Sul. É encontrado em rios de águas correntes, bem como em reservatórios artificiais. Essa espécie ocorre nas bacias dos rios Orinoco, Amazonas, médio e alto rio Tocantins, Paraná-Paraguai e Uruguai. Nas duas últimas bacias mencionadas, o *Rhaphiodon vulpinus* é o único representante da família Cynodontidae (Froese; Pauly, 2016; Goulding, 1980; Neuberger *et al.*, 2007; Toledo-Piza, 2000).

No Brasil, é conhecido por vários nomes populares, como cachorra, dourado-cachorro, peixe-cachorro ou facão (Agostinho *et al.*, 2003). Sua morfologia é adaptada para a captura de presas em superfície e médias profundidades, com a boca direcionada para cima e a presença de dentes caninos bem desenvolvidos (Almeida *et al.*, 1997). É um peixe piscívoro, alimentando-se principalmente de pequenos peixes, em particular caracídeos, como os do gênero *Astyanax*, popularmente conhecidos como "lambaris". No entanto, também pode se alimentar de invertebrados e outras espécies de peixes de pequeno porte (Agostinho *et al.*, 2003; Graça; Pavanelli, 2007; Hahn *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2009). Do ponto de vista da biologia da conservação, predadores como o *Rhaphiodon vulpinus*, juntamente com alguns decompositores e detritívoros, são

considerados espécies-chave para o ecossistema, pois ocupam as extremidades da cadeia alimentar. Essas espécies têm impacto significativo na regulação das populações de suas presas e na manutenção do equilíbrio ecológico (Rozzi *et al.*, 2001).

Apesar de ser amplamente distribuído e abundante, o *R. vulpinus* não possui um significativo valor econômico e geralmente é descartado na pesca comercial quando seu tamanho é inferior a 30 cm (Batista; Freitas, 2003). Embora haja uma rejeição popular devido à baixa quantidade de carne e grande quantidade de espinhas, o peixe tem uma importância relevante na pesca de subsistência e esportiva (Pacheco *et al.*, 2009).

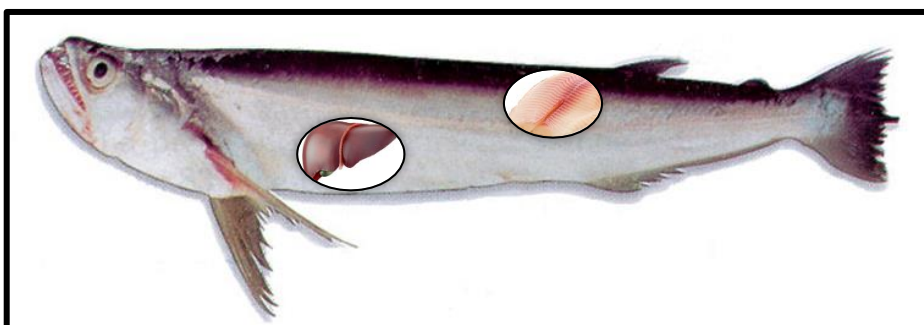


Figura 2. Exemplar da espécie *Rhaphiodon vulpinus*. Fonte: Adaptado de <https://www.fishbase.se/photos/PicturesSummary.php?ID=8697&what=species>

1.2. Contaminação por mercúrio na Amazônia

O mercúrio (Hg) é um metal altamente tóxico que possui a capacidade de se acumular ao longo das cadeias alimentares, alcançando níveis mais elevados de concentração à medida que sobe a cadeia trófica. Isso faz com que a ingestão de mercúrio represente um risco significativo para os consumidores de topo de cadeia, incluindo seres humanos. A exposição a altas concentrações de mercúrio em diferentes regiões do mundo têm sido associada a casos de envenenamento, sendo frequentemente observados sintomas de síndrome motora e danos sensoriais relacionados ao estresse oxidativo no cérebro. É importante ressaltar que o cérebro fetal é particularmente vulnerável a esses efeitos (Clarkson; Magos, 2006). Portanto, são necessários estudos para avaliar os efeitos da exposição crônica a concentrações de mercúrio e metilmercúrio (MeHg), como aquelas associadas ao consumo de peixes (Ralston; Raymond, 2018).

Na Amazônia, a preocupação com a contaminação por mercúrio surgiu na década de 80 devido à intensa atividade de garimpo de ouro. No entanto, estudos posteriores revelaram evidências da presença natural de mercúrio na região amazônica, mesmo em

1 áreas distantes dos locais de garimpo. Isso indica que o mercúrio também possui uma
2 fonte de origem natural na região (Malm, 1998; Malm *et al.*, 1995; Fadini; Jardim, 2001;
3 Roulet *et al.*, 1998). O mercúrio de origem natural encontra-se ligado a diferentes frações
4 do solo, e nos sedimentos, mas pode ser liberado para os ambientes naturais por meio de
5 atividades humanas que alteram o solo, como desmatamento, queimadas, atividades de
6 dragagem e construção de empreendimentos (Lacerda; Malm, 2008; Veiga *et al.*, 1994).
7 A forma metilada do mercúrio, conhecida como MeHg, é absorvida facilmente pela biota
8 aquática. O consumo de peixes é a principal fonte de contaminação por mercúrio em
9 populações humanas da Amazônia, especialmente aquelas que vivem em áreas remotas e
10 dependem dos peixes como fonte principal de proteína na dieta (Lacerda; Malm, 2008;
11 Veiga *et al.*, 1994; Dórea, 2004; Passos *et al.*, 2008).

12 As concentrações médias de mercúrio em peixes carnívoros na Amazônia
13 frequentemente excedem os limites recomendados para consumo humano estabelecidos
14 pela OMS, que é de 0,50 mg/kg (Who, 1990). Por exemplo, estudos relataram
15 concentrações de mercúrio variando de 0,017 a 3,50 mg/kg (Sampaio *et al.*, 2013) e 0,30
16 a 0,98 mg/kg (Faial *et al.*, 2015) em peixes do rio Tapajós, e no rio Madeira, foram
17 observadas concentrações de mercúrio na faixa de 0,051 a 1,24 mg/kg em peixes
18 carnívoros (Bastos *et al.*, 2015). Esses valores destacam a presença significativa de
19 mercúrio em peixes da região, o que representa um risco para a saúde humana caso esses
20 peixes sejam consumidos regularmente. É importante ressaltar que peixes de níveis
21 tróficos mais baixos geralmente apresentam concentrações de mercúrio abaixo do limite
22 de 0,50 mg/kg. Nos últimos cinco anos, foram documentadas evidências de uma
23 correlação positiva entre o consumo de peixes e as concentrações de mercúrio
24 encontradas em cabelo e no sangue de populações humanas na Amazônia (Dórea;
25 Marques, 2016; Faial *et al.*, 2015; Passos *et al.*, 2007). Isso indica que o consumo de
26 peixes contaminados por mercúrio pode levar a um aumento da exposição e acumulação
27 desse metal em humanos, o que representa um risco à saúde dessas populações.

28 É válido ressaltar que o mercúrio, além de se acumular nos tecidos dos peixes, pode
29 causar uma série de efeitos prejudiciais aos organismos aquáticos. Estes efeitos incluem
30 neurotoxicidade (Alves Costa *et al.*, 2007; Rabitto *et al.*, 2011), indução de estresse
31 oxidativo (García-Medina *et al.*, 2017), alterações genotóxicas (García-Medina *et al.*,
32 2017; Lopez-Poleza, 2004), alterações morfológicas em órgãos alvo (Alves Costa *et al.*,
33 2007; Giari *et al.*, 2008; Rabitto *et al.*, 2011), e reprodutivas (Crump; Trudeau, 2009;
34 Penglase *et al.*, 2014). Estudos têm mostrado que o mercúrio pode afetar a saúde e a

1 reprodução dos peixes, o que pode resultar em alterações nas populações locais. Isso pode
2 levar à redução dos estoques pesqueiros e ter impactos negativos na obtenção de proteína
3 animal pelas comunidades ribeirinhas. Portanto, é necessário realizar estudos que avaliem
4 os aspectos reprodutivos dos peixes relacionados à presença de mercúrio, a fim de
5 compreender e mitigar os efeitos dessa contaminação nos ecossistemas aquáticos e nas
6 populações humanas dependentes desses recursos.

7 1.3. Possível efeito mitigador do selênio sobre o mercúrio

8
9 Estudos indicam que a presença de selênio pode atenuar os efeitos do
10 metilmercúrio (MeHg) em organismos (Lemire *et al.*, 2006; Ralston; Raymond, 2018;
11 Sormo *et al.*, 2011). Isso ocorre devido à maior afinidade do mercúrio pelo selênio em
12 comparação ao enxofre (Ralston; Raymond, 2018). Evidências sugerem que organismos
13 com uma razão Se:Hg >1 apresentam uma redução nos efeitos do mercúrio (Siscar *et al.*,
14 2014; Sormo *et al.*, 2011). Além do efeito protetor e benéfico do selênio, pesquisas
15 recentes indicam que a contaminação por mercúrio pode induzir a produção de
16 metalotioneína (MT) em peixes (Monteiro *et al.*, 2013; Sinaie *et al.*, 2010). A MT é uma
17 proteína que possui grupos sulfidril (-SH) em sua estrutura e desempenha um papel na
18 regulação da concentração intracelular de metais essenciais, sendo responsiva à presença
19 de metais não essenciais como o mercúrio (Viarengo *et al.*, 2001). Estudos indicam que
20 o selênio pode modular a mobilização do mercúrio e a indução da metalotioneína (MT)
21 em peixes (Ralston; Raymond, 2018; Siscar *et al.*, 2014). Essas descobertas sugerem que
22 a MT pode ser um biomarcador promissor para avaliar os efeitos do mercúrio em peixes
23 na região amazônica. A MT desempenha um papel importante na regulação da
24 concentração intracelular de metais, respondendo à presença de metais não essenciais,
25 como o mercúrio. Portanto, a MT pode ser uma ferramenta valiosa para monitorar os
26 impactos da contaminação por mercúrio em peixes na Amazônia. A interação do
27 metilmercúrio (MeHg) com os grupos sulfidril (-SH) e selenol (-SeH) das proteínas
28 animais forma complexos estáveis. Essa interação resulta na diminuição parcial da
29 capacidade antioxidante dessas moléculas, levando ao estresse oxidativo (Carocci *et al.*,
30 2014; Farina *et al.*, 2011). O estresse oxidativo pode ser detectado por meio de técnicas
31 espectrofotométricas associadas a estratégias metaloproteômicas. Essas técnicas
32 permitem a identificação e quantificação de proteínas modificadas pelo mercúrio e a

análise das alterações no proteoma relacionadas ao estresse oxidativo induzido pelo mercúrio. Essas abordagens podem fornecer informações valiosas sobre os mecanismos de toxicidade do mercúrio em peixes da Amazônia.

1.4. Proteômica e metaloproteômica

A proteômica é uma área de estudo que visa analisar as proteínas sintetizadas em células, tecidos e fluidos biológicos. Seu objetivo é identificar e quantificar essas proteínas, além de investigar alterações em sua expressão, caracterizar modificações pós-traducionais e identificar interações entre proteínas, entre outras aplicações (Beranova-Giorgianni, 2003; Vispo, 2004).

É amplamente reconhecido pela comunidade científica a importância das proteínas nos sistemas biológicos. Estudos indicam que cerca de 40% de todas as proteínas e enzimas dependem da presença de íons metálicos para desempenhar suas atividades biológicas (Garcia *et al.*, 2006). As metaloproteínas desempenham um papel crucial nos sistemas biológicos, tanto aquelas que possuem metais essenciais como grupos prostéticos, como o ferro, cobre e zinco, quanto as proteínas que interagem com metais tóxicos. As metaloproteínas ligadas a metais essenciais são responsáveis por funções vitais, como transporte de oxigênio (hemoglobina), regulação enzimática (metaloproteínas de zinco) e transferência de elétrons (citocromos). Esses metais desempenham papéis estruturais e funcionais nessas proteínas, sendo essenciais para seu correto funcionamento. Por outro lado, as proteínas metal ligantes (conhecidas como *metal-binding proteins* em inglês) têm a capacidade de interagir com metais tóxicos, como mercúrio e cádmio. Essas proteínas possuem grupos sulfidríla (-SH) que possuem afinidade por metais tóxicos, formando complexos estáveis com esses elementos. Essa interação ajuda a reduzir a toxicidade desses metais, pois impede que eles causem danos às células e tecidos (Garcia *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011).

Essa área de estudo tem como objetivo elucidar a função biológica dos íons metálicos que se ligam a biomoléculas, buscando compreender o seu papel no organismo (Mounicou *et al.*, 2009). Essa investigação é particularmente relevante no contexto da toxicologia ambiental, especialmente quando se trata de metais tóxicos, como o mercúrio. O entendimento dessas interações entre metais e biomoléculas pode se tornar uma ferramenta valiosa para o estudo dos efeitos tóxicos desses elementos no ambiente.

As metaloproteínas pertencem a um grupo de proteínas que requerem a presença de um cofator metálico específico para desempenhar suas funções biológicas. Essas proteínas são caracterizadas pela sua alta afinidade na interação com íons metálicos, os quais são incorporados por meio de ligações químicas, formando complexos estáveis na estrutura dessas macromoléculas. Esse cofator metálico desempenha um papel crucial na estrutura e atividade dessas proteínas, permitindo-lhes executar suas funções biológicas de maneira eficiente (Silva, 2009).

Em contraste, as proteínas ligadas a metais incorporam íons metálicos por meio de ligações que não configuram atividades específicas às proteínas. No grupo das proteínas ligadas a metais, encontramos íons monovalentes como o potássio e o sódio e os íons alcalinos terrosos cálcio e magnésio. Por outro lado, os metais de transição, como cobalto, manganês, zinco, ferro, cobre e molibdênio, geralmente formam ligações estáveis com as proteínas. Esses metais são frequentemente encontrados em metaloproteínas devido às suas propriedades, como densidade, forças eletrostáticas, raio atômico pequeno e interações eletromagnéticas. Essas características favorecem a formação de ligações estáveis formando complexos nas estruturas das proteínas (Silva, 2009).

1.5. Abordagens proteômicas

O avanço da proteômica é impulsionado pelos progressos tecnológicos e instrumentais que possibilitaram uma análise abrangente do proteoma em várias amostras biológicas. Esses avanços permitiram a investigação das proteínas de forma mais completa. Embora ainda haja desafios e limitações no estudo proteômico, as técnicas de fracionamento de proteínas, a espectrometria de massas (MS) e as ferramentas de bioinformática têm sido aprimoradas. Essas melhorias têm permitido a caracterização e identificação de um vasto conjunto de proteínas (Eckersall; Whitfield, 2011). Nesse contexto, diversas abordagens e ferramentas proteômicas podem ser empregadas. De maneira geral, a análise proteômica engloba várias etapas comuns, que incluem a extração de proteínas, a separação de proteínas complexas ou misturas de peptídeos, seguida pela identificação das proteínas e o estudo de bioinformática para processar e analisar os dados obtidos (Games *et al.*, 2014; Passaglia; Zaha, 2014).

A proteômica pode ser geralmente dividida em duas abordagens: a abordagem baseada em gel (Top-down) e a abordagem sem gel (Bottom-up ou *Shotgun*) (Figura 3) (Almeida *et al.*, 2015). Na abordagem baseada em gel, uma técnica de fracionamento amplamente utilizada é a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) (Figura 4). Essencialmente, na 2D-PAGE, as proteínas são inicialmente separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) por meio da focalização isoelétrica (IEF), que é a primeira dimensão do processo. Na focalização isoelétrica, a mistura de proteínas é colocada em uma fita contendo um gel com um gradiente de pH imobilizado (IPG). Em seguida, um campo elétrico é aplicado ao longo do gel, permitindo a migração das proteínas até alcançarem seu respectivo ponto isoelétrico (pI). O ponto isoelétrico é o pH no qual a proteína possui uma carga líquida igual a zero (Passaglia; Zaha, 2014; Nelson; Cox, 2019).

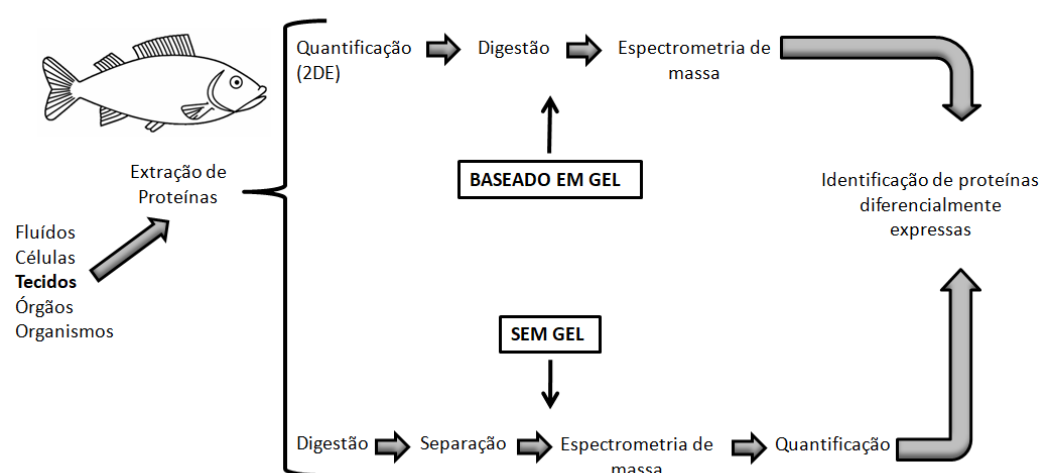
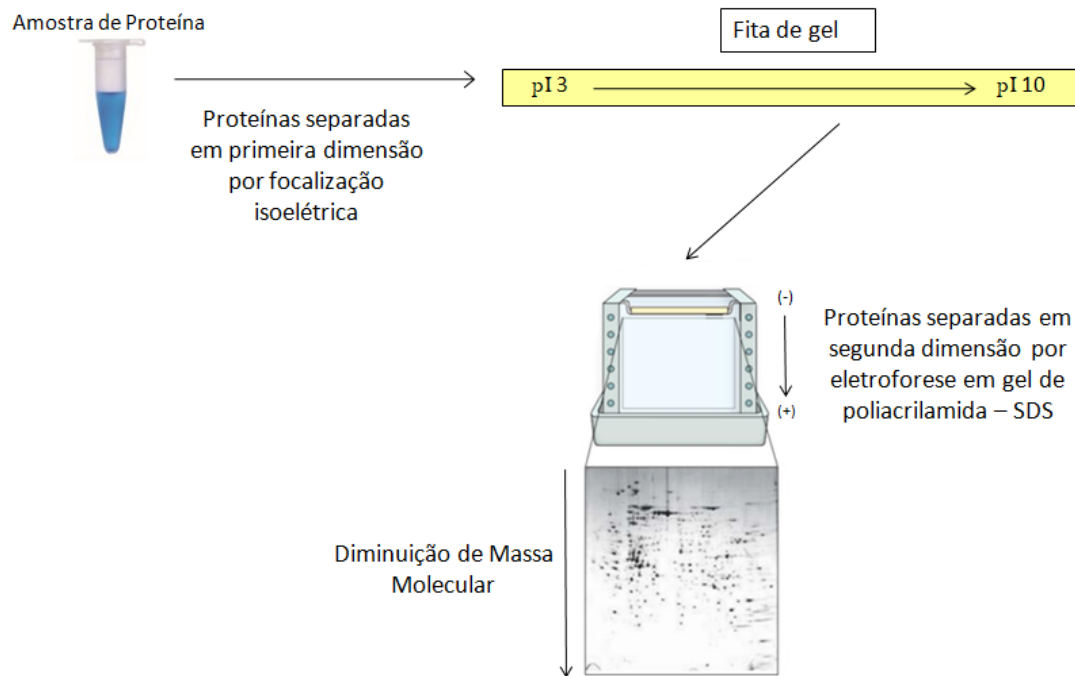


Figura 3. Principais abordagens proteômicas: Técnicas baseadas em gel e sem gel. Adaptado de Almeida *et al.* (2015).

Na segunda dimensão, as proteínas previamente separadas de acordo com o pI na primeira dimensão são agora fracionadas com base em sua massa molecular. Nessa etapa, ocorre a separação vertical das proteínas utilizando um gel de poliacrilamida (acrilamida e bisacrilamida), que atua como uma peneira molecular. Esse gel cria um gradiente de porosidade que permite que as proteínas se movam através dele de acordo com seu tamanho, resultando em *spots* distintos de proteínas separados verticalmente no gel (Nelson; Cox, 2019; Passaglia; Zaha, 2014). Após a aplicação de uma corrente elétrica no gel, as proteínas, previamente desnaturadas e carregadas uniformemente com cargas negativas pelo detergente dodecil sulfato de sódio (SDS), migram através dos poros do

- 1 gel em direção ao polo positivo localizado na base do gel. Nesse processo, ocorre a
- 2 separação das proteínas com base no tamanho (massa molecular), sendo que as proteínas
- 3 menores migram mais rapidamente do que as maiores (Nelson; Cox, 2019).



- 4
- 5 **Figura 4.** Representação esquemática da eletroforese bidimensional. Adaptado de
- 6 Nelson; Cox (2019).

7

8 Após a eletroforese, o gel é imerso em uma solução contendo um corante

9 específico para proteínas, como o Coomassie Blue, que permite a visualização das

10 proteínas na forma de *spots*. Esse corante se liga às proteínas, proporcionando contraste

11 e permitindo a detecção visual das proteínas separadas no gel (Nelson; Cox, 2019). A

12 próxima etapa envolve a análise dos géis obtidos. Primeiramente, os géis são digitalizados

13 e as imagens são analisadas utilizando um *software* específico. Nessa análise, são

14 realizadas medidas como o número de *spots*, a correlação entre os géis (*matching*), o pI e

15 a massa molecular experimentais, bem como a diferença de expressão dos *spots* proteicos

16 entre os grupos estudados. Os *spots* proteicos com expressão diferencial são então

17 recortados do gel e submetidos à digestão proteolítica com tripsina. Após a clivagem, as

18 proteínas são identificadas usando um espectrômetro de massas (Baldassini *et al.*, 2015).

19 A técnica de 2D-PAGE apresenta várias vantagens no contexto da análise

20 proteômica. Primeiramente, ela permite a visualização simultânea de vários *spots*

21 proteicos, o que pode corresponder a centenas ou até mesmo milhares de proteínas

1 presentes em uma amostra. Além disso, a 2D-PAGE possibilita a detecção de
2 modificações pós-traducionais, que podem ser observadas como aglomerados de manchas
3 horizontais ou verticais nas imagens dos géis. A técnica também permite estimar o ponto
4 isoeletrico (pI) e a massa molecular das proteínas separadas. Outra vantagem é a
5 capacidade de realizar uma análise comparativa da expressão proteica entre diferentes
6 amostras, o que é útil para investigar diferenças na expressão de proteínas em condições
7 normais e patológicas, por exemplo (Bodzon-Kulakowska, 2013). No entanto, a técnica
8 de 2D-PAGE também apresenta algumas limitações. Proteínas grandes podem ter
9 dificuldade em entrar nas fitas de gradiente de pH imobilizado (IPG), resultando em baixa
10 detecção dessas proteínas. Além disso, proteínas de baixa abundância podem não ser
11 facilmente detectadas devido à sensibilidade limitada da técnica. Proteínas altamente
12 ácidas ou básicas também podem ser desafiadoras de serem analisadas, uma vez que
13 podem não se separar adequadamente no gradiente de pH. Outra limitação é a análise de
14 proteínas de membrana, que apresentam baixa solubilidade aquosa e alto teor de lipídeos,
15 dificultando sua separação e detecção na técnica de 2D-PAGE (Olver, 2011; Bodzon-
16 Kulakowska, 2013).

17 A técnica sem gel (bottom-up ou *Shotgun*) (Figura 5) é baseada na medição
18 indireta de proteínas por meio da análise de peptídeos gerados a partir da clivagem
19 proteolítica das proteínas intactas (Zhang *et al.*, 2013). Essa abordagem tem um
20 rendimento superior em relação à técnica 2D-PAGE, devido à facilidade das técnicas de
21 separação de proteínas por meio da cromatografia líquida. A capacidade de acoplar a
22 cromatografia líquida capilar multidimensional (LC) à espectrometria de massa em
23 tandem (MS/MS) torna essa abordagem altamente reproduzível e capaz de separar e
24 caracterizar peptídeos obtidos da digestão enzimática de uma amostra proteica (Lippolis;
25 Nally, 2018; Nair; Zhai, 2020).

26 A *Shotgun* é altamente sensível e permite a identificação em larga escala de
27 proteínas, superando a técnica tradicional 2D-PAGE em termos de rendimento. No
28 entanto, assim como a 2D-PAGE, a esta técnica também possui algumas limitações. Por
29 exemplo, pode haver dificuldades na identificação de isoformas de proteínas e na
30 detecção de modificações pós-traducionais. Além disso, a *Shotgun* é geralmente mais
31 dispendiosa em comparação com a 2D-PAGE, em termos de equipamentos e reagentes
32 necessários (Olver, 2011; Lippolis; Nally, 2018). Cada técnica, seja a 2D-PAGE ou a
33 *Shotgun*, apresenta vantagens e limitações específicas. A escolha do método dependerá
34 dos objetivos do estudo, dos recursos disponíveis e da natureza da amostra biológica em

questão. Em alguns casos, pode ser adequado utilizar apenas uma das técnicas, enquanto em outros casos, pode ser benéfico combinar as abordagens para obter uma visão mais abrangente do proteoma. A combinação das duas técnicas tem o potencial de fornecer informações complementares e uma compreensão mais completa das proteínas presentes em amostras biológicas complexas (Miller, 2011; Lippolis; Nally, 2018).

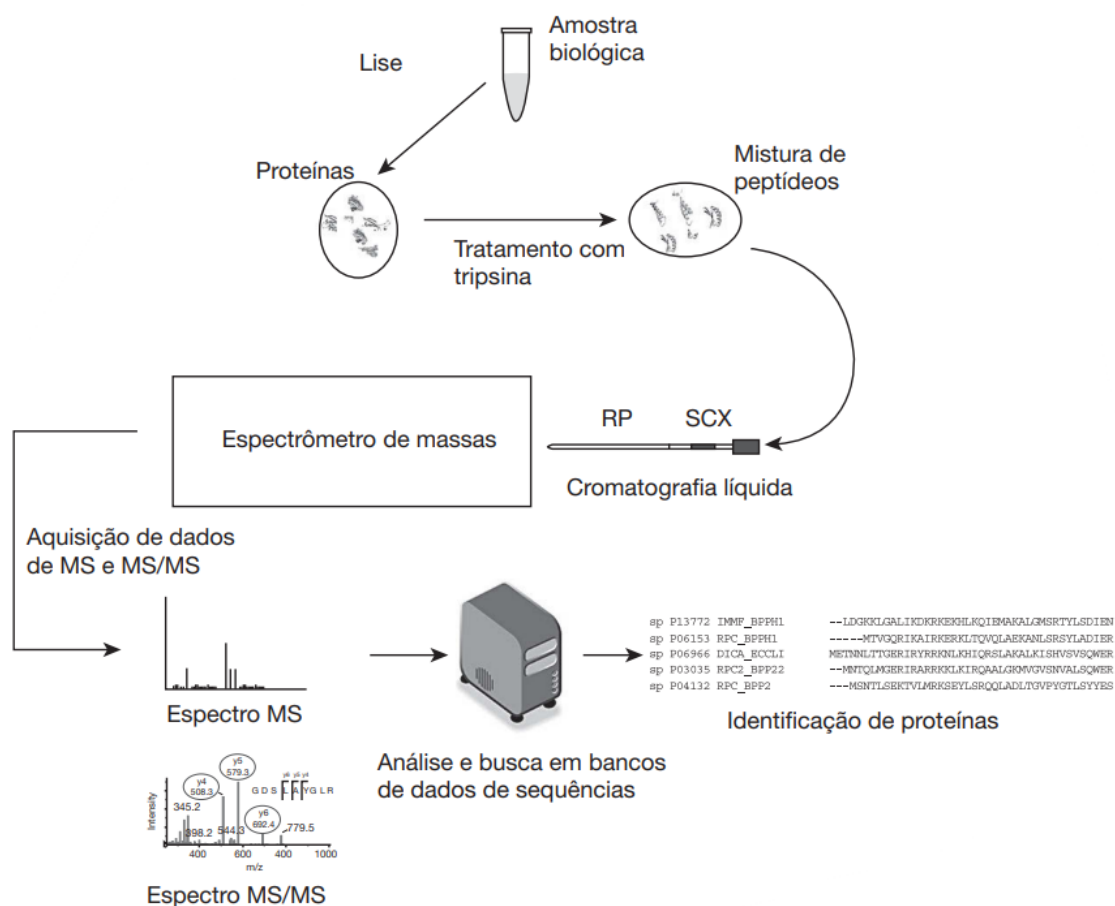


Figura 5. Esquema da representação de proteômica livre de gel (*Shotgun*). Fonte: Passaglia; Zaha, 2014.

1.6. Biomarcadores de toxicidade

Biomarcadores são parâmetros que podem ser medidos em fluidos corporais, células ou tecidos e que indicam modificações bioquímicas ou celulares que afetam a homeostase de um organismo. Essas modificações podem resultar da exposição a substâncias tóxicas ou de condições patológicas (Goldstein, 1987). Os biomarcadores podem ser definidos como efeitos que ocorrem em nível molecular. Esses efeitos podem ser quantificados por técnicas moleculares e indicam possível exposição à xenobióticos sobre o organismo. A quantificação e/ou identificação dos biomarcadores possibilita a

1 utilização de estratégias de remediação antes da ocorrência da alteração biológica no
2 organismo (Walker *et al.*, 1996). Assim, os biomarcadores podem refletir um status
3 saudável ou não de um organismo contaminado por um xenobiótico, como as espécies
4 mercuriais, possibilitando uma resposta rápida ao estresse químico, característica está de
5 grande importância na ecotoxicologia (Arias *et al.*, 2007).

6 Os biomarcadores podem ser classificados considerando-se a intensidade dos efeitos
7 subletais do contaminante, com a possibilidade de se aplicar medidas remediadoras.
8 Dessa forma os biomarcadores podem ser moleculares e sistêmicos, e classificados como
9 de exposição, efeito ou suscetibilidade (Arias *et al.*, 2007). Os biomarcadores de
10 exposição refletem alterações biológicas, passíveis de serem quantificadas, relacionadas
11 com a exposição a xenobióticos. No caso de peixes, as enzimas e/ou proteínas do tecido
12 hepático que participam dos processos de destoxificação de xenobióticos e enzimas de
13 biotransformação de fase I e fase II se encaixam nessa classificação (Delfino Vieira *et al.*,
14 2016). Os biomarcadores de efeito estão relacionados com as respostas adaptativas em
15 molecular e com a indução do sistema de defesa celular. As respostas do sistema
16 antioxidante, como aumento e/ou diminuição de atividade das enzimas CAT, SOD e
17 GPX, estimulada por estresse oxidativo causado por um estressor químico (por exemplo,
18 metais tóxicos, como o mercúrio), poder ser considerada como um biomarcador de efeito
19 (Jesus; Carvalho, 2008). Já os processos relacionados com variações de respostas entre a
20 exposição e efeito, considerando um determinado período, e o estado de saúde do
21 organismo, o estado de equilíbrio do metabolismo, alterações e disfunções morfológica e
22 a morte, podem ser classificados como biomarcadores de suscetibilidade (Jesus;
23 Carvalho, 2008).

24 Portanto, é essencial identificar biomarcadores em níveis hierárquicos mais baixos,
25 pois isso permite a detecção precoce dos efeitos adversos antes que se propaguem para os
26 níveis mais altos. O reconhecimento desses biomarcadores nos estágios iniciais facilita a
27 compreensão dos efeitos e permite a implementação de medidas de manejo e conservação
28 mais efetivas para prevenir danos mais amplos ao ambiente e às populações biológicas
29 (Figura 6) (Jesus; Carvalho, 2008).

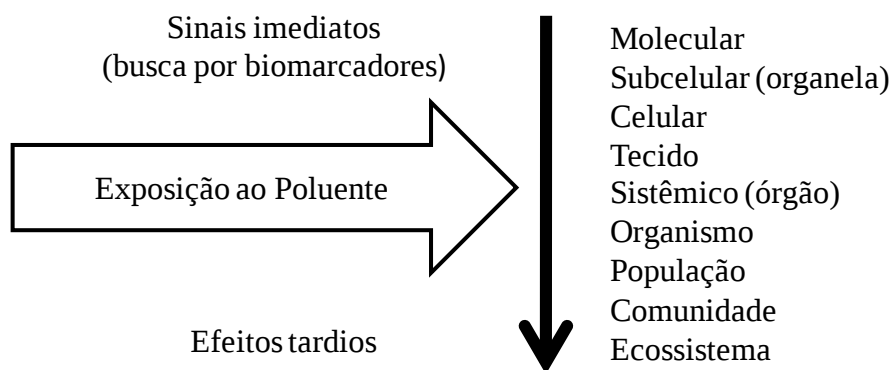


Figura 6. Níveis de respostas do sistema biológico mediante a exposição a poluentes (xenobióticos). Adaptado de Jesus; Carvalho (2008).

2. OBJETIVO GERAL

Contribuir para o melhor entendimento a respeito da influência do selênio nos efeitos tóxicos do mercúrio por meio da identificação de biomarcadores de exposição em peixes *Psectrogaster amazonica* (branquinha) – detritívoro e *Raphiodon vulpinus* (cachorra) – piscívoro, da região de Jirau, rio Madeira/Rondônia.

2.1. Obejetivos específicos

Hipótese 1 – A absorção das espécies mercuriais pode desencadear algum nível de estresse que possivelmente possa alterar a saúde de peixes?

Objetivos específicos (amostras de tecido muscular e hepático): - Identificar proteínas associadas ao mercúrio por 2D PAGE-GFAAS-LC- MS/MS.

Hipótese 2 – A concentração de selênio em peixes poderia mitigar os efeitos deletérios das espécies mercuriais?

Objetivos específicos (amostras de tecido muscular e hepático): - Quantificar a razão Se/Hg; - Caracterizar proteínas associadas ao selênio por 2D-PAGE-GFAAS-LC- MS/MS.

Capítulo 2, intitulado “Abordagem metalômica de mercúrio e selênio em tecido hepático de *Psectrogaster amazonica* e *Raphiodon vulpinus* da Amazônia brasileira” foi redigido de acordo com as normas editoriais do periódico Chemosphere (ISSN: 0045-6535).

Capítulo 3, intitulado “Mercury deleterious effects study through selenium on the muscle of *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* from Brazilian Amazon: New insights using metalomics strategies” foi redigido de acordo com as normas editoriais do periódico *Molecules* (ISSN: 1420-3049).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. M. Status and use of bioindicators for evaluating effects of chronic stress on fish. **Am Fish Soc Symp**, v. 8, p. 1–8, 1990.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SUZUKI, H. I.; JÚLIO, H. F. Migratory Fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil. **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**, Washington, p. 19-98, 2003.
- ALMEIDA, A. M.; BASSOLS, A.; BENDIXEN, E.; BHIHDE, M.; CECILIANI, F.; CRISTOBAL, S.; ECKERSALL, P. D.; HOLLUNG, K.; LISACEK, F.; MAZZUCHELLI, G. Animal board invited review: Advances in proteomics for animal and food sciences. **Animal**, v. 9, p. 1–17, 2015.
- ALMEIDA, V. L. L.; HAHN, N. S.; VAZZOLER, A. E. A. M. Feeding patterns in five predatory fishes of the high Paraná River floodplain (PR, Brazil). **Ecology Freshwater Fish**, v. 6, n. 3, p. 123-133, 1997.
- ALVES-COSTA, J. R. M.; MELA, M.; SILVA-ASSIS, H. C.; PELLETIER, E.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA, C. A. R. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 82–88, 2007.
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 61-72, 2007.
- BALDASSINI, W. A.; BRAGA, C. P.; CHARDULO, L. A. L.; SILVA, J. A. I. V.; MALHEIROS, J. M.; DE ALBUQUERQUE, L. G.; FERNANDES, T. T.; PADILHA, P. D. M. Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). **Food Chemistry**, v. 169, p. 65–72, 2015.
- BASTOS, W. R.; DÓREA, J. G.; BERNARDI, J. V. E.; LAUTHARTTE, L. C.; MUSSY, M. H.; HAUSER, M.; DÓRIA, C. R. C.; MALM, O. Mercury in muscle and brain of catfish from the Madeira river, Amazon, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 90–97, 2015.
- BATISTA, V. S.; FREITAS, V. S. O descarte de pescado na pesca com rede de cerco no baixo rio Solimões, Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 1, p. 127-143, 2003.
- BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: Strengths and limitations. **Trends Anal Chem**, v. 22, p. 10–15, 2003.

- BODZON-KULAKOWSKA, A. Two-Dimensional Gel Electrophoresis. In: CIBOROWSKI, P.; SILBERRING, J. (Eds.). *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroad*. 1. ed. [s.l.]: **Elsevier**, 2013. p. 119–133.
- CAROCCI A.; ROVITO N.; SINICROPI M.S. Mercury Toxicity and Neurodegenerative Effects. In W. D. (Ed.), **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, 2014.
- CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The Toxicology of mercury and its chemical compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, p. 609–662, 2006.
- CRUMP, K. L.; TRUDEAU, V. L. Mercury-induced reproductive impairment in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 895–907, 2009.
- DECAPRIO, A. P. Biomarkers: Coming of Age for Environmental Health and Risk Assessment. **Environmental Science & Technology**, v. 31, p. 1837–1848, 1997.
- DELFINO-VIEIRA, C.E.; COSTA, P.G.; LUNARDELLI, B.; OLEIVEIRA, L.F.; CABRERA, L.C.; RISSO, W.E.; PRIMEL, E. G.; MELETTI, P.C.; FILLMANN, G.; MARTINEZ, C.B.R. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 542, p. 44-56, 2016.
- DÓREA, J. G. Cassava cyanogens and fish mercury are high but safely consumed in the diet of native Amazonians. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57(3), p. 248–256, 2004.
- DÓREA, J. G; MARQUES, R. C. Mercury levels and human health in the Amazon Basin. **Annals of Human Biology**, v. 43(4), p. 349–359, 2016.
- ECKERSALL, D.; WHITFIELD, P. D. *Methods in Animal Proteomics*. [s.l.: s.n.].
- FADINI, P. S.; JARDIM, W. F. Is the Negro River Basin (Amazon) Impacted by Naturally Occurring Mercury?. **Science of The Total Environment**, v. 275, p. 71–82, 2001.
- FAIAL, K.; DEUS, R.; DEUS, S.; NEVES, R.; JESUS, I.; SANTOS, E.; ALVES, C. N.; BRASIL, D. Mercury levels assessment in hair of riverside inhabitants of the Tapajós River, Pará State, Amazon, Brazil: Fish consumption as a possible route of exposure. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 30, p. 66-76, 2015.
- FARINA, M.; ROCHA, J. B. T.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. **Life Sciences**, v. 89, p. 555–563, 2011.
- FROESE, R.; PAULY, D. Editors. **FishBase**. 2016. World Wide Web publicação eletrônica. <http://www.fishbase.org>, Acesso em: 10 de maio de 2023.

GAMES, P. D.; BARBOSA, M. de O.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Preparo de amostras proteicas. In: BARACT-PEREIRA, M. C. (Ed.). **Bioquímica de proteínas**. Viçosa: UFV, 2014. p. 219–246.

GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloproteins analysis. **Talanta**, v. 69, p. 1-15, 2006.

GARCÍA-MEDINA, S.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; RUIZ-LARA, K.; ISLAS-FLORES, H.; GASCA-PÉREZ, E. Relationship between genotoxicity and oxidative stress induced by mercury on common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 192, p. 207–215, 2017.

GIARI, L.; SIMONI, E.; MANERA, M.; DEZFULI, B. S. Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 400–410, 2008.

GOLDSTEIN, B.; GIBSON, J.; HENDERSON, R.; HOBBIE, J.; LANDRIGAN, P.; MATTISON, D.; PERERA, F.; PFITZER, E.; SILBERGELD, E.; WOGAN, G. Biological Markers in Environmental health research. **Environmental Health Perspectives**, v. 74, p. 3–9, 1987.

GOULDING, M. The fishes and the forest: explorations in Amazonian natural history. **University of California Press**, Berkeley, p. 280, 1980.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM, p. 241, 2007.

HAHN, N. S.; FUGI, R.; ANDRIAN, I. F. Trophic ecology of the fish assemblages. In: **The Upper Paraná River and its Floodplain**. THOMAZ, S. M., AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.). Eduem, Maringá, p. 247-270, 2004.

JANSEN, A. S.; DOS SANTOS, Z. G. M.; FERREIRA, E. J. G. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: INPA, p. 141, 2006. ISBN: 9788521100492.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de Biomarcadores em Peixes como Ferramenta para Avaliação de Contaminação Ambiental por Mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 680-693, 2008.

LACERDA, L. D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos Avançados**, v. 22, p. 173–190, 2008.

LEMIRE, M.; MERGLER, D.; FILLION, M.; PASSOS, C. J. S.; GUIMARÃES, J. R. D.; DAVIDSON, R.; LUCOTTE, M. Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon. **Science of The Total Environment**, v. 366, p. 101–111, 2006.

LESIUK, T. P.; LINDSEY, C. C. Morphological peculiarities in the neck-bending Amazonian characoid fish *Rhaphiodon vulpinus*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, n. 4, p. 991-997, 1978.

LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; SANTOS, F. A.; PEREZ, C. A.; 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 SRXRF and FAAS after 2D PAGE separation: Preliminary results. **Talanta**, v. 82, p. 1052-1056, 2010.

LIPPOLIS, J. D.; NALLY, J. E. Considerations for Farm Animal Proteomic Experiments: An Introductory View Gel-Based Versus Non-gel-Based Approaches. In: ALMEIDA, A. M. De; ECKERSALL, D.; MILLER, I. (Eds.). **Proteomics in Domestic Animals: from Farm to Systems Biology**. Cham: Springer, 2018. p. 7–16.

LOPEZ-POLEZA, S. Evaluation of Methylmercury (CH₃Hg⁺) Effects in *Hoplias malabaricus* through the frequency of chromosome aberrations and of the micronucleus test and comet assay: Vol. Master's D. **Universidade Federal do Paraná**, 2004.

LOWE-MCCONNELL, R. H. Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. **São Paulo: Edusp**, p. 534, 1999.

MALABARBA, L. R.; MALABARBA, M. C. Phylogeny and classification of Neotropical fish. In: **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish**. p. 1-19, Academic Press, 2020.

MALM, O. Gold Mining as a Source of Mercury Exposure in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, v. 77, p. 73–78, 1998.

MALM, O.; BRANCHES, F. J. P.; AKAGI, H.; CASTRO, M. B.; PFEIFFER, W. C.; HARADA, M.; BASTOS, W. R.; KATO, H. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 175, p. 141–150, 1995.

MILLER, I. Protein Separation Strategies. In: ECKERSALL, D. P.; WHITFIELD, P. D. (Eds.). **Methods in Animal Proteomics**. Oxford: John Wiley & Sons, 2011. p. 41–76.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Dietary intake of inorganic mercury: bioaccumulation and oxidative stress parameters in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology**, v. 22, p. 446–456, 2013.

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: The concept and methodology. **Chem Soc Rev**, v. 38, p. 1119–1138, 2009.

NAIR, M. N.; ZHAI, C. Application of proteomic tools in meat quality evaluation. In: BISWAS, A. K.; MANDAL, P. K. (Eds.). **Meat Quality Analysis: Advanced Evaluation Methods, Techniques, and Technologies**. Chennai: Academic Press, 2020. p. 353–368.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

NEUBERGER, A. L.; MARQUES, E. E.; AGOSTINHO, C. S.; OLIVEIRA, R. J. Reproductive biology of *Rhaphiodon vulpinus* (Ostariophysi: Cynodontidae) in the

Tocantins River Basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 5, p. 479-484, 2007.

OLVER, C. Types of Sample and Experimental Planning. In: ECKERSALL, P. D.; WHITFIELD, P. D. (Eds.). **Methods in Animal Proteomics**. Oxford: John Wiley & Sons, 2011. p. 11–39.

PACHECO, A. C.; BARTOLETTE, R.; CALUCA, J. F.; DE CASTRO, A. L. M.; ALBRECHT, M. P.; CARAMASCHI, E. P. Dinâmica alimentar de *Rhaphiodon vulpinus* Agassiz, 1829 (Teleostei, Cynodontidae) no alto Rio Tocantins (GO) em relação ao represamento pela UHE Serra da Mesa. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 1, 2009.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Técnicas de biologia molecular. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Eds.). **Biologia Molecular Básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 331–362.

PASSOS, C. J. S.; MERGLER, D.; LEMIRE, M.; FILLION, M.; GUIMARÃES, J. R. D. Fish consumption and bioindicators of inorganic mercury exposure. **Science of The Total Environment**, v. 373, p. 68–76, 2007.

PASSOS, C. J. S.; SILVA, D. S.; LEMIRE, M.; FILLION, M.; GUIMARÃES, J. R. D.; LUCOTTE, M.; MERGLER, D. Daily mercury intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 18, p. 76–87, 2008.

PENGLASE, S.; HAMRE, K.; ELLINGSEN, S. Selenium and mercury have a synergistic negative effect on fish reproduction. **Aquatic Toxicology**, v. 149, p. 16–24, 2014.

RABITTO, I. S.; BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ANJOS, A.; HOLANDA, Í. B. B.; GALVÃO, R. C. F.; NETO, F. F.; MENEZES, M. L.; SANTOS, C. A. M.; OLIVEIRA, C. A. R. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environment International**, v. 37, p. 56–65, 2011.

RALSTON, N. V. C.; RAYMOND, L. J. Mercury's neurotoxicity is characterized by its disruption of selenium biochemistry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1862, p. 2405–2416, 2018.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; SAINT-AUBIN, A.; TRAN, S.; RHÉAULT, I.; FARELLA, N.; JESUS, E. S.; DEZENCOURT, J.; PASSOS, C. J. S.; SANTOS-SOARES, G.; GUIMARÃES, J. R. D.; MERGLER, D.; AMORIM, M. The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chão formation of the lower Tapajós River Valley, Pará state, Brazil¹The present investigation is part of an ongoing study, the CARUSO project (IDRC-UFPa-UQAM), initiated to. **Science of The Total Environment**, v. 223, p. 1–24, 1998.

ROZZI, R.; PRIMACK, R.; FEINSINGER, P.; DIRZO, R.; MASSARDO, F. Qué es la biología de la conservación? In: **Fundamentos de conservación biológica**. Perspectivas latinoamericanas. Fondo de Cultura Económica. México, 2001.

SAMPAIO, D. S.; LUCOTTE, M.; PAQUET, S.; BRUX, G.; LEMIRE, M. Inverse mercury and selenium concentration patterns between herbivorous and piscivorous fish in the Tapajos River, Brazilian Amazon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 97, p. 17–25, 2013.

SANTOS, F. A.; LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; PÉREZ, C. A.; SILVA, M. O. A.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Metallomic study on plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: initial results. **Mikrochimica Acta**, v. 173, p. 43-49, 2011.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: INPA, p. 57, 2009. ISBN 978-85-211-0049-2.

SCHLENK, D. Necessity of Defining Biomarkers for Use in Ecological Risk Assessments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, p.48–53, 1999.

SILVA, F. A. (2009) **Selênio em tilápia do nilo utilizando eletroforese em gel e espectrometria atômica**.

SINAIE, M.; BASTAMI, K. D.; GHORBANPOUR, M.; NAJAFZADEH, H.; SHEKARI, M.; HAGHPARAST, S. Metallothionein biosynthesis as a detoxification mechanism in mercury exposure in fish, spotted scat (*Scatophagus argus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 1235–1242, 2010.

SIQUEIRA-SOUZA, F. K.; FREITAS, C. E. C. Fish diversity of floodplain lakes on the lower stretch of the Solimões River. **Brazilian Journal os Biology**, v. 64, p. 501-510, 2004.

SISCAR, R.; KOENIG, S.; TORREBLANCA, A.; SOLÉ, M. The role of metallothionein and selenium in metal detoxification in the liver of deep-sea fish from the NW Mediterranean Sea. **Science of The Total Environment**, v. 466, p. 898–905, 2014.

SORMO, E. G.; CIESIELSKI, T. M.; OVERJORDET, I. B.; LIERHAGEN, S.; EGGEN, G. S.; BERG, T.; JENSSEN, B. M. Selenium moderates mercury toxicity in free-ranging freshwater fish. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 6561–6566, 2011.

TOLEDO-PIZA, M. The Neotropical fish subfamily Cynodontinae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic study and a revision of Cynodon and Rhamphodon. **American Museum Novitates**, p. 1-88, 2000.

VARI, R. P. Family Curimatidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (eds) **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Brazil: Edipucrs, p. 51-64, 2003.

VEIGA, M. M.; MEECH, J. A.; OÑATE, N. Mercury pollution from deforestation. **Nature**, v. 368, p. 816–817, 1994.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; EVANGELISTI, V.; MOZZONE, S.; DONDERO, F. (2001). Sensitivity and specificity of metallothionein as a biomarker for aquatic environment biomonitoring. In P. Garrigues, H. Barth, C. H. Walker, & J. F. Narbonne (Eds.), **Biomarkers in Marine Organisms** (p. 29–43). Elsevier Science.

VISPO, N. Proteómica. In: **Combinatoria Molecular**. Cuba, 2004.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor & Francis, 1996. 321p.

WHO. (1990). **Environmental Health Criteria 101 Methylmercury** (World Health Organization (ed.); Vol.101.WH).

ZHANG, Y.; FONSLow, B. R.; SHAN, B.; BAEK, M, C.; YATES, J. R. Protein analysis by *Shotgun*/bottom-up proteomics. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 2343–2394, 2013.

CAPÍTULO II

Abordagem metalômica de mercúrio e selênio em tecido hepático de *Psectrogaster amazonica* e *Raphiodon vulpinus* da Amazônia brasileira

Resumo

O presente trabalho reporta os resultados do estudo metalômico do mercúrio (Hg) e selênio (Se) no tecido hepático das espécies *Psectrogaster amazonica* (Branquinha) e *Raphiodon vulpinus* (Cachorra) do rio Madeira, Rondônia/Brasil. Para isso, foram utilizadas como estratégias experimentais a associação das técnicas espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) - eletroforese bidimensional (2D PAGE) - espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC – MS/MS). Com base nas concentrações de mercúrio e selênio (C_{Hg} e C_{Se}) determinadas por GFAAS foram calculadas as razões molares Hg:Se e Se:Hg e posteriormente os valores de Se para benefícios da saúde (Se HBVs). Os valores da Se:Hg foram maiores que um para as duas espécies de peixes, enquanto os Se HBVs foram maiores que cinco para *Psectrogaster amazonica* e maiores que dez para *Raphiodon vulpinus*, indicando assim, que as duas espécies de peixes apresentam no tecido hepático reserva de selênio necessária para controlar os efeitos tóxicos do Hg. Os dados metaloproteômicos permitiram identificar nas duas espécies de peixe nove *spots* proteicos associados ao Hg e Se, com concentrações na faixa de $9,70 \pm 0,14$ a $28,44 \pm 0,31$ mg kg⁻¹ e $16,15 \pm 0,21$ de Hg e $43,12 \pm 0,51$ mg kg⁻¹ de Se. As análises por LC - MS/MS identificaram quatro *metal binding proteins (MBP)* nos *spots* proteicos associadas ao Hg e Se no proteoma hepático de *Psectrogaster amazonica* e cinco de *Raphiodon vulpinus*, indicando a possível formação de complexos Hg-Se na estrutura das *MBP*, e que a ligação com Se poderia mitigar os efeitos tóxicos do Hg. Análises de atividades das enzimas CAT, SOD e GPx, e de LPO (Catalase, Superóxido Dismutase, Glutathione Peroxidase, e lipoperoxidação de lipídeos respectivamente), demonstraram não ocorrência de estresse oxidativo induzido pela concentração de Hg, o que corrobora com os dados metaloproteômicos.

Palavras-chave: Hg e Se em peixes amazônicos; *metal binding proteins*; Hg-associated protein; Se-associated protein; metaloproteômica.

1. Introdução

O mercúrio (Hg) é altamente tóxico e se acumula ao longo da cadeia trófica, representando um risco para os consumidores de topo, como os seres humanos (Clarkson; Magos, 2006). Na Amazônia, tanto a atividade de garimpo de ouro quanto fontes naturais contribuem para a contaminação por mercúrio (Malm, 1998; Malm *et al.*, 1995; Fadini; Jardim, 2001; Roulet *et al.*, 1998). O consumo de peixes é a principal fonte de contaminação em populações humanas na região, especialmente aquelas que vivem em áreas remotas e dependem dos peixes como fonte principal de proteína na dieta (Lacerda; Malm, 2008; Veiga *et al.*, 1994; Dórea, 2004; Passos *et al.*, 2008). Estudos mostraram uma correlação positiva entre o consumo de peixes e as concentrações de mercúrio encontradas em cabelo e no sangue de populações humanas na Amazônia, aumentando o risco para essas populações (Dórea; Marques, 2016; Faial *et al.*, 2015; Passos *et al.*, 2007). Além disso, o mercúrio afeta a saúde e reprodução dos peixes, o que pode levar à redução dos estoques pesqueiros e impactar negativamente as comunidades ribeirinhas (Bataglioli *et al.*, 2019).

O selênio, por suas propriedades antioxidantes, é sugerido como um possível contribuinte para a tolerância aparente ao mercúrio em organismos. A ação do selênio na desintoxicação do organismo em relação ao mercúrio tem sido reportada, indicando que este mineral pode desempenhar papel crucial na proteção contra os efeitos deletérios do mercúrio (Lemire *et al.*, 2006; Kaneko; Ralston, 2007; Yang *et al.*, 2008; Ralston; Raymond, 2018). Especificamente em relação a peixes, a literatura reporta que o selênio pode reduzir a toxicidade de espécies mercuriais no organismo desses animais, devido à sua maior afinidade com o mercúrio em comparação ao enxofre (Sormo *et al.*, 2011; Lino *et al.*, 2018). Organismos com uma razão Se:Hg maior que 1 apresentam uma redução nos efeitos tóxicos do mercúrio (Siscar *et al.*, 2014; Sormo *et al.*, 2011). Assim, a alta afinidade de ligação Se e Hg pode diminuir a biodisponibilidade do mercúrio e possivelmente a sua toxicidade aos organismos (Lino *et al.*, 2018).

Apesar da literatura disponibilizar diversos trabalhos que reportam os efeitos tóxicos das espécies mercuriais em organismos humanos e de animais, estudos que discutem os possíveis mecanismos do efeito antagônico do selênio em relação aos efeitos deletérios do mercúrio, ainda são escassos (Tomza-Marciniak *et al.*, 2023). A metalômica, linha de investigação científica relativamente nova, por englobar estratégias experimentais de química analítica com estratégias bioquímicas e biologia molecular,

1 permite identificar proteínas associadas com espécies mercuriais no proteoma de
2 diferentes organismos, como por exemplo em organismos de peixes (Bittarello *et al.*,
3 2020, Vieira *et al.*, 2023). Nesse contexto, a metalômica pode gerar informações
4 importantes em relação aos mecanismos relacionados com o efeito protetor do selênio
5 sobre os efeitos tóxicos do mercúrio, porque permite a identificação de proteínas
6 associadas ao Hg e Se com diferenças de abundância relativa no proteoma estudado
7 (Almeida *et al.*, 2023, Mellingen *et al.*, 2023).

8 Assim, com base no exposto o presente manuscrito reporta os resultados obtidos
9 no estudo metalômico do mercúrio e selênio em tecido hepático dos peixes Amazônicos
10 *Psectrogaster amazonica* (espécie não predadora) e *Raphiodon vulpinus* (espécie
11 predadora). Ambas as espécies de peixes foram coletadas no rio Madeira, estado de
12 Rondônia/Brasil, rio que nas últimas década foi impactado por mercúrio devido às
13 atividades de garimpo de ouro (Bittarello *et al.*, 2019, Bataglioli *et al.*, 2022).

14 2. Material e métodos

15 2.1. Animais experimentais, coleta de amostras e processamento

16 Foram coletados e conservados em nitrogênio líquido amostras de tecidos
17 hepáticos de oito indivíduos da espécie de peixe *Psectrogaster amazonica* (branquinha)
18 e oito indivíduos da espécie *Raphiodon vulpinus* (cachorra) na área de influência do
19 reservatório da Usina Hidrelétrica de Jirau no estado de Rondônia/Brasil. Os pontos de
20 coletas foram: a) (S 09°47'18,3''; W 065°31'12,4''), b) S 09° 41'0,06''; WE 064°
21 58'43.9'' e c) S 09°16'12,8''; W 064°41'14''), localizados no rio Madeira (Bittarello *et*
22 *al.*, 2020, Bataglioli *et. al.*, 2022). Os peixes foram coletados considerando o tamanho e
23 peso das espécies (CEUA (Comissão de Ética no uso Animal), protocolo nº 0316/2023),
24 com malhadeiras pela equipe de biólogos da Empresa ESBR (Empresa Energia
25 Sustentável do Brasil), anestesiados com benzocaína (100 mg L⁻¹) e posteriormente
26 eutanasiados por miotomia, para realização de biometria e coleta de amostras de tecidos.

28 2.2. Determinações de mercúrio e selênio

29 As determinações das concentrações de mercúrio e selênio total (C_{Hgtotal} e C_{Setotal})
30 nas amostras de tecido hepático, *pellets* e *spots* proteicos foram feitas por espectrometria
31 de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) conforme procedimento descrito por
32

Silva *et al.*, (2007), Moraes *et al.*, (2013), Braga *et al.*, (2015), Queiroz *et al.*, (2018). Resumidamente, o procedimento consiste em mineralizar as amostras utilizando mistura de ácido sulfúrico concentrado com peróxido de hidrogênio 30% (m/m) utilizando banho de aquecimento assistido por ultrassom. Os extratos ácidos obtidos foram avolumados para 5,00 mL em balões volumétricos. Para manter a estabilização térmica do mercúrio e selênio na temperatura de atomização, foi utilizada a combinação de tungstênio como modificador químico permanente e zircônio como modificador químico coinjectado junto com a amostra no tubo de grafite. As determinações foram feitas utilizando espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU AA-6800 equipado com corretor de *background* com sistema *self-reverse* (SR) e lâmpada de deutério, tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático AS6100. Todas as determinações Hg_{total} e Se_{total} foram validadas por análises do material de referência certificado DOLT 4 (fígado de peixe) do National Research Council of Canada (NRC).

Os resultados das determinações de Hg_{total} e Se_{total} nas amostras de tecido hepático de oito indivíduos da espécie *Psectrogaster amazonica* e oito da *Raphiodon vulpinus*, permitiram calcular a razão Hg;Se e Se;Hg, como também os valores de Se para benefícios da saúde - Se HBVs (Lino *et al.*, 2018). Com base nos dados obtidos foi possível separar dois grupos da espécies *Psectrogaster amazonica* e *Raphiodon vulpinus* considerando às concentrações totais menores e maiores de mercúrio e selênio: *Psectrogaster amazônica*: Pa-HgSe 1 - $< C_{Hg_{total}}$ e $C_{Se_{total}}$, Pa-HgSe 2 - $> C_{Hg_{total}}$ e $C_{Se_{total}}$; *Raphiodon vulpinus*: Rv-HgSe 1 - $< C_{Hg_{total}}$ e $C_{Se_{total}}$, Rv-HgSe 2 - $> C_{Hg_{total}}$ e $C_{Se_{total}}$.

2.3. Fracionamento do proteoma hepático por 2D PAGE

O fracionamento do proteoma hepático das espécies *Psectrogaster amazonica* e *Raphiodon vulpinus* foi obtido por 2D PAGE. Para isso, *pools* das amostras foram feitos considerando a concentração de mercúrio e selênio por indivíduo nas espécies de peixes. Assim, com base nas concentrações de Hg_{total} e Se_{total} por indivíduo foram elaborados dois grupos de *pools* em ordem crescente de concentração (grupo 1 – menor concentração de Hg e Se e grupo 2 – maior concentração de Hg e Se) para as duas espécies de peixes. A extração da fração proteica das amostras de tecido hepático foi feita com tampão Tris-HCl pH 8,80 em condição desnaturante conforme procedimento descrito por Braga *et al.* (2015), utilizando disruptor de células OMNI/Analítica. Para remover os concomitantes dos extratos proteicos, que podem interferir no processo de fracionamento dos proteomas,

utilizou-se a estratégia de precipitação total, utilizando solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção de 1:4 (amostra:acetona), para obtenção dos *pellets* proteicos (Lima *et al.*, 2010). Os procedimentos experimentais do fracionamento dos proteomas hepáticos por 2D PAGE são descritos a seguir: Focalização isoeletrica (IEF) - etapa na qual o fracionamento das proteínas ocorre pelo ponto isoeletrico (pI). Os *pellets* proteicos obtidos no processo de precipitação total foram solubilizados em solução desnaturante e redutora (Santos *et al.*, 2011). Três fitas de IEF de 13 cm (gradiente de pH 3 a 10) foram hidratadas com 250 µL de extratos proteicos (obtidos na solubilização dos *pellets* proteicos e diluídos para conter 375 µg de proteína) em suas respectivas canaletas, na caixa de hidratação e cobertas com óleo mineral para evitar a evaporação da solução de amostra (Santos *et al.*, 2011). A caixa de hidratação foi fechada e mantida por 12 horas em temperatura ambiente. Após serem devidamente hidratadas, as fitas foram transferidas para o sistema de focalização isoeletrica Amersham Biosciences EPS 1001 (Uppsala, Sweden) para a corrida eletroforética de primeira dimensão, utilizando procedimento descrito por Santos *et al.*, 2011. O tempo de corrida foi 4 horas e 30 minutos. Após a etapa de focalização isoeletrica as fitas IEF foram reidratadas com duas soluções. Na primeira foi utilizada 12 mL de uma solução contendo ureia 6 mol L⁻¹, SDS 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8.8) azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 2% (m/v), para manter as proteínas nas formas desnaturadas e reduzidas. Posteriormente, uma solução semelhante a anterior, mas substituindo-se o DTT por iodoacetamida 2,50 % (m/V), foi utilizada para promover a alquilação dos grupos tióis e assim, evitar a reoxidação das proteínas. O tempo de contato das duas soluções com as fitas IEF, sob leve agitação em mesa agitadora, foi de 15 minutos. Em seguida, a segunda etapa da corrida 2D PAGE, na qual o fracionamento das proteínas ocorre em função da massa molecular, foi realizada utilizando sistema 2D PAGE GE Healthcare Ettan™ DALT six (Uppsala, Sweden) e as condições experimentais descritas por Lima *et al.*, 2010 e Santos *et al.*, 2011.

Após o término das corridas 2D PAGE, as proteínas foram fixadas nos géis utilizando solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40 % (v/v) e posteriormente, os spots proteicos foram revelados com o corante Coomassie coloidal. Após a etapa de revelação dos spots proteicos, os géis foram escaneados e as imagens analisadas utilizando o software *ImageMaster 2D Platinum* e os procedimentos descritos por Moraes *et al.*, 2012.

2.4. Caracterização dos spots proteicos associados ao Hg e Se

Os spots proteicos associados ao mercúrio e selênio foram extraídos dos géis com auxílio de bisturi, recortados em segmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos para microtubos contendo 1 mL de ácido acético 5% (v/v) e submetidos às seguintes etapas (Bataglioli *et al.*, 2019; Bittarello *et al.*, 2020, Vieira *et al.*, 2023): remoção do corante, redução e alquilação das proteínas e digestão triptica utilizando solução de tripsina 10 ng mL⁻¹. Os extratos contendo os peptídeos foram transferidos para novos vials e concentrados a aproximadamente 12 µL em equipamento da Thermo Scientific. Os extratos concentrados foram em seguida passados em colunas C18 ZipTip para limpeza dos peptídeos e armazenados a -20 °C.

Análises de caracterização dos proteomas foi feita no sistema nano ACQUITY UPLC-Xevo QTOF-MS equipado com ionização por electrospray (Waters, UK), coluna HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 Waters) e operado em modo de íon positivo (Shevchenko *et al.*, 2006). Os dados obtidos dos espectros de massas foram processados e analisados pelo software “Progenesis QI” e com consulta ao banco de dados Uniprot e a ordem de peixes Otophysi, para identificação das proteínas (Bataglioli *et al.*, 2019; Bittarello *et al.*, 2020, Vieira *et al.*, 2023).

2.5. Análises dos parâmetros relacionados com estresse oxidativo

Para a análise de indício de danos a lipídeos e proteínas celulares que resultam de estresse oxidativo, 0,20 g de tecido hepático de cada indivíduo dos quatro grupos de maior e menor C_{Hgtotal} e C_{Setotal} de *Psectrogaster amazônica* e *Raphiodon vulpinus*, foram homogeneizadas utilizando disruptor de célula em tampão fosfato de sódio (0,01 mol L⁻¹; pH 7.0). Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 12000xg por 30 minutos a 4°C e os sobrenadantes obtidos foram utilizados para as determinações de lipoperoxidação de lipídeos (LPO) e das atividades de glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

Na determinação de LPO foi utilizado procedimento descrito por Jiang *et al.*, (1991), que consiste na oxidação de íons Fe²⁺ a Fe³⁺ por lipoperóxido (LOOH) em pH ácido, na presença de indicador metalocrômico alaranjado de xilenol. O alaranjado de xilenol forma complexo com íons Fe³⁺ oxidados, que absorve radiação visível em 560 nm, proporcional a concentração de LOOH.

A atividade de GPx foi realizada por determinação indireta, que se baseia na oxidação da glutathiona reduzida (GSH). A glutathiona oxidada (GSSG) catalisada pela GPx forma ligação de acoplamento por ponte dissulfeto entre duas GSH (GS-GS) que volta ao estado reduzido produzindo 2GSH pela ação da glutathiona redutase (GR) e NADPH (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, reduzida). A redução da absorbância do NADPH medida por espectrofotometria em 340 nm durante a oxidação de NADPH a NADP^+ , indica a atividade da GPx, considerando-se que a GPx é fator limitante da velocidade das reações de acoplamento (Erden; Bor, 1984).

A atividade da SOD foi determinada pela técnica de espectrofotometria de Crouch *et al.*, 1981, tendo como base a capacidade da enzima inibir a redução do nitrobluetetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em pH 10. Atividade de catalase (CAT) foi medida pela observação espectrofotométrica do decréscimo na absorbância do peróxido de hidrogênio a 240 nm.

O ensaio foi executado em um curto período de tempo (trinta segundos), pois a concentração do peróxido de hidrogênio (10 mmol L^{-1}) é inferior ao KM do sistema ($1,20 \text{ mol L}^{-1}$). Por definição, uma unidade de catalase decompõe $1,0 \text{ }\mu\text{mol}$ de peróxido de hidrogênio a oxigênio molecular e água por 20 minuto, em pH 7,0 e a 25°C (Beutler, 1975). As análises de quantificação de proteína total nos extratos proteicos, necessárias para o cálculos das atividades das enzimas do sistema antioxidante e da concentração de LPO foram realizadas utilizando o método de Biureto (Doumas *et al.*, 1981), descrito resumidamente a seguir: uma curva analítica com concentrações de 5 a 50 gL^{-1} foi construída a partir de uma solução estoque padrão contendo 100 g L^{-1} de albumina de soro bovina (BSA). Para análise das amostras utilizou-se alíquotas de $25 \text{ }\mu\text{L}$ dos extratos proteicos diluídas em $25 \text{ }\mu\text{L}$ de NaOH $0,50 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente, em *vials* de $5,00 \text{ mL}$ foram transferidos, $50 \text{ }\mu\text{L}$ de padrão de proteína e/ou extrato proteico e $2,50 \text{ mL}$ do reagente Biureto. A mistura padrão e/ou amostra com o reagente foi mantida a 32°C em banho-maria por 10 min. Depois desse tempo de reação, as leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 545 nm.

2.6. Análises estatísticas

O software *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare) foi utilizado para analisar as imagens dos géis 2D PAGE, conforme descrito por Moraes *et al.*, 2012. As determinações de mercúrio foram expressas em $M \pm SD$ e submetidas ao teste t de Student

e teste F para identificar quaisquer diferenças significativas usando o software SAS (versão 8). Em relação aos dados das análises de atividade da CAT, SOD e GPx, e das concentrações de LPO, foi utilizado o teste de Correlação de Spearman para avaliar a correlação desses parâmetros com as $C_{Hg_{total}}$ e $C_{Se_{total}}$ (Bittarello *et al.*, 2020). Os dados proteômicos foram analisados usando o software do espectrômetro nanoAcquity UPLC Xevo QToF MS Protein Lynx Global Server (PLGS) (Vieira *et al.*, 2023).

3. Resultados e discussão

3.1. Determinação de Hg_{total} e Se_{total}

Os resultados obtidos nas determinações de Hg_{total} e Se_{total} estão sumarizados nas Tabelas 1 a 3.

Tabela 1. Concentração de Hg_{total} e Se_{total} em amostras de tecido hepático de *Psectrogaster amazonica*.

<i>Psectrogaster amazonica</i> / NRC	Hg_{total} ($\mu g\ kg^{-1}$)	Se_{total} ($\mu g\ kg^{-1}$)
1	84,50 $\pm$ 2,500	126,6 $\pm$ 2,500
2	122,4 $\pm$ 3,040	149,3 $\pm$ 2,700
3	81,10 $\pm$ 0,9000	121,8 $\pm$ 2,200
4	123,5 $\pm$ 1,700	152,1 $\pm$ 2,800
5	120,9 $\pm$ 2,830	147,5 $\pm$ 2,600
6	86,70 $\pm$ 3,250	128,1 $\pm$ 2,300
7	87,80 $\pm$ 4,240	129,4 $\pm$ 2,400
8	125,5 $\pm$ 2,620	153,7 $\pm$ 2,800
<i>DOLT-4</i>	2,530 $\pm$ 0,04430*	8,110 $\pm$ 0,1403*

*Concentração - $mg\ kg^{-1}$; DOLT-4 (Valor Certificado - $mg\ kg^{-1}$); C_{Hg} = 2,580 $\pm$ 0,2200; C_{Se} = 8,300 $\pm$ 1,300

Tabela 2. Concentração de Hg_{total} e Se_{total} em amostras de tecido hepático de *Raphiodon vulpinus*.

<i>Raphiodon vulpinus</i> / NRC	Hg_{total} ($\mu g\ kg^{-1}$)	Se_{total} ($\mu g\ kg^{-1}$)
1	143,2 $\pm$ 2,600	244,3 $\pm$ 4,400
2	586,6 $\pm$ 10,70	726,6 $\pm$ 12,80
3	136,4 $\pm$ 2,200	231,2 $\pm$ 3,900
4	146,5 $\pm$ 2,700	249,1 $\pm$ 4,600
5	555,6 $\pm$ 9,900	666,8 $\pm$ 11,30
6	645,9 $\pm$ 11,60	775,1 $\pm$ 13,20
7	156,8 $\pm$ 2,800	265,2 $\pm$ 4,700
8	528,3 $\pm$ 9,400	644,2 $\pm$ 10,90
<i>DOLT-4</i>	2,519 $\pm$ 0,04836*	8,122 $\pm$ 0,1535*

*Concentração - $mg\ kg^{-1}$; DOLT-4 (Valor Certificado - $mg\ kg^{-1}$); C_{Hg} = 2,580 $\pm$ 0,2200; C_{Se} = 8,300 $\pm$ 1,300

As determinações de Hg_{total} e Se_{total} foram feitas em oito amostras de tecido hepático e nos *pools* de *pellets* proteicos de *Psectrogaster amazônica* e *Raphiodon vulpinus*. No caso, as determinações foram feitas no fígado extraído de 8 indivíduos separando-se três massas de aproximadamente 100 mg de tecido hepático, após a mineralização das amostras as determinações foram feitas por GFAAS conforme procedimento descrito por Moraes *et al.*, 2013 e Silva *et al.*, 2007 (item 2.3). Em relação aos *pellets* proteicos, a extração e precipitação da fração foi feita em quatro *pools* de amostras de tecido hepático, no caso, um *pool* com amostras dos indivíduos com $< C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$ um *pool* com amostras dos indivíduos de $> C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$, para as duas espécies de peixes, perfazendo um total de quatro *pools*.

Os resultados apresentados na Tabela 1 e 2 permitem separar em função das $C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$ dois grupos de indivíduos para as duas espécies de peixes, um grupo com menor $C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$ e outro com maior $C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$. Assim, para a espécie *Psectrogaster amazônica* o grupo de indivíduos 1, 3, 6 e 7 apresentaram menor concentração média de Hg_{total} e Se_{total} , no caso, $85,80 \pm 2,602 \mu g kg^{-1}$ e $127,6 \pm 3,184 \mu g kg^{-1}$ respectivamente. Esse grupo foi denominado *Pa-HgSe 1* ($< C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$). O grupo de indivíduos 2, 4, 5 e 8 de *Psectrogaster amazônica* apresentaram concentrações médias de $123,1 \pm 1,936 \mu g kg^{-1}$ e $150,7 \pm 2,800 \mu g kg^{-1}$ de Hg_{total} e Se_{total} , concentrações estas superiores às do grupo *Pa-HgSe 1*. Esse grupo foi denominado *Pa-HgSe 2* ($> C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$). Em relação à espécie *Raphiodon vulpinus*, os resultados das concentrações médias de Hg_{total} e Se_{total} também permitiram montar dois grupos distintos. Grupo dos indivíduos 1, 3, 4 e 7, denominado *Rv-HgSe 1*, com $< C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$ (concentrações médias de Hg_{total} e $Se_{total} = 145,4 \pm 7,394 \mu g kg^{-1}$ e $242,7 \pm 12,20 \mu g kg^{-1}$, respectivamente). E um segundo grupo, denominado *Rv-HgSe 2*, formado pelos indivíduos 2, 5, 6 e 8 de *Raphiodon vulpinus*, grupo que apresentou $>$ concentração média de Hg_{total} e Se_{total} (concentrações médias de Hg_{total} e $Se_{total} = 571,7 \pm 46,73 \mu g kg^{-1}$ e $692,7 \pm 56,40 \mu g kg^{-1}$, respectivamente). Os valores das concentrações de Hg_{total} e Se_{total} permitiram calcular a razão molar Hg:Se e Se:Hg para os quatro grupos de indivíduos das espécies *Psectrogaster amazonica* e *Raphiodon vulpinus*. Os valores médios da razão molar Hg:Se e Se:Hg são apresentados a seguir: Grupo *Pa-HgSe 1* (*Psectrogaster amazonica* com $<$ concentração de Hg_{total} e Se_{total}) - Hg:Se = 0,27, Se:Hg = 3,8; Grupo *Pa-HgSe 2* (*Psectrogaster amazonica* com $> C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$) - Hg:Se = 0,31, Se:Hg = 3,1; Grupo *Rv-HgSe 1* (*Raphiodon vulpinus* com $< C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$) - Hg:Se = 0,24, Se:Hg = 4,2; Grupo *Rv-HgSe 2* (*Raphiodon vulpinus* com $> C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$) - Hg:Se = 0,33, Se:Hg =

3,0. A partir dos valores médios da razão molar Hg:Se e Se:Hg foram calculados os valores de Se para benefícios da saúde - Se HBV, utilizando a equação 1 (Lino *et al.*, 2018).

$$\text{Se HBV} = (\text{molar ratio Se:Hg} \times \text{Se} (\mu\text{mol kg}^{-1})) - (\text{molar ratio Hg:Se} \times \text{Se} (\mu\text{mol kg}^{-1})) \quad (1)$$

Os resultados calculados para a Se HBV são apresentados a seguir: Grupo *Pa-HgSe* 1 (*Psectrogaster amazonica* com < concentração de Hg_{total} e Se_{total}) – Se HBV = 6,04; Grupo *Pa-HgSe* 2 (*Psectrogaster amazonica* com > concentração de Hg_{total} e Se_{total}) – Se HBV = 5,73; Grupo *Rv-HgSe* 1 (*Raphiodon vulpinus* com < concentração de Hg_{total} e Se_{total}) – Se HBV = 12,73 e Grupo *Rv-HgSe* 2 (*Raphiodon vulpinus* com > concentração de Hg_{total} e Se_{total}) – Se HBV = 25,4. Observa-se que os valores calculados para a razão molar Se:Hg são maiores que 1 para as duas espécies de peixes, e os valores calculados para Se HBV maiores que 5 para os dois grupos da espécie *Psectrogaster amazonica* e maior que 10 para os dois grupos da espécie *Raphiodon vulpinus*. Esses resultados mostram que tanto a espécie não carnívora *Psectrogaster amazonica* quanto a espécie carnívora *Raphiodon vulpinus* apresentam no tecido hepático reserva de selênio (base mole) para formar ligações com espécies mercuriais (ácidos moles) formando complexos Se-Hg (Pearson, 1963). Com base nos resultados obtidos nas determinações de Hg_{total} e Se_{total} no tecido hepático das espécies *Psectrogaster amazonica* e *Raphiodon vulpinus*, foi feita a extração da fração proteica de um pool de tecido hepático dos grupos *Pa-HgSe* 1, *Pa-HgSe* 2, *Rv-HgSe* 1 e *Rv-HgSe* 2, e posteriormente as determinações de Hg_{total} e Se_{total} nos respectivos *pellets* proteicos por GFAAS. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração de mercúrio e selênio total em *pellets* proteicos de tecido hepático de *Psectrogaster amazonica* e *Raphiodon vulpinus*.

Identificação	Concentração (Hg-total) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração (Se-total) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
<i>Pellet-Pa-HgSe</i> 1	81,44±1,341	121,6±2,100
<i>Pellet-Pa-HgSe</i> 2	118,2±1,824	148,5±2,314
<i>Pellet- Rv-HgSe</i> 1	137,8±2,243	237,6±3,971
<i>Pellet- Rv-HgSe</i> 2	564,6±8,522	679,4±9,342
<i>DOLT-4</i>	2,514±0,04091*	8,115±0,1393*

Pa-HgSe 1 – grupo de indivíduos da espécie *Psectrogaster amazonica* com < [Hg-total] e [Se-total]; *Pa-HgSe* 2 – grupo de indivíduos da espécie *Psectrogaster amazonica* com > [Hg-total] e [Se-total]; *Rv-HgSe* 1 – grupo de indivíduos da espécie *Raphiodon vulpinus* com < [Hg-total] e [Se-total]; *Rv-HgSe* 2 – grupo de indivíduos da espécie *Raphiodon vulpinus* com > [Hg-total] e [Se-total]; *Concentração - mg kg⁻¹; *DOLT-4* (Valor Certificado - mg kg⁻¹); C_{Hg} = 2,580 ± 0,2200; C_{Se} = 8,300±1,300.

Observa-se que as concentrações de Hg_{total} e Se_{total} determinadas nos *pellets* proteicos dos grupos *Pa*-HgSe 1 e *Pa*-HgSe 2, *Rv*-HgSe 1 e *Rv*-HgSe 2 estão de acordo com os resultados obtidos nas determinações nas amostras de tecido hepático. No caso, as concentrações de Hg_{total} e Se_{total} são maiores nos grupos *Pa*-HgSe 2 e *Rv*-HgSe 2 comparadas aos grupos *Pa*-HgSe 1 e *Rv*-HgSe 1.

Os *pellets* proteicos obtidos na extração das frações proteicas dos *pools* dos quatro grupos foram utilizados para fracionamento por 2D PAGE do proteoma hepático das espécies *Psectrogaster amazônica* e *Raphiodon vulpinus*. Os resultados das determinações de Hg_{total} e Se_{total} no material de referência certificado DOLT-4 (Fígado de peixe) apresentaram porcentagem de recuperação de aproximadamente 98 % e desvio padrão relativo menor que dois, o que comprova a robustez do método utilizado nas determinações de Hg_{total} e Se_{total} (Vieira *et al.*, 2023, Almeida *et al.*, 2024).

3.2. Fracionamento do proteoma hepático por 2D PAGE

A Figura 1 mostra um exemplo de gel obtido da análise em triplicata por 2D PAGE dos *pools* de amostras de tecido hepático dos grupos *Pa*-HgSe 2 e *Rv*-HgSe 2. A caracterização das proteínas nos *spots* proteicos associados ao Hg e Se foi feita por LC-MS/MS (Vieira *et al.*, 2023). Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 4.

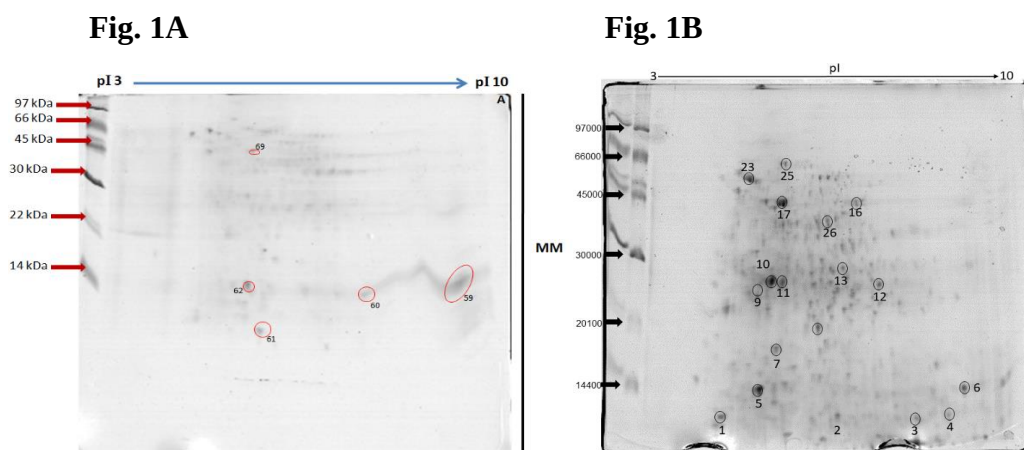


Figura 1 - Gel 2D PAGE dos grupos *Pa*-HgSe 2 e *Rv*-HgSe 2 obtidos no fracionamento do proteoma hepático de *Psectrogaster amazônica* (Figura A) e *Raphiodon vulpinus* (Figura B). Nos *spots* destacados com círculo, as determinações por GFAAS indicaram a presença de Hg e/ou Se.

Tabela 4. Proteínas associadas ao mercúrio e selênio nos *spots* proteicos dos géis dos tecidos hepático de *Psectrogaster amazônica* e *Raphiodon vulpinus*.

ID. spots	Protein Accession	Protein Description	Protein Score	C _{Hg} (mg kg ⁻¹)	C _{Se} (mg kg ⁻¹)
<i>Psectrogaster amazônica</i>					
59	P02140	Hemoglobin subunit betha	2527.965	9,70±0,14	16,15±0,21
	P02018	Hemoglobin subunit alpha	188.4514		
60	P02017	Hemoglobin subunit alpha	2305.963	17,24±0,23	33,41±0,39
	P02140	Hemoglobin subunit betha	1368.896		
	P80856	Fatty acid-binding protein_liver	1131.812		
61	P80856	Fatty acid-binding protein_liver	1522.318	19,72±0,25	35,44±0,43
	Q9I8L5	Fatty acid-binding protein 10-A_liver basic	1214.747		
<i>Raphiodon vulpinus</i>					
1	O73872	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	615.6831	22,11±0,31	34,82±0,46
4	Q90XG0	Triosephosphate isomerase B	1373.102	24,20±0,36	39,20±0,51
6	Q90XG0	Triosephosphate isomerase B	4885.841	23,12±0,33	37,60±0,49
8	Q6NY77	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase_mitochondrial	126.5413	21,43±0,28	33,73±0,43
17	Q9PTY0	ATP synthase subunit beta_mitochondrial	128.7956	17,32±0,23	31,25±0,41
26	P18520	Intermediate filament protein ON3	144.8645	14,35±0,21	26,82±0,31

O fracionamento do proteoma hepático por 2D PAGE foi feito nos *pellets* proteicos extraídos do *pool* de tecido hepático dos grupos *Pa*-HgSe 2 e *Rv*-HgSe 2 (grupos escolhidos por apresentarem $> C_{Hg\text{total}}$ e $C_{Se\text{total}}$), com o objetivo de mapear a presença de Hg e Se nos *spots* proteicos (Moraes *et al.*, 2013; Braga *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2024).

As determinações por GFAAS (Figuras 1A e 1B, Tabela 4) indicaram três *spots* proteicos associados ao Hg e Se no proteoma hepático do grupo *Pa*-HgSe 2 de *Psectrogaster amazônica* com concentrações na faixa de 9,70 a 19,72 mg kg⁻¹ e 16,15 a 35,44 mg kg⁻¹, respectivamente para Hg e Se.

No proteoma hepático da espécie *Raphiodon vulpinus* (grupo *Rv*-HgSe 2) foram identificados seis *spots* proteicos associados ao Hg e Se, com concentrações na faixa

14,35 a 28,44 mg kg⁻¹ e 26,82 a 43,12 mg kg⁻¹, respectivamente para o Hg e Se. Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que em todos os *spots* proteicos associados ao Hg as determinações por GFAAS também indicaram a presença de Se. Observa-se que as concentrações de Hg apresentaram valores acima de 50% menores comparados com às de concentrações de Se. Este comportamento foi semelhante aos resultados obtidos em relação aos tecidos e *pellets* proteicos das amostras de fígado das duas espécies de peixe estudadas. Os resultados do presente paper corroboram com resultados da literatura que reportam uma correlação positiva entre concentrações de Hg e Se em peixes da região do rio Tabajós – Amazônia brasileira e peixes marinhos (Lemire *et al.*, 2006; Siscar *et al.*, 2014). A correlação positiva entre o Hg e Se poderia ser explicada pela possível formação dos complexos [Hg²⁺] - [Se²⁻] e /ou [CH₃Hg⁺]₂ - [Se²⁻], o que poderia neutralizar os efeitos deletérios das espécies mercuriais. No entanto, uma condição redutora do meio biológico seria necessária para manter as espécies de Se na forma de seleneto (Se²⁻). Os dados apresentados na Tabela 4 trazem a essa discussão um dado novo, no caso, a identificação de Hg e Se associados a um mesmo *spot* proteico. Até então, a literatura reporta trabalhos que identificaram *spots* proteicos associadas a Hg em tecido hepático de ratos e peixes (Santiago *et al.*, 2023; Viera *et al.*, 2023), no entanto, nesses estudos não foi investigada a presença do Se.

Dessa forma, com base nos dados da Tabela 4, pode-se sugerir que as espécies químicas de Hg e Se podem estar ligadas às estruturas das proteínas e/ou enzimas, possivelmente a um grupo tiol de uma cisteína e/ou tioeter de uma metionina, formando complexos na estrutura das *metal bindin proteins* (MBP), do tipo: MBP-R-[Hg-Se] e/ou MBP-R₂-S-[Hg-Se]. No caso, o grupo R-S-H (base mole) representa o grupo tiol de uma cisteína, e o grupo R₂-S-H (também base mole) representa o grupo tioeter de uma metionina, na estrutura proteica. A espécie -[Hg-Se] atuaria como um ácido mole ligando-se aos grupos tiol e/ou tioeter (Pearson, 1963). Dessa forma, com base nos dados reportados no presente paper, pode-se inferir que as concentrações de Se_{total} determinadas nas amostras de tecido hepático das espécies *Psectrogaster amazônica* e *Raphiodon vulpinus* poderiam mitigar os efeitos tóxicos das espécies mercuriais.

3.3. Caracterização dos *spots* proteicos associadas a Hg/Se por LC-MS/MS

A análise por LC-MS/MS permitiu identificar quatro proteínas e/ou enzimas em três *spots* proteicos associadas a Hg/Se e cinco proteínas associadas a Hg/Se em seis *spots*

proteicos no proteoma hepático das espécies *Psectrogaster amazônica* e *Raphiodon vulpinus*, respectivamente. Os resultados da caracterização dos *spots proteicos* associadas a Hg/Se estão resumidos na Tabela 4.

A Hemoglobina subunits alpha e betha foram identificadas nos *spots* 59 e 60 do tecido hepático de *Psectrogaster amazônica*, *spots* que apresentaram concentrações de Hg e Se na faixa de 9 a 17 mg kg⁻¹ e 16 a 33, respectivamente. As isoformas das subunidades da hemoglobina participam no processo de transporte de oxigênio das brânquias para vários tecidos periféricos em peixes (Uniprot, 2023). Estudo recente de Almeida *et al.*, 2023, caracterizou as isoformas beta 1 e 2 como Hg-binding proteins em tecido renal de ratos expostos ao cloreto de mercúrio com concentrações acima de 100 mg kg⁻¹ de mercúrio total. No estudo os autores destacam que os resíduos de cisteínas (aminoácido que apresenta grupos tiól – base mole) presentes na estrutura das isoformas da hemoglobina permite a ligação de espécies mercuriais (ácido mole). Os resultados obtidos por Almeida *et al.*, 2023 corroboram com resultados obtidos por Gibson *et al.*, 2017, que identificou por SEC-ICP-AES em lisados de glóbulos vermelhos de coelho a ligação de Hg²⁺ na estrutura da hemoglobina. Os dados do presente paper, foi identificada a presença de Hg e Se nos *spots* 59 e 60. Com base nos resultados reportados por Almeida *et al.*, 2023, uma hipótese para o mecanismo envolvido na ligação do Hg e Se na estrutura da Hemoglobina subunits alpha e betha seria a formação de complexos do tipo R-S-[Se-CH₃Hg], onde o R-S-H representa o grupo tiól dos resíduos de metionina presente na estrutura das isoformas da Hemoglobina, conforme já discutido anteriormente (item 3.2).

Nos *spots* 60 e 61 do tecido hepático de *Psectrogaster amazônica* foi identificada a proteína *Fatty acid-binding protein_liver* (FABP1), sendo que no *spot* 61 foi identificada também a isoforma *Fatty acid-binding protein 10-A_liver basic* (FABP 10a). Nos *spots* 60 e 61 apresentaram concentrações de 17,24±0,23 e 19,72±0,25 para Hg, 33,41±0,39 e 35,44±0,43 para o Se, respectivamente. As FABPs_L (*Fatty acid binding proteins_liver*) têm como uma das suas principais funções atuar como antioxidante no estresse oxidativo causado principalmente por xenobióticos no fígado (Wang *et al.*, 2015; Bittarello *et al.*, 2020). Destaca-se que as FABPs_L básicas, como a FABP 10^a, só são encontradas (até o momento) em vertebrados não mamíferos (Uniprot, 2024). Existem inúmeras isoformas das FABPs, no entanto, todas as isoformas apresentam pelo menos um resíduo de cisteína e vários resíduos de metionina, aminoácidos que apresentam grupos tiól e tioeter (bases moles), o que pode explicar a afinidade das FABPs por espécies mercuriais (ácidos moles) (Wang *et al.*, 2015; Pearson, 1963). Estudos metaloproteômicos do mercúrio

com tecido hepático de peixes da Amazônia brasileira (Vieira *et al.*, 2017; Bataglioli *et al.*, 2019; Bittarello *et al.*, 2020) reportam a identificação de FABPs_liver associadas com espécies mercuriais, no entanto, os autores não discutiram os efeitos que as espécies mercuriais poderiam desencadear nas funções das FABPs-liver. No presente paper, as isoformas FABP1 e FABP 10a foram identificadas como proteínas de ligação ao Hg e Se. Nesse caso, pode-se sugerir que a interação do Se com o Hg possa formar proteína de ligação do tipo Se/Hg-FAPAs_liver, sendo assim razoável, inferir que a presença do Se no complexo da Se/Hg-FAPAs_liver poderia diminuir os possíveis efeitos negativos do Hg nas funções das FAPAs_liver.

A enzima *Superoxide dismutase* [Cu-Zn] (SOD1) foi identificada no *spot* 1 do tecido hepático de *Raphiodon vulpinus*, *spot* que apresentou $22,11 \pm 0,31 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg e $34,82 \pm 0,46 \text{ mg kg}^{-1}$ de Se. A enzima SOD1 atua principalmente na inibição de radicais produzidos nas células e que são tóxicos para os sistemas biológicos, como no processo de dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Bittarello *et al.*, 2020; Uniprot, 2024). Estudo metaloproteômico de Bataglioli *et al.*, (2019) com tecido hepático da espécie *Arapaima gigas* e de Bittarello *et al.*, (2020) com a tecido renal da espécie *Plagioscion squamosissimus*, espécies predadoras da Amazônia brasileira, identificaram espécies mercuriais em *spots* proteicos associadas a SOD1. Destaca-se que a concentração de Hg total determinada no *spot* proteico do tecido hepático da espécie *Arapaima gigas* (Bataglioli *et al.*, 2019) foi de $29,70 \pm 0,53 \text{ mg kg}^{-1}$, concentração que pode ser considerada próxima ao valor determinado no presente paper ($22,11 \pm 0,31 \text{ mg kg}^{-1}$). Ambos os paper (Bataglioli *et al.*, 2019 e Bittarello *et al.*, 2020) destacam que a ligação de espécies mercuriais na estrutura da SOD1 pode causar alteração estrutural, possivelmente devido a ligação covalente com mercúrio e possível liberação de Cu e Zn responsáveis pela atividade biológica da SOD1, o que compromete a atividade da enzima. A coordenação de Zn e Cu na estrutura da SOD1 ocorre por ligação com seis resíduos de histidina e um resíduo de aspartato, formando um complexo binuclear de Zn e Cu (Soonhee, 2002). Considerando que a histidina e o aspartato apresentam grupos amina R-NH_2 , base intermediária que coordena fortemente com ácidos intermediários como o Zn e Cu, e carboxílico (R-COOH) base dura (Pearson, 1963), dificilmente uma espécie mercurial (ácido mole) poderia deslocar o Zn e o Cu da estrutura da SOD 1. No entanto, a SOD1 apresenta também resíduos de cisteína e metionina na sua estrutura, aminoácidos como já destacado acima, apresentam grupos tiól e tioeter (bases moles) que coordenam fortemente espécies mercuriais (ácidos moles). No *spot* 1 do tecido hepático

de tecido hepático de *Raphiodon vulpinus*, no qual foi identificada a presença da SOD 1, as determinações por GFAAS indicaram a presença de Hg e de Se, resultado também não relatado até o momento na literatura. Dessa forma, pode-se inferir que a presença do Se possivelmente forma complexo binuclear do tipo Se/Hg-SOD1 com os grupos tiól e tioeter presentes na estrutura da enzima. Assim a formação da proteína de ligação a metais Se/Hg-SOD1 poderia estar impedindo a ação negativa das espécies mercuriais sobre atividade biológica da SOD1. Essa inferição corrobora com os resultados da determinação da atividade da SOD nas amostras de tecido hepático de *Raphiodon vulpinus* (resultados que serão apresentados no item 3.4), resultados estes, que não apresentaram variação entre grupos Rv-HgSe 1 (*Raphiodon vulpinus* com < concentração de Hg-total e Se-total) e Rv-HgSe 2 (*Raphiodon vulpinus* com > concentração de Hg-total e Se-total).

A enzima Triosephosphate B isomerase (TPI 1B) foi identificada nos spots 4 e 6 do proteoma hepático de *Raphiodon vulpinus*, com concentrações $24,20 \pm 0,26$ e $23,12 \pm 0,33$ mg kg⁻¹ para o Hg e $39,20 \pm 0,51$ e $37,60 \pm 0,49$ mg kg⁻¹ para o Se, respectivamente. A TPI 1B desempenha papel fundamental na homeostase do corpo porque catalisa a interconversão a diidroxiacetona fosfato (DHAP) e D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) na via glicolítica e glicogênica e participa indiretamente no processo de biossíntese de carboidrato (Vieira *et al.*, 2023; Uniprot, 2024). As TBIs apresentam diversas isoformas que a princípio, não são associadas com a coordenação de espécies metálicas (Uniprot, 2024). No entanto, um trabalho publicado em 2019 e outro publicado recentemente em 2023, reportam a identificação de proteínas de ligação ao Hg em spots do proteoma hepático de *Arapaima giga* (Bataglioli *et al.*, 2019), *Cichla sp* e *Brachyplatystoma filamentosum* (Vieira *et al.*, 2023), espécies da Amazônia brasileira. Os dois trabalhos destacam que a coordenação de espécies mercuriais na estrutura das TBIs pode ser explicada pela presença de resíduos de cisteína e metionina (bases moles) na sequência FASTA dessa enzima formando proteína de ligação a metais (Hg-TBI0). Considerando as diversas funções específicas das TBIs, a associação dessa enzima com espécies mercuriais pode provocar danos irreversíveis aos organismos (Vieira *et al.*, 2023). Considerando que no presente trabalho a TPI 1B foi identificada nos spots 4 e 6 do proteoma hepático de *Raphiodon vulpinus*, os quais estão associados ao Hg e Se, pode-se inferir com base nas discussões reportadas acima, que a possível formação da proteína de ligação de metal binuclear Se/Hg-TBI 1B poderia anular os efeitos negativos das espécies mercuriais sobre as diferentes funções que a TBI 1B desempenha nos organismos.

As enzimas *4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase_mitochondrial* (HOGA), *ATP synthase subunit beta_mitochondrial* (ATP5F1B) e a proteína *Intermediate filament protein ON3* (IFP ON3) foram identificadas nos spots 8 ($C_{Hg} = 21,43 \pm 0,28 \text{ mg kg}^{-1}$; $C_{Se} = 33,73 \pm 0,43 \text{ mg kg}^{-1}$), 17 ($C_{Hg} = 17,32 \pm 0,23$; $C_{Se} = 31,25 \pm 0,41$) e 26 ($C_{Hg} = 14,35 \pm 0,21 \text{ mg kg}^{-1}$; $C_{Se} = 26,82 \pm 0,31 \text{ mg kg}^{-1}$). A enzima HOGA tem como principal função catalisar a etapa final da via metabólica da hidroxiprolina nas mitocôndrias (Riedel *et al.*, 2012; Uniprot, 2024). A Enzima ATP5F1B é responsável pela produção de ATP a partir de ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana que é gerado por complexos de transporte de elétrons da cadeia respiratória (Uniprot, 2024). A IFP ON3 faz parte do conjunto de proteínas citoplasmáticas e nucleares do citoesqueleto. As proteínas de filamentos intermediários devido a modificações pós-traducionais se adaptam e refletem diferentes estados funcionais de uma determinada célula (Leube; Schwarz, 2016). Não existem na literatura, até o momento, trabalhos que reportam estudos metaloproteômicos da HOGA, ATP5F1B ou IFP ON3 com Hg e Se. Assim, os dados reportados no presente paper são pioneiros. A HOGA, ATP5F1B e IFP ON3 apresentam na suas sequências FASTA resíduos de cisteína e/ou metionina (Uniprot, 2024). Como já amplamente discutido acima, a cisteína apresenta grupos tiól e a metionina grupos tioeter, bases moles que apresentam grande afinidade pelo Hg e Se.

Assim, pode-se inferir que o Se e o Hg poderiam estar coordenados aos grupos tiol e/ou tioeter da HOGA, ATP5F1B e/ou IFP ON3 formando complexos binucleares do tipo: Se/Hg-HOGA; Se/Hg-ATP5F1B; Se/Hg-IFP ON3. Como já destacado, a inexistência de trabalhos que reportam a interação da HOGA, ATP5F1B e IFP ON3 com Hg e Se, reforça a necessidade de estudos específicos dessas interações, considerando os novos *insights* reportados no presente paper.

3.4. Análise dos parâmetros relacionados com estresse oxidativo

As análises das enzimas antioxidantes do primeiro grupo de defesa dos efeitos de estresse oxidativo no organismo, no caso a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e a superóxido dismutase (SOD), como também, da concentração de lipoperóxidos (LPO), foram feitas com o objetivo de investigar se concentrações de mercúrio presente no organismo das espécies *Psectrogaster amazônica* e *Raphiodon vulpinus* poderiam desencadear estado de estresse oxidativo. Os resultados obtidos estão sumarizados na Figura 2 e Tabela 5.

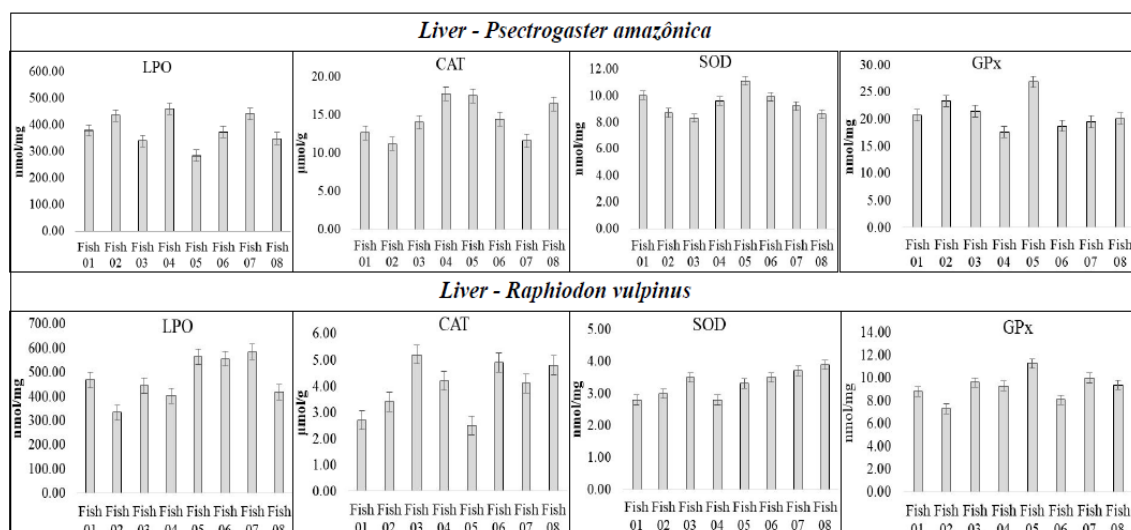


Figura 2. Atividades das enzimas SOD, CAT e GPx, e concentração de LPO determinadas no tecido hepático de “indivíduos” das espécies *Psectrogaster amazonica* e *Raphiodon vulpinus*

Analisando os resultados da Figura 2, os valores referentes às atividades das enzimas SOD, CAT e GPx, e da concentração de LPO, aparentemente não apresentam correlação com a $C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$, considerando os indivíduos com menor e maior concentração de Se e Hg tanto para a espécie *Psectrogaster amazonica* como para a *Raphiodon vulpinus*. É possível observar entre os indivíduos que apresentaram menor e/ou maior concentração de Hg e/ou Se (Tabelas 1 e 2, item 3.1), valores máximos e mínimos de atividades da CAT, SOD e GPx, e também de concentrações de LPO.

Tabela 5. Coeficiente de Correlação de Spearman calculados em relação a $C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$ e as atividades das enzimas CAT, SOD e GPx, e concentração de LPO no tecido hepático de *Psectrogaster amazonica* e *Raphiodon vulpinus*.

Variáveis	LPO CCSp.	CAT CCSp.	SOD CCSp.	GPx CCSp.
<i>Psectrogaster amazonica</i>	-	-	-	-
Grupo com $<C_{Hgtotal}$	0,8425*	-0,4597 ^{NS}	0,6156*	-0,8815*
Grupo com $>C_{Hgtotal}$	0,2697 ^{NS}	0,1018 ^{NS}	-0,7555*	-0,7767*
Grupo com $<C_{Setotal}$	0,8427*	-0,5095 ^{NS}	0,6962*	-0,8348*
Grupo com $>C_{Setotal}$	0,3634 ^{NS}	0,2220 ^{NS}	-0,6800*	-0,8749*
<i>Raphiodon vulpinus</i>	-	-	-	-
Grupo com $<C_{Hgtotal}$	0,7342*	-0,2536 ^{NS}	0,2877 ^{NS}	0,4822 ^{NS}
Grupo com $>C_{Hgtotal}$	0,3017 ^{NS}	0,2864 ^{NS}	-0,3387 ^{NS}	-0,6000*
Grupo com $<C_{Setotal}$	0,7135*	-0,3071 ^{NS}	0,2328 ^{NS}	0,4282 ^{NS}
Grupo com $>C_{Setotal}$	0,1301 ^{NS}	0,2822 ^{NS}	-0,4178 ^{NS}	-0,6826*

CCSp. - Coeficiente de Correlação de Spearman; *Significante ($p < 0,05$); NS – Não significativa ($p \geq 0,05$)

Os valores do CCSp. (Coeficiente de Correlação de Spearman), calculados correlacionando as menores $C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$ com as atividades das CAT, SOD e GPx, e com concentração de LPO (Tabela 5), seguiram o mesmo comportamento, apresentando seis valores significativos ($p < 0,05$) com valores de CCSp. (+) na faixa de 0,61 a 0,84 e oito valores (-), na faixa de -0,60 a -0,88. A maior parte dos valores de CCSp. (+) e/ou (-) não foram significativos ($p \geq 0,05$). Pode-se observar, em relação às concentrações de LPO, para as duas espécies de peixes, que os grupos com $< C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$ apresentam CCSp. (+) e significativos, no entanto, os grupos com $> C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$ apresentam CCSp. não significativos. Em relação a SOD (espécie *Psectrogaster amazônica*), observa-se valores de CCSp. (+) e significativos para os grupos com $< C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$, e valores não significativos para os grupos com $> C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$. Ainda em relação a SOD, para a espécie *Raphiodon vulpinus*, os valores de CCSp. não foram significativos para ambos os grupos. Os valores de CCSp. para a CAT também não foram significativos para nenhum dos grupos das espécies estudadas. Já para a GPx, em relação à espécie *Psectrogaster amazônica*, observa-se valores de CCSp. (+) e significativos para os grupos com $>$ e $<$ concentração de Hg e Se e, para a espécie *Raphiodon vulpinus*, os valores de CCSp. não foram significativos para os grupos com $< C_{Hgtotal}$ e $C_{Setotal}$, no entanto, em relação aos grupos com $>$ maior concentração os valores de CCSp. foram significativos e apresentaram correlação negativa. Bittarello *et al.*, (2020) trabalhando com as espécies *Plagioscion squamosissimus* (carnívora) e *Colossoma macropomum* (onívora) da Amazônia brasileira verificou uma tendência de maior atividade enzimática e de concentração de LPO no tecido hepático da espécie *Plagioscion squamosissimus*, que apresentou maior concentração de mercúrio. Os valores de CCSp. calculados, demonstram somente a ocorrência de correlação negativa entre a atividade da GPx com a concentração e Hg_{total} ($-0,7040$, $C_{Hgtotal} = 279 \pm 4.41 \mu g kg^{-1}$), o que corrobora em parte com os dados reportados no presente paper. Os autores discutiram, com base na literatura, que a inibição da GPx pelo Hg poderia estar relacionada com a interação Hg-Selenol, no entanto, no trabalho não foram feitas determinações de Se nas amostras de tecido hepático dos peixes, o que daria maior suporte aos resultados obtidos. No presente paper, as determinações de Se permitiram calcular os valores de Se HBV, os quais foram cinco vezes maiores para a espécie *Psectrogaster amazônica* (espécie não predadora que apresentou menor concentração de Hg) e 10 vezes maiores para *Raphiodon vulpinus* (espécie predadora, que apresentou maior concentração de Hg). Assim, os resultados reportados no presente manuscrito fornecem novos insights aos estudos da influência do

Se sobre a capacidade do Hg na geração de espécies oxidativas e no possível desencadeamento de estresse oxidativo. Deve ser destacado, que nos estudos das determinações de Hg_{total} e Se_{total} nos *spots* proteicos, constatou-se que a SOD, identificada no *spot* 1 do tecido hepático de *Raphiodon vulpinus*, apresentou $22,11 \pm 0,31 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg e $34,82 \pm 0,46 \text{ mg kg}^{-1}$ de Se e, a Figura 2 mostra que não ocorre correlação significativa da atividade da SOD com as concentrações de Se_{total} e Hg_{total} . Dessa forma, a princípio, pode-se inferir com base nos resultados da Figura 2 e Tabela 5, que o Se possa estar atenuando os efeitos deletérios do mercúrio (como estresse oxidativo) no organismo das espécies *Psectrogaster amazônica* e *Raphiodon vulpinus*.

4. Conclusões

A razão molar média Hg:Se apresentaram valores menores em relação a razão molar média Se:Hg para as espécies *Psectrogaster amazônica* (não predadora) e *Raphiodon vulpinus* (predadora), o que refletiu valores de $Se_{HBV} > 5$ para os dois grupos da espécie não predadora e maior que 10 para os dois grupos da espécie predadora, indicando que o organismo de ambas as espécies apresentam no tecido hepático selênio disponível para dirimir os efeitos tóxicos de espécies mercuriais. Os dados metaloproteômicos indicaram 11 *spots* proteicos, nos quais foram identificadas enzimas e proteínas associadas ao Hg e Se que desempenham importantes funções no organismo das espécies *Psectrogaster amazônica* e *Raphiodon vulpinus*, com concentrações de Se cerca de 50% superiores às de Hg. Com isso, pode-se inferir que no organismo das espécies estudadas poderia estar ocorrendo a formação de complexos binucleares, formando *metal binding proteins* ($MBP-R-[Hg-Se]$ e/ou $MPB-R_2-[Hg-SE]$) inertes, a ligação do Se ao Hg estaria no caso, mitigando os efeitos tóxicos das espécies mercuriais. Finalmente, os resultados das atividades das enzimas SOD, CAT e GPx, e da concentração de LPO, correlacionados com às C_{Hg} e C_{Se} não apresentaram correlações significativas, indicando, a princípio, a não ocorrência de geração de espécies oxidativas induzidas pelas espécies mercuriais, e com isso a não ocorrência de estresse oxidativo. Assim, os insigths do presente paper indicam, a princípio, que o consumo das espécies *Psectrogaster amazônica* e *Raphiodon vulpinus* como fonte de dieta proteica das populações ribeirinha da Amazônia brasileira, não apresenta risco de contaminação por espécies mercuriais.

5. Referências bibliográficas

Adams, S. M. Status and use of bioindicators for evaluating effects of chronic stress on fish, 1990. **Am Fish Soc Symp** 8, 1–8.

Almeida, E.C.; Faria, V.D., Cirinêu, F.D.; Santiago, M.G.A., Miotto, B.; Vieira, J.C.S.; Braga, C.P., Adamec, J., Fernandes, A.A.H., Buzalaf, M.A.R., Padilha, P. M., 2024. Metalloproteomic Investigation of Hg-Binding Proteins in Renal Tissue of Rats Exposed to Mercury Chloride. **International Journal Molecular Science** 25, 164.

Alves-Costa, J. R. M.; Mela, M.; Silva-Assis, H. C.; Pelletier, E.; Randi, M. A. F.; Oliveira, C. A. R. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 67, 82–88.

Bataglioli, I. C., Vieira, J. C. S., Queiroz, J. V., Fernandes, M. S., Bittarello, A. C., Braga, C. P.; Buzalaf, M. A. R.; Adamec, J., Zara, L. F., Padilha, P. M. Physiological and functional aspects of metal-binding protein associated with mercury in the liver tissue of pirarucu (*Arapaima gigas*) from the Brazilian Amazon. **Chemosphere** 236, 124320.

Bataglioli, I. C. B., Queiroz, J. V., Vieira, J. C. S., Cavalline, N. G., Braga, P. B., Buzalaf, M. A. R., Zara, L. F., Adamec, A., Padilha, P. M., 2022. Mercury metalloproteomic profile in muscle tissue of *Arapaima gigas* from the Brazilian Amazon. **Environ. Monit. Assess** 194, 705-716.

Beutler, E., 1971. **Red cell metabolism: A manual of biochemical a methods.** Grune&Stron, New York.

Bittarello, A.C., Vieira, J.C.S., Braga, C.P., de Paula Araújo, W.L., da Cunha Bataglioli, I., da Silva, J.M., Buzalaf, M.A.R., Fleuri, L.F., Padilha, P.M., 2019. Characterization of molecular biomarkers of mercury exposure to muscle tissue of *Plagioscion squamosissimus* and *Colossoma macropomum* from the Amazon region. **Food Chem.** 276, 247–254.

Bittarello, A. C., Vieira, J. C. S., Braga, C. P., Bataglioli, I. C., Oliveira, G., Rocha, L. C., Zara, L. F., Buzalaf, M. A. R., Oliveira, L. C. S., Adamec, J., Padilha, P. M., 2020. Metalloproteomic approach of mercury-binding proteins in liver and kidney tissues of *Plagioscion squamosissimus* (corvina) and *Colossoma macropomum* (tambaqui) from Amazon region: Possible identification of mercury contamination biomarkers. **Science of The Total Environment** 711, 134547.

Braga, C. P., Bittarello, A. C., Padilha, C. C. F., Leite, A. L., Moraes, P. M., Buzalaf, M. A. R., Zara, L. F., Padilha, P. M., 2015. Mercury fractionation in *dourada* (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. **Talanta** 132, 239-244.

Crouch, R. K., Gandy, S. E., Kimsey, G., Galbraith, R. A., Galbraith, G. M. P., Buse, M. G., 1981. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes** 30, p. 235–241.

Dórea, J. G., 2004. Cassava cyanogens and fish mercury are high but safely consumed in the diet of native Amazonians. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 57(3), 248–256.

Dórea, J. G., Marques, R. C., 2016. Mercury levels and human health in the Amazon Basin. **Annals of Human Biology** 43(4), 349–359.

Doumas, B. T., Bayse, D. D., Borner, K., Carter, R. J., Elevitch, F., Garber, C. C., Graby, R. A., Hause, L. L., Mather, A., Peters Jr, T., Rand, R. N., Reeder, D. J., Russell, S. M., Schaffer, R., Westgard, J. O., 1981. A candidate reference method for determination of total protein in serum II. **Test for transferability Clinical Chemistry** 27, 1651–1654.

Erden, M., Bor, N. M., 1984. Changes of reduced glutathion, glutathion reductase, and glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. **Biochemical Medecine** 31, 217–227.

Fadini, P. S., Jardim, W. F., 2001. Is the Negro River Basin (Amazon) Impacted by Naturally Occurring Mercury? **Science of The Total Environment** 275, 71–82.

Faial, K., Deus, R., Deus, S., Neves, R., Jesus, I., Santos, E., Alves, C. N., Brasil, D., 2015. Mercury levels assessment in hair of riverside inhabitants of the Tapajos River, Para State, Amazon, Brazil: Fish consumption as a possible route of exposure. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** 30, 66–76.

Gibson, M.A., Sarpong-Kumankomah, S., Nehzati, S., George, G.N., Gailer, J., 2017 Remarkable differences in the biochemical fate of Cd^{2+} , Hg^{2+} , CH_3Hg^+ and thimerosal in red blood cell lysate. **Metallomics** 9, 1060–1072.

Jiang, Z. Y., Woollard, A. C. S., Wolff, S. P., 1991. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids** 26, 853–856.

Kaneko, J. J. & Ralston, N. v. C., 2007. Selenium and mercury in pelagic fish in the Central North Pacific near Hawaii, Biol. **Trace Elem. Res.** 119, 242–254.

Lacerda, L. D., Malm, O., 2008. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos Avançados** 22, 173–190.

Lemire, M., Mergler, D., Fillion, M., Passos, C. J. S., Guimarães, J. R. D., Davidson, R., Lucotte, M., 2006. Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon. **Science of The Total Environment** 366, 101–111.

Leube R. E., Schwarz, N., 2016. **Encyclopedia of Cell Biology**. Volume 2, 569–578.

Lima, P. M., Neves, R. C. F., Santos, F. A., Perez, C. A., Silva, M. A. O., Arruda, M. A. Z., Castro G. R., Padilha, P.M., 2010. Analytical approach to the metallomic of Nile

tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SRXRF and FAAS after 2D PAGE separation: Preliminary results. **Talanta** 82, 1052-1056.

Lino, A.S., Kasper D., Guida, Y.S. et al., 2018. Mercur and selenium in fishes from the Tapajós River in the Brazilian Amazon: An evaluation of human exposure. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** 48, 196–201.

Malm, O., 1998. Gold Mining as a Source of Mercury Exposure in the Brazilian Amazon. **Environmental Research** 77, 73–78.

Melligen, R.M., Myrmel, L.S., Rasinger, J.D., Lie, K.K., Bernhard, A., Madsen, L., Nøstbakken, O.J. D., 2022. Selenomethionine Reduce Mercury Tissue Levels and Modulate Methylmercury Induced Proteomic and Transcriptomic Alterations in Hippocampi of Adolescent BALB/c Mice. **International Journal Molecular Science** 23, 12242.

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

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

Passos, C. J. S., Mergler, D., Lemire, M., Fillion, M., Guimarães, J. R. D., 2007. Fish consumption and bioindicators of inorganic mercury exposure. **Science of The Total Environment** 373, 68–76.

Passos, C. J. S., Silva, D. S., Lemire, M., Fillion, M., Guimarães, J. R. D., Lucotte, M., Mergler, D., 2008. Daily mercury intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology** 18, 76–87.

Pearson, R. G., 1963. Hard and Soft Acids and Bases, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3533–3539.

Queiroz, J. V., Vieira, J. C. S., Bataglioli, I. C., Bittarello, A. C., Braga, C. P., Oliveira, G., Padilha, C. C. F., Padilha, P. M., 2018. Total Mercury Determination in Muscle and Liver Tissue Samples from Brazilian Amazon Fish Using Slurry Sampling. **Biological Trace Element Research**, 184, 517–522.

Ralston, N. V. C., Raymond, L. J., 2018. Mercury's neurotoxicity is characterized by its disruption of selenium biochemistry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects** 1862, 2405–2416.

Riedel, T. J., Knight, J., Murray, M. S., Milliner, D. S., Holmes, R. P., Lowther, W. T., 2012. 4-Hydroxy-2-oxoglutarate aldolase inactivity in primary hyperoxaluria type 3 and glyoxylate reductase inhibition. **Biochimica et Biophysica Acta** 1822, 1544–1552.

Roulet, M., Lucotte, M., Saint-aubin, A., Tran, S., Rhéault, I., Farella, N., Jesus, E. S., Dezencourt, J., Passos, C. J. S., Santos-Soares, G., Guimarães, J. R. D., Mergler, D., Amorim, M., 1998. The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chao formation of the lower Tapajos River Valley, Para state, Brazil.

The present investigation is part of an ongoing study, the CARUSO project (IDRC-UFPa-UQAM), initiated to. **Science of The Total Environment** 223, 1–24.

Santiago, M. G. A., Faria, V. D., Cirinêu, F. D., da Silva, L. L. L.Q., Almeida, E. C., Cavallini, G. C., Vieira, J. C. S., Fernandes, A. A. H., Braga, C. P., Zara, L. F., Buzalaf, M. A. R., Adamec, J., Padilha, P.M., 2022. Metalloproteomic approach to liver tissue of rats exposed to mercury. **Chemosphere**, 312, 137222.

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

Silva, F. A., Neves, R. C. F., Quintero-Pinto, L. G., Padilha, C. C. F., Jorge, S. M. A., Barros, M. M., Pezzato, L. E., Padilha, P. M., 2007. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. **Chemosphere**, 68, 1542–1547.

Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M., 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nat. Protoc.** 1, 2856–2860.

Siscar, R., Koenig, S.; Torreblanca, A.; Solé, M., 2014. The role of metallothionein and selenium in metal detoxification in the liver of deep-sea fish from the NW Mediterranean Sea. **Science of The Total Environment** 466, 898–905.

Soonhee, K., 2002. Participative management and job satisfaction: lessons for management leadership. **Pub. Admin. Rev.** 62, 231.

Sormo, E. G., Ciesielski, T. M., Overjordet, I. B., Lierhagen, S., Eggen, G. S., Berg, T., Jenssen, B. M., 2018. Selenium moderates mercury toxicity in free-ranging freshwater fish. **Environmental Science & Technology** 45, 6561–6566.

Tomza-Marciniak, A., Pilarczyk, B., Drozd, R., Pilarczyk, R., Juszczak-CzasnojC, M., Havryliak, V., Podlasinska, J., Udała, J., 2023. Selenium and mercury concentrations, Se:Hg molar ratios and their effect on the antioxidant system in wild mammals. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** 322, 121234.

Uniprot, 2024. **Uniprot.org.br** [WWW Document]. 2024. URL. <https://www.uniprot.org/> (accessed 3.16.24).

Veiga, M. M., Meech, J. A., 1994. Oñate, N. Mercury pollution from deforestation. **Nature** 368, 816–817.

Vieira, J.C.S., Cavecci, B., Queiroz, J.V., Braga, C.P., Padilha, C.C.F., Leite, A.L., Figueiredo, W.S., Buzalaf, M.A.R., Zara, L.F., Padilha, P.M., 2015. Determination of the mercury fraction linked to protein of muscle and liver tissue of tucunare (*Cichla* spp.) from the Amazon region of Brazil. Arch. **Environ. Contam. Toxicol.** 69, 422 – 430.

Vieira, J. C. S., Braga, C. P., de Queiroz, J. V., Cavecci-Mendonça, B., de Oliveira, G., de Freitas, N. G., Fernandes, A. A. H., Fernandes, M. D. S., Buzalaf, M. A. R., Adamec,

J., Zara, I. F., Padilha, P. M., 2023.. The effects of mercury exposure on Amazonian fishes: An investigation of potential biomarkers. **Chemosphere** 2023, 316, 137779.

Wang, G., Bonkovsky, H.L., de Lemos, A., Burczynski, F.J., 2015. Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. **J. Lipid Res.** 56, 2238–2247.

Yang, D.-Y., Chen, Y.-W., Gunn, J. M., & Belzile, N., 2008. Selenium and mercury in organisms: Interactions and mechanisms. **NRC Canada**, 16, 71-92.

CAPÍTULO III

Mercury deleterious effects study through selenium on the muscle of *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* from Brazilian Amazon: New insights using metalomics strategies

Abstract

The paper reports the use of metalloproteomics strategies to mitigate the effect of selenium (Se) on the mercury (Hg) toxicity muscle tissue of *Psectrogaster amazonica* (i.e., a non-carnivorous species) and *Raphiodon vulpinus* (i.e., a carnivorous species) from the Jirau region along the Madeira River in the Brazilian state of Rondônia, fish species that are mainly consumed by the traditional population of Brazilian Amazon. For this study, the association of Graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) techniques with Shotgun – Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (Shotgun – LC–MS/MS) was used. The Hg and Se determinations by GFAAS in muscle-tissue samples and protein fractions allowed the calculation of Se values for health benefits (Se HBVs), that showed positive values for the two groups of both fish species, suggesting that both fish species have Se reserves in their muscle tissue necessary to control the Hg toxic effects. Protein relative abundance variation analysis (PRAV) by Shotgun – LC–MS/MS carried out comparing groups of fish with lower and higher concentrations of Hg and Se (lower CHg/CSe [control]; higher CHg/CSe) indicated that 15 and 20 proteins and/or enzymes were only expressed in the groups with higher CHg and CSe (i.e., unique proteins) from the muscle tissue of *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus*, respectively. In both fish species, the PRAV results with up or downregulation were modest, and up or downregulation of antioxidant enzymes from the first group of defense against the effects of oxidative stress in organisms (i.e., catalase [CAT], glutathione peroxidase [GPx], and superoxide dismutase [SOD]) was not observed. It is noteworthy that the few proteins and/or enzymes with significant PRAV were expressed in the groups with higher CHg and CSe, and it can be inferred that Se could be attenuating the Hg negative action on the functions of these proteins and/or enzymes through the formation of Se–Hg complexes in the structures of these macromolecules. The CAT, GPx, and SOD activity analysis, as well as that of lipoperoxides concentration (LPO), did not indicate that Hg concentrations present in the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species could trigger an oxidative stress state, corroborating the protein relative abundance variance analysis results. In general, the preliminary results obtained in present study provide new insights into studies on the mitigating effect of Se on the Hg toxicity in fish.

Palavras-chave: Hg and Se in Amazonian fish; *metal binding proteins*; Hg/-associated protein; GFAAS - *Shotgun* – LC-MS/MS; metallomics.

1. Introduction

The toxic effects of mercurial species on humans and animals have been widely debated by the scientific community over the past four decades (Almeida et al., 2024; Santiago et al., 2023). Several studies carried out in the Amazon region have found different concentrations of methylmercury in different species of fish, with the highest concentrations observed in predatory species. It is noteworthy that many of these species are frequently consumed by traditional populations in the Amazon (Vieira et al., 2023). Selenium (Se), a mineral with antioxidant properties, is important for the metabolic activity of humans and animals (Ralston & Raymond, 2018). It is known that the presence of Se in the human diet can protect the brain against oxidative damage, can increase visual function and protect against cataracts and maculopathy, acts on the metabolism of thyroid hormones, in reproduction processes and other metabolic processes, as it is a component of more than 20 selenoproteins, with an emphasis on glutathione peroxidase (GPx) (Tomza–Marciniak et al., 2023). The ability of Se to mitigate the toxic effects of xenobiotics is a fundamental function of this micromineral. Several studies highlight the protective effects of Se against toxic elements, such as mercurial species, which have no biological function in organisms (Melling et al., 2022). Hg–Se interaction mechanisms remain unclear. It is known that the protective effect of Se may be related to the formation of inert Hg–Se complexes; as the formation constant of Hg–Se association ($K_a = 10^{45}$) is greater than that of sulfur (S) (Hg–S, $K_a = 10^{39}$), Se can displace a large part of the Hg bound to the S containing functional groups of proteins, which can reduce their toxicity (Tomza–Marciniak et al., 2023). Regarding fish, it is known that despite being an important source of protein in a healthy diet, fish—especially predatory fish—can contain significant levels of mercurial species (Gochfeld & Burger, 2021). The literature has reported that the molar excess of Se, which reflects an Se:Hg molar ratio greater than 1 in fish, could show that the concentration of Hg does not present toxic effects, and the consumption of fish can therefore be safe (Gochfeld & Burger, 2021; Lino et al., 2018). Metallomics, a recent line of research, makes it possible to investigate the interactions and functional connections between genes, metabolites, proteins, and other biomolecules of an organism with metallic species (Mounicou et al., 2009). The aim of metallomics is

to clarify the biological role of metallic species and/or metalloids that bind to biomolecules and the function thereof in an organism (Garcia et. al., 2006; Szpunar, 2005). In this context, metallomics can provide new insights to elucidate the attenuating effect of Se in relation to Hg toxicity in fish.

Accordingly, this manuscript reports the obtained results using metallomic strategies (i.e., the association of graphite furnace atomic absorption spectrometry [GFAAS] techniques with Shotgun – LC–MS/MS) in a study on the mitigating effect of Se on Hg toxicity in the organism of *Psectrogaster amazonica* (i.e., a non-carnivorous species) and *Raphiodon vulpinus* (i.e., a carnivorous species) from the Jirau region along the Madeira River in the state of Rondônia in the Brazilian Amazon. In the last few decades, the Madeira River has been impacted by mercury due to gold-mining activities (Bataglioli et al., 2022; Bittarello et al., 2019). The *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species were chosen because they are primarily consumed by the traditional population of the Brazilian Amazon (Malabarba & Malabarba, 2020; Pacheco et al., 2009).

2. Material and methods

2.1. Fish collection and sample processing

The Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation and Authorization and Information System on Biodiversity (ICMBio; Ref. SISBIO 43890–1) and the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA), protocol number no 0316/2023, authorized this research.

Eight individuals of the species *Psectrogaster amazonica* (branquinha) with a medium size of 17 ± 2 cm and 350 ± 21 g and eight individuals of species *Raphiodon vulpinus* (cachorra) with a medium size of 26 ± 3 cm and 620 ± 52 g were captured in the area of the Jirau Hydroelectric Plant reservoir on the Madeira River in the Rondônia state of Brazil. The collection points were: a) (S 09°47'18.3"; W 065°31'12.4"); b) (S 09°41'0.06"; W 064°58'43.9"); and c) (S 09°16'12.8"; W 064°41'14"). The fish were captured by a team of biologists from ESBR Company (Brazil's Sustainable Energy), using nets made of mesh measuring 1.5 cm × 10 cm from one side to the other. The fish were euthanized on site soon after capture by myelotomy followed by cranial drilling (Bittarello et al., 2019). The muscle tissue samples were then removed and immediately

transferred to Falcon tubes and stored in liquid nitrogen. The samples were subsequently transported to the Bioanalytical and Metalloproteomic Laboratory (LBM) of the Institute of Biosciences - UNESP, where they were stored in a freezer at -80°C until a metalloproteomic and oxidative-stress analyses were performed (Vieira et al., 2023).

2.2. Mercury and selenium determinations

The Hg_{total} and Se_{total} determinations in muscle tissue samples and pellets were conducted using GFAAS according to the procedure described by Silva et al. (2007) and Moraes et al. (2013). Briefly, the procedure involves mineralizing samples using a mixture of concentrated sulfuric acid with 30% (w/w) hydrogen peroxide in an ultrasound-assisted heating bath. The acid extracts obtained were increased to 5.00 mL in volumetric flasks. To maintain the thermal stabilization of Hg and Se at the atomization temperature, a combination of tungsten as a permanent chemical modifier and zirconium as a chemical modifier was used, co-injected together with the sample in the graphite tube (Bittarello et al., 2020). The determinations were carried out using a SHIMADZU AA-6800 atomic absorption spectrometer equipped with a background corrector with a self-reverse system and a deuterium lamp, a pyrolytic graphite tube with an integrated platform, and an AS6100 automatic sampler. All Hg_{total} and Se_{total} determinations were validated by an analysis of the National Research Council of Canada DORM 4 (fish protein) certified reference material. Based on the data obtained from the Hg_{total} and Se_{total} determinations in the muscle tissue samples, the Hg:Se and Se:Hg ratios were calculated, as well as the Se values for health benefits (Se HBVs). (Lino et al., 2018).

2.3. Protein relative abundance variance analysis by Shotgun – LC–MS/MS

For the protein relative abundance variance analysis (PRAVA), the protein fraction extraction from muscle tissue samples was initially completed with Tris HCl buffer pH 8.80 in denaturing conditions according to the procedure described by Vieira et al. (2023), using an OMNI/Analytic cell disruptor. After obtaining the transparent protein extracts through consecutive centrifugation operations at $12,000\times g$ for 30 minutes at 4°C , the total protein concentration was determined to normalize to the protein masses at $50\text{ }\mu\text{g}$ in all extracts obtained from eight fish with lower concentration of Hg and Se (i.e., the control group) and eight fish with higher concentrations of Hg and Se. An analysis of the relative

abundance variation of proteins in the muscle proteome of the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species was performed by Shotgun – LC–MS/MS according to the procedure described by Assunção et al. (2023) and Almeida et al. (2024): 50 µL of extracts containing 50 µg of protein were divided into five portions of 10 µL and transferred to LoBind microtubes (Eppendorf), and 10 µL of ammonium bicarbonate at 0.05 mol L⁻¹ and 25 µL of RapiGest™ 0.2% (v/v) (Waters, Manchester, UK) were added to these and incubated at 37°C for 30 minutes. The samples were subsequently subjected to a reduction-and-alkylation process using 2.5 µL 100 mmol L⁻¹ DTT (BIORAD, cat #161–0611) and 2.5 µL 300 mmol L⁻¹ iodoacetamide (IAA) (GE, cat #RPN 6302 V), respectively, in the absence of light at room temperature for 30 minutes. After the reduction and alkylation steps, the samples were digested at 37°C overnight, adding 100 ng of trypsin (PROMEGA, cat #V5280). After the digestion process was completed, 10 µL aliquots of 5% (v/v) trifluoroacetic acid (LC MS 98–100%, Sigma–Aldrich) were added and the samples were incubated for 90 minutes at 37°C. After the incubation period, the samples were centrifuged at 14,000 rpm at 6°C for 30 minutes. The supernatants were collected in LoBind flasks and subjected to desalting on C18 Spin Columns (PIERCE, cat #89870). After the desalting process, the samples were resuspended in 200 µL of 3% (v/v) acetonitrile (UHPLC, mass spectrometry Sigma–Aldrich, cat #900667) and subsequently subjected to an LC–MS/MS analysis.

Peptide identification was performed on a nanoACQUITY UPLC Xevo QT of MS system (Waters, Manchester, UK). The nanoACQUITY UPLC® was equipped with a nanoACQUITY HSS T3 reversed-phase analytical column (75 µm × 150 mm, 1.8 µm particle size). The column was equilibrated with 93% mobile phase A (0.1% [v/v] formic acid in water) and 7% mobile phase B (0.1% [v/v] formic acid in acetonitrile). Then, the peptides were separated with a linear mobile phase gradient of 7–85% (0.1% formic acid in acetonitrile) for 70 minutes at a flow rate of 0.35 µL min⁻¹. The column temperature was maintained at 35°C. The Xevo® G2 Q TOF mass spectrometer was operated in nanoelectrospray positive ion mode, and data were collected using the mean squared-error method at high energy (19–45 V), which allows data acquisition of both precursor and fragment ions in a single injection. The source conditions included 2.5 kV capillary voltage, 30.0 V sample cone, 5.0 V extraction cone, and 80°C temperature. Data were acquired over 70 minutes, scanning in the range of 50–2,000 Da. The lockspray, which was used to ensure accuracy and reproducibility, was operated with a solution of [Glu1] fibrinopeptide (1 pmol/µL), with a flow rate of 1 µL/min, as a reference ion in positive

mode at m/z 785.8427. The mass spectrometry raw data files were uploaded to Progenesis
 QI for Proteomics v4.0 (Nonlinear Dynamics, Waters, and Newcastle upon Tyne, UK) to
 perform a quantitative analysis. For alignment, a sample result was automatically selected
 as a reference. The remaining results were aligned with the reference with an alignment
 score greater than 80%, and peak picking was performed using the automatic sensitivity
 method. Peak intensities were then normalized by calculating abundance ratios relative
 to a reference. The peak list was searched in the UniProtKB/Swiss-Prot database using
 Otophysi class data and the Mascot 2.6 software (Matrix Science, London, UL). Trypsin
 was the specified enzyme, and one missed cleavage was allowed. Cysteine
 carbamidomethylation was defined as a fixed modification and methionine oxidation as
 a variable modification. A precursor mass tolerance of 10 ppm and a fragment ion
 tolerance of 0.01 Da were applied; a false discovery rate of 1% was considered. A relative
 quantification using non-conflicting peptides was selected to quantify the protein or
 proteins; to be considered with relative abundance variation, it should be identified and
 quantified using at least two unique peptides and present a p value < 0.05 (i.e.,
 downregulated proteins) and a p value > 0.95 (i.e., upregulated proteins).

2.4. Parameters analysis related to oxidative stress

A parameters analysis related to oxidative stress was conducted on homogenates
 after extraction with 0.01 mol L^{-1} phosphate buffer with pH 7.00 in an OMNI/Analytical
 cell disruptor. For this analysis, 0.20 g of muscle-tissue samples from each of the
 individuals of the lower CHg and Se groups and the higher CHg and Se groups of
Psectrogaster amazonica and *Raphiodon vulpinus* species (i.e., the biological replicates)
 was used. The suspensions obtained were centrifuged at $12,000\times g$ for 30 minutes at 4°C ,
 and transparent supernatants were obtained, lipid lipoperoxidation (LPO), GPx, catalase
 (CAT), and superoxide dismutase (SOD) activities were determined using methodologies
 already consolidated and published in the extant literature. In case, the GPx activity was
 indirectly determined by a previously described method (Erden & Bor, 1984) based on
 the oxidation of reduced GSH. CAT activity was determined by ultraviolet
 spectrophotometry as previously described (Beutler, 1975); SOD activity was determined
 according to a reported protocol (Crouch et al., 1981); and the LPO marker was
 determined using the Jiang procedure (Jiang et al., 1991) based on the oxidation of Fe^{2+}

to Fe^{3+} ions by lipoperoxide at an acidic pH in the presence of a xylenol orange metallochromic indicator.

2.5. Statistical analysis

The results of the mercury determinations were expressed as the mean $\pm$ standard deviation and submitted to Student's t test and an F test to verify whether there were significant differences using SAS Version 8 statistical software. The significance level considered was 5% ($p < 0.05$) (Bataglioli et al., 2019; Bittarello et al., 2020; Vieira et al., 2023). In relation to data from the CAT, SOD, GPx activity analysis and the LPO concentrations, was used using the Spearman Correlation test to evaluate the correlation of these parameters with the Hg_{total} and Se_{total} concentrations (Bittarello et al., 2020). The metallomics data were analyzed using the nanoAcquity UPLC Xevo QToF MS Protein Lynx Global Server spectrometer software (Almeida et. al, 2024).

3. Results and Discussion

3.1. Hg and Se determinations

Hg_{total} and Se_{total} determinations were made on eight muscle tissue samples and four protein pellets pool of *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus*. In this case, the determinations were made on muscle tissue samples extracted from eight individuals after three masses of approximately 100 mg of muscle tissue were separated. After the sample mineralization, the determinations were made by GFAAS according to the procedure described by Moraes et al. (2013) and Silva et al. (2007) (Item 2.2).

In relation to protein pellets, the extraction and precipitation of the protein fraction was carried out in four pools of muscle tissue samples—in this case, a pool with samples from individuals with the highest concentration of Hg_{total} and Se_{total} and a pool with samples from individuals with the highest concentration of Hg_{total} and Se_{total} , for the two species of fish, making a total of four pools. The results obtained are summarized in Tables 1 to 3.

Table 1. Total Hg and Se concentration in muscle tissue samples from *Psectrogaster amazonica*.

<i>Psectrogaster amazonica</i> / NRC	C _{Hg} total (µg kg ⁻¹)	C _{Se} total (µg kg ⁻¹)
1	7.64±0.14	11.84±0.21
2	34.46±0.17	42.04±0.63
3	7.42±0.13	11.50±0.19
4	36.15±0.47	44.10±0.83
5	36.10±0.43	44.04±0.65
6	7.32±0.12	11.35±0.18
7	6.91±0.11	10.71±0.16
8	34.65±0.68	42.27±0.70
DORM-4	401±7,35	3,489±66
DORM-4 (Certified value - µg kg ⁻¹); C _{Hg} = 410 ± 55; C _{Se} = 3,560±340		

Table 2. Total Hg and Se concentration in muscle tissue samples from *Raphiodon vulpinus*.

<i>Raphiodon vulpinus</i> / NRC	C _{Hg} total (µg kg ⁻¹)	C _{Se} total (µg kg ⁻¹)
1	31.33±0.56	51.69±0.87
2	51.74±1.10	63.02±1.08
3	27.30±0.47	45.32±0.81
4	32.46±0.54	52.30±0.89
5	55.48±0.99	66.44±1.13
6	53.80±0.96	65.10±1.11
7	25.65±0.45	41.81±0.78
8	51.70±0.93	62.20±1.07
DORM-4	403±7,53	3,491±69
DOLT-4 (Certified value - mg kg ⁻¹); C _{Hg} = 410 ± 55; C _{Se} = 3.560±340		

The results presented in Table 1 and 2 allow us to separate according to the C_{Hg}total e C_{Se}total two groups of individuals for the two fish species, a group with smaller C_{Hg}total and C_{Se}total and a group with greater C_{Hg}total e C_{Se}total. Thus, for the species *Psectrogaster amazonica* species the The individuals groups 1, 3, 6 and 7 presented lower averages of C_{Hg}total e C_{Se}total, 7,32±0,31µg kg⁻¹ and 11,35±0,47 µg kg⁻¹, respectively. This group was denominated *Pa*-HgSe 1 (lower C_{Hg}total and C_{Se}total). The individuals groups 2, 4, 5 e 8 de

Psectrogaster amazonica presented averages of $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$ of $34.46 \pm 0.17 \mu g kg^{-1}$ to $36.15 \pm 0.47 \mu g kg^{-1}$ and $42.04 \pm 0.63 \mu g kg^{-1}$ to $44.10 \pm 0.83 \mu g kg^{-1}$, respectively, these concentrations were higher than those of the *Pa*-HgSe 1 group. This group was denominated *Pa*-HgSe 2 (i.e., higher $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$). Regarding the *Raphiodon vulpinus* species, the averages results of $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$ also allowed for the creation of two distinct groups. Individuals in groups 1, 3, 4, and 7 (Graphics 3 and 4); individuals in groups *Rv*-HgSe 1 with lower averages of $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$ of $25.65 \pm 0.45 \mu g kg^{-1}$ to $32.46 \pm 0.54 \mu g kg^{-1}$ and $41.81 \pm 0.78 \mu g kg^{-1}$ to $52.30 \pm 0.89 \mu g kg^{-1}$, respectively. A second group, denominated *Rv*-HgSe 2 and formed by individuals 2, 5, 6, and 8 of the *Raphiodon vulpinus* species; this group presented the highest averages of $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$, $51.70 \pm 0.93 \mu g kg^{-1}$ to $55.48 \pm 0.99 \mu g kg^{-1}$ and $62.20 \pm 1.07 \mu g kg^{-1}$ to $66.44 \pm 1.13 \mu g kg^{-1}$, respectively.

The $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$ values allowed us to calculate the Hg:Se and Se:Hg molar ratios for the four individual groups of the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species. The average values of the Hg:Se and Se:Hg molar ratios are presented as follows: (Kaneko & Ralston, 2007; Lino et al., 2018): Group *Pa*-HgSe 1 (*Psectrogaster amazonica* with lower of $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$) - Hg:Se = 0.26, Se:Hg = 3.9; Group *Pa*-HgSe 2 (*Psectrogaster amazonica* with higher $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$) - Hg:Se = 0.32, Se:Hg = 2.9; Group *Rv*-HgSe 1 (*Raphiodon vulpinus* with lower of $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$) - Hg:Se = 0.26, Se:Hg = 3.8; Group *Rv*-HgSe 2 (*Raphiodon vulpinus* with higher $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$) - Hg:Se = 0.33, Se:Hg = 3.0. From the average values of the Hg:Se and Se:Hg molar ratios, the Se HBV values: Se HBVs were calculated using Equation 1 (Ralston et al., 2016; Ralston et al., 2019):

$$Se\ HBV = (molar\ ratio\ Se:Hg \times Se\ [\mu mol\ kg^{-1}]) - (molar\ ratio\ Hg:Se \times Se\ [\mu mol\ kg^{-1}]) \quad (1)$$

The calculated results for Se HBV are presented as follows: Grupo *Pa*-HgSe 1 (*Psectrogaster amazonica* with lower of $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$) – Se HBV = 0.54; Grupo *Pa*-HgSe 2 (*Psectrogaster amazonica* with higher $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$) - Se HBV = 1.7; Grupo *Rv*-HgSe 1 (*Raphiodon vulpinus* with lower of $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$) - Se HBV = 2.3 e Grupo *Rv*-HgSe 2 (*Raphiodon vulpinus* with higher $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$) - Se HBV = 2.3.

It was observed that the values calculated for the Se:Hg molar ratio were greater than 1 for both species of fish, and the values calculated for Se HBV were positive for both groups of the *Psectrogaster amazonica* species (i.e., greater than 1 for the *Pa*-HgSe 2 group) and also positive and greater than 1 for both groups of the *Raphiodon vulpinus* species. These results indicated that both the non-carnivorous *Psectrogaster*

amazonica species and the carnivorous *Raphiodon vulpinus* species presented Hg concentrations with a low health risk (Lino et al., 2018). Moreover, both species have selenium (i.e., soft base) reserves in muscle tissue to form bonds with mercury species (i.e., soft acids) and to thus form Se–Hg complexes (Pearson, 1963).

Based on the obtained results in the $C_{Hg_{total}}$ and $C_{Se_{total}}$ determinations in the muscle tissue of *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species, the protein fraction were extracted from a pool of muscle tissue from the groups *Pa*-HgSe 1, *Pa*-HgSe 2, *Rv*-HgSe 1 and *Rv*-HgSe 2 groups, for Hg_{total} and Se_{total} determinations in the respective protein *pellets* by GFAAS. The results obtained are summarized in Table 3. After analyzing these results, it can be seen that the Hg_{total} and Se_{total} concentrations determined in protein *pellets* from the *Pa*-HgSe 1 and *Pa*-HgSe 2 groups, and *Rv*-HgSe 1 and *Rv*-HgSe 2 were in agreement with the results obtained from determinations in the muscle-tissue samples; in this case, the $C_{Hg_{total}}$ and $C_{Se_{total}}$ were higher in the *Pa*-HgSe 2 and *Rv*-HgSe 2 groups, compared to *Pa*-HgSe 1 and *Rv*-HgSe 1 groups. These results attested that individuals from the *Pa*-HgSe 1 and *Rv*-HgSe 1 groups (i.e., the control groups) and the *Pa*-HgSe 2 and *Rv*-HgSe 2 groups could be used in an analysis of the relative abundance variation of proteins in the muscle proteome of the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species (i.e., the biological replicates). The results of the Hg_{total} and Se_{total} determinations in certified reference material DORM 4 (i.e., fish protein) showed a recovery percentage of approximately 98% and a relative standard deviation of less than two, which proves the robustness of the method used in the Hg_{total} and Se_{total} determinations (Vieira et al., 2023).

Table 3. Total Hg and Se concentrations in protein *pellets* from muscle tissue of *Psectrogaster amazonica* e *Raphiodon vulpinus*.

Identification	Concentration (Hg-total) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentration (Se-total) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
<i>Pellet-Pa</i> -HgSe 1	6.44 $\pm$ 0.11	10.14 $\pm$ 0.17
<i>Pellet-Pa</i> -HgSe 2	32.14 $\pm$ 0.54	40.14 $\pm$ 0.67
<i>Pellet-Rv</i> -HgSe 1	26.53 $\pm$ 0.43	44.22 $\pm$ 0.73
<i>Pellet-Rv</i> -HgSe 2	48.35 $\pm$ 0.78	58.94 $\pm$ 0.97
DORM-4	402 $\pm$ 6,44	3,494 $\pm$ 66

Pa-HgSe 1 – group of individuals of the species *Psectrogaster amazonica* with < [Hg-total] and [Se-total]; *Pa*-HgSe 2 – group of individuals of the species *Psectrogaster amazonica* with > [Hg-total] and [Se-total]; *Rv*-HgSe 1 – group of individuals of the species *Raphiodon vulpinus* with < [Hg-total] and [Se-total]; *Rv*-HgSe 2 – group of individuals of the species *Raphiodon vulpinus* with > [Hg-total] and [Se-total]; DORM-4 (Certified Value - $\mu\text{g kg}^{-1}$); C_{Hg} = 410 $\pm$ 55; C_{Se} = 3,560 $\pm$ 340.

3.2. PRAVA in muscle proteome of the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species

The fractionation/characterization experiments and analysis of relative abundance variation of proteins in muscle proteome of the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species were carried out after the proteolytic cleavage procedures of the protein extracts, according to the procedure described in *Item 2.3*. Protein relative abundance variance analyses were performed by comparing the *Pa*-HgSe 1 and *Rv*-HgSe 1 groups (i.e., lower C_{HgSe}) with the *Pa*-HgSe 2 and *Rv*-HgSe 2 groups (i.e., higher C_{HgSe}) of the two fish species, based on the results obtained in the determinations of selenium and mercury and in the $C_{Setotal}$ and $C_{Hgtotal}$ values, as well as the Se HBV that was calculated. The obtained results are summarized in Tables 4 and 5.

Table 4. Proteins identified in muscle tissue of *Psectrogaster amazonica* species (*Pa*-HgSe 2 x *Pa*-HgSe 1).

Accession	Description	Score	
Unique Proteins			Unique
A8WGB	Collagen and calcium-binding EGF domain-containing protein 1	104.97	<i>Pa</i> -HgSe 2
P02018	Hemoglobin subunit alpha	318.92	<i>Pa</i> -HgSe 2
O13163	Hemoglobin subunit beta	216.59	<i>Pa</i> -HgSe 2
Q5BJA5	Histone H2B 1/2	428.60	<i>Pa</i> -HgSe 2
Q6PC60	Histone H2B 3	428.60	<i>Pa</i> -HgSe 2
Q9W7K5	L-lactate dehydrogenase A chain	531.76	<i>Pa</i> -HgSe 2
Q9PVK4	L-lactate dehydrogenase B-A chain	390.24	<i>Pa</i> -HgSe 2
Q6DGK2	L-lactate dehydrogenase B-B chain	150.28	<i>Pa</i> -HgSe 2
Down Regulated Proteins			<i>Pa</i> -HgSe 2 x <i>Pa</i> -HgSe 1
P83751	Actin_ cytoplasmic 1	233.91	0
Q7ZVF9	Actin_ cytoplasmic 2	233.91	0
Q9PVK4	L-lactate dehydrogenase B-A chain	121.18	0.01
Q5XJ10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	343.50	0
Q1MTI4	Triosephosphate isomerase A	178.69	0
Q90XG0	Triosephosphate isomerase B	178.69	0
Up Regulated Proteins			<i>Pa</i> -HgSe 2 x <i>Pa</i> -HgSe 1
Q90339	Myosin heavy chain_ fast skeletal muscle	180.57	1
P13104	Tropomyosin alpha-1 chain	561.40	1
Q9I8V0	Parvalbumin-2	173.34	1
P02618	Parvalbumin beta	659.38	1
O93409	Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform A	751.23	1
P53479	Actin_ alpha skeletal muscle	2193.15	1
P09227	Parvalbumin alpha	173.34	1
Q90339	Myosin heavy chain_ fast skeletal muscle	1264.44	1
Q6P0G6	Myosin_ light chain 1_ alkali; skeletal_ fast	638.78	1
P12115	Adenylate kinase isoenzyme 1	169.24	1

Tabela 5. Proteins identified in muscle tissue of *Rhaphiodon vulpinus* species (Rv-HgSe 2 x Rv-HgSe 1).

Accession	Description	Score	
Unique Proteins			Unique
Q32LQ4	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	148.44	Rv-HgSe 2
P80856	Fatty acid-binding protein_liver	187.53	Rv-HgSe 2
P82316	Hemoglobin cathodic subunit beta	230.72	Rv-HgSe 2
P02018	Hemoglobin subunit alpha	1592.19	Rv-HgSe 2
Q90486	Hemoglobin subunit beta-1	1581.28	Rv-HgSe 2
Q90485	Hemoglobin subunit beta-2	904.89	Rv-HgSe 2
P85312	Hemoglobin subunit beta-A (Fragment)	824.97	Rv-HgSe 2
P02139	Hemoglobin subunit beta-A/B	1501.36	Rv-HgSe 2
P85313	Hemoglobin subunit beta-B (Fragment)	824.97	Rv-HgSe 2
Q4KMC8	Fructose-bisphosphate aldolase C-A	172.71	Rv-HgSe 2
Down Regulated Proteins			Pa-HgSe 2 x Pa-HgSe 1
Q5XJ10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	872.52	0
Up Regulated Proteins			Pa-HgSe 2 x Pa-HgSe 1
O93409	Myosin regulatory light chain 2_skeletal muscle isoform A	1069.32	1
Q90339	Myosin heavy chain_fast skeletal muscle	658.15	1

It was observed that, few proteins showed *up-* or *downregulation* in the muscle proteome of both fish species. In this case, six proteins had downregulation and 10 had upregulation in the muscle proteome of *Psectrogaster amazonica*; and only one protein presented *downregulation* and two *upregulation* in the muscle proteome of *Rhaphiodon vulpinus* species. Regarding the proteins that were *unique*, eight proteins were only expressed in Group Pa–HgSe 2 of the muscle proteome of the *Psectrogaster amazonica* and 10 in Group Rv–HgSe 2 of the *Rhaphiodon vulpinus*. The proteins and/or enzymes that were unique and/or with different expression will be discussed next to investigate a possible correlation with the $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$ determined in the Pa–HgSe 2 and Rv–HgSe 2 groups.

Based on the results in Tables 1 and 2, it can be seen that few proteins showed up- or downregulation in the muscle proteome of both fish species. In this case, six proteins showed downregulation and 10 upregulation in the muscle proteome of *Psectrogaster amazonica*; and only one protein showed *downregulation* and two *upregulation* in the muscle proteome of *Rhaphiodon vulpinus*. Regarding unique proteins, eight proteins were expressed in the Pa–HgSe 2 group of the muscle proteome of *Psectrogaster amazonica*; and 10 in the Rv–HgSe 2 group of *Rhaphiodon vulpinus*. As for the proteins and/or enzymes that were unique and/or with different expressions and seeking a possible correlation with the $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$ determined in the Pa–HgSe 2 and Rv–HgSe 2 groups, a PRAVA analysis identified four proteins/isoforms and

three enzymes/isoforms that were expressed as unique in the Pa–HgSe 2 and Rv–HgSe 2 groups (i.e., with higher C_{Se} and C_{Hg}).

Regarding proteins, the literature reports that the Hemoglobin subunits (Hbs) (i.e., the proteins involved in oxygen transport from the gills to peripheral tissues in fish); the Histone/isoforms (i.e., the proteins that act in the regulation of DNA transcription); and the fatty acid-binding protein in the liver (FABP1) (i.e., FABPs belong to the proteins family involved in lipid metabolism) were identified in Hg-linked protein spots (C_{Hg} in protein spots: 2–20 mg kg⁻¹) in the muscle, liver, and kidney proteomes of fish from the Amazon (Bataglioli et al., 2019; Bittarello et al., 2019; Bittarello et al., 2020; Hake & Allis, 2006; UniProt, 2024; Vidanes et al., 2005; Vieira et al., 2018). These authors indicated that the binding of Hg species in the Hbs, histone, and FABPs structures could be attributed to the presence of cysteine and/or methionine residues, which are amino acids that present thiol and/or thioether groups (i.e., soft bases) and have great affinity by Hg species (i.e., soft acids) (Bittarello et al., 2020; Pearson, 1963).

The collagen protein and the calcium-binding EGF domain-containing protein 1 (CCBE1) participate in lymphangioblast budding and angiogenic sprouting of the venous endothelium during embryogenesis (Husmann et al., 2023; UniProt, 2024); these were only expressed in the Pa–HgSe 2 and Rv–HgSe 2 groups. While the extant literature does not report Hg binding in CCBE1 structures, CCBE1 also has a FASTA sequence with cysteine and methionine residues, which are amino acids that have thiol and thioether groups, respectively (i.e., soft bases). As such, Hg and Se coordination (i.e., soft acids) may occur in the CCBE1 structure.

A metalloproteomic studies by Almeida et al. (2024) reported the identification of Hb beta 1, 2, and alpha ½-subunits in Hg-linked protein spots in the renal proteome of rats exposed to mercuric chloride (C_{Hg} in protein spots: 84–138 mg kg⁻¹). The authors posited that the PRAVA variance indicated that the beta 1, 2, and alpha ½-subunits of Hb showed *downregulation*, which could qualify the Hb subunits as possible biomarkers of exposure to the Hg species. In the same study (i.e., Almeida et al., 2024) the authors reported that PRAVA indicated that H3.1 and H3.3 were only expressed in the control group of rats exposed to mercuric chloride (HgCl₂); this result corroborates data from a metalloproteomic study by Bitarello et al. (2020), who examined kidney tissue from the *Colossoma macropomum* species from the Amazon River, which reports the identification of Histone H4 in Hg-linked protein spots (C_{Hg} = 5.85 mg kg⁻¹).

Metalloproteomic studies by Bittarello et al. (2019) and Santiago et al. (2023) identified the FABP3 isoform in Hg-linked protein spots (C_{Hg} = 2.70 mg kg⁻¹) in the muscle proteome of *Plagioscion squamosissimus* from the Amazon, and the FABP1 isoform in Hg-linked protein

spots ($C_{\text{Hg}} = 63.0 \text{ mg kg}^{-1}$) that was only expressed in the liver proteome of rats exposed to HgCl_2 , respectively; in both studies, the authors highlighted that a decrease in the expression of FABPs may occur when fish organisms are exposed to xenobiotics such as Hg (Wang et al., 2013). The L-lactate dehydrogenase (LDH) enzyme and isoform (i.e., the enzyme that acts in converting pyruvate to lactate process in carbohydrates and carboxylic metabolic acids); betaine-homocysteine S-methyltransferase (BHMT) (i.e., the enzyme that catalyzes the betaine conversion and homocysteine to dimethylglycine and methionine, respectively); and Fructose-bisphosphate aldolase C-A (ALDOCA) (i.e., the enzyme that present Zn^{2+} specific domains in its side chains and acts in gluconeogenesis reactions) also showed expression only in the Pa-HgSe 2 and Rv-HgSe 2 groups (UniProt, 2024).

The literature further reports that LDH and isoforms, BHMT and ALDOCA were identified in Hg-linked protein spots (C_{Hg} in protein spots: ranging from 3.00–160.00 mg kg^{-1}) in the muscle, liver, and kidney proteomes from Amazon fish (Bittarello et al., 2020; Bataglioli et al., 2022; Queiroz et al., 2019; Vieira et al., 2023). These authors explained that the binding of Hg species in three enzyme structures directly affects the biological activities thereof Since PRAVA was not carried out to identify whether there was impairment in the enzymes' expression in respective proteomes, however, the robustness of these conclusions was compromised. The LDH/isoforms, BHMT, and ALDOCA have cysteine and methionine residues in the FASTA sequences and amino acids that have thiol and thioether groups (i.e., soft bases), respectively. Thiol and thioether groups can form stable bonds with Hg and Se species (i.e., soft acids) (Bittarello et al., 2020; Pearson, 1963). BHMT and ALDOCA also have specific domains for Zn^{2+} ions; when this happens, Hg and Se species could displace Zn^{2+} from these domains, thereby binding to these enzyme structures (Bataglioli et al., 2022; Queiroz et al., 2019).

Regarding the BHMT enzyme, it is noteworthy that metalloproteomic study with rats exposed to HgCl_2 using 2D PAGE – GFAAS – LC – MS/MS, reported that BHMT was only expressed in Hg-linked protein spots ($C_{\text{Hg}} = 15.40 \text{ mg kg}^{-1}$) of the proteome of rats exposed to HgCl_2 (Santiago et al., 2023). This finding corroborates data reported in the present study and in the study by Queiroz et al. (2019) cited above.

In the present study, the PRAVA results indicated that the proteins Hbs subunits, Histone/isoforms, and FABP1, and the enzymes LDH/isoforms, BHMT, and ALDOCA were expressed as unique proteins/enzymes in Pa-HgSe 2 and Rv-HgSe 2 groups of the muscle proteome of the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species. The Pa-HgSe 2 and Rv-HgSe 2 groups showed higher C_{Hgtotal} and C_{Setotal} in muscle tissue and in protein pellets, with C_{Setotal} being higher than C_{Hgtotal} , which was reflected in positive values of Se HBVs. In principle,

it can therefore be inferred that the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species have Se reserves in the muscle tissue to control the toxic effects of Hg (Lino et al., 2018). In this case, the Se presence could be forming *metal binding protein* (MBP), such as: [Se–Hg]–Hbs; [Se–Hg]–Histones; [Se–Hg]–FABP1; [Se–Hg]–CCBE1; [Se–Hg]–LDH/isoforms; [Se–Hg]–BHMT and [Se–Hg]–ALDOCA. The binding of the [Se–Hg] (i.e., soft acid) -complex in the protein/enzyme structures must possibly occur in thiol (i.e., R–SH) and/or thioether groups (i.e., soft bases) of cysteine and methionine residues present in their FASTA sequences, as has already been highlighted in the above text (e.g., Bittarello et al., 2020; Pearson, 1963). Therefore, the Se/Hg-linked MBP were only expressed in the *Pa*–HgSe 2 and *Rv*–HgSe 2 groups, which presented higher C_{Setotal} and C_{Hgtotal} levels.

Regarding the *up*- and/or *downregulation* results (Tables 1 and 2), only seven proteins and 12 proteins and/or enzymes showed a decrease and/or increase in expression in the *Pa*–HgSe 2 and *Rv*–HgSe 2 groups, respectively. It is noteworthy that the *Pa*–HgSe 2 group, which demonstrated lower C_{Setotal} and C_{Hgtotal} , also presented a greater number of proteins and/or enzymes with *up*- and/or *downregulation*; this indicates that this effect may not be related to the binding of Se and Hg species in the structures of these proteins and/or enzymes. When analyzing the results in Tables 1 and 2, it is therefore possible to highlight the actin (actbb and acta1) and parvalbumin isoforms (pvalb2, pvalb β , and pavalb α), the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh) and triosephosphate isomerase isoforms (tpi1a and tpi1b), which were expressed with *up*- or *downregulation* in the muscle proteome of the *Pa*–HgSe 2 group. Metalloproteomic studies with *Semaprochilodus* spp. and *Arapaima gigas* from the Amazon region reported the identification of actbb and acta1 isoforms and pvalb2, pvalb α , and pavalb β isoforms in Hg-linked protein spots of the muscle and liver proteomes of these fish (Bataglioli et al., 2022; Vieira et al., 2023). The gapdh enzyme and the tpi1a and tpi1b isoforms were identified in Hg-linked protein spots in the muscle and liver proteomes of *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Mylossoma* sp., *Myleus* sp., *Prochilodus nigricans*, and *Cichla* sp.—which are species fish from the Amazon region—and also through metalloproteomic strategies (Cavecci–Mendonça et al., 2020; Vieira et al., 2023). However, these studies papers did not perform PRAVA to investigate whether actbb and acta; pvalb2, pvalb α , and pavalb β ; tpi1a and tpi1b; and gapdh showed expression differences, which limited the discussion of results. The myosin isoforms, the tropomyosin alpha-1 chain (tpma) and adenylate kinase isoenzyme 1 (ak1) enzyme were primarily expressed with *upregulation* in the *Pa*–HgSe. To date, the literature does not report studies related to Hg or Se species associated with myosin, tpma, or ak1. As these

1 proteins/enzymes were expressed with *upregulation* in higher quantities in *Psectrogaster*
2 *amazonica* muscle proteome, the species that presented lower C_{Se} and C_{Hg}, the expression
3 increase may not be related to the Se and Hg concentrations in the fish muscle tissue. Only
4 myosin isoforms were expressed with *upregulation* and gapdh was expressed with
5 *downregulation* in the Rv–HgSe 2 group, which indicates the non-relationship of C_{Se} and C_{Hg} to
6 the differences in relative abundance variance *Up/Down* of proteins/enzymes shown in Tables 4
7 and 5.

8 3.3. Analysis of parameters related to oxidative stress

9 The results obtained of CAT, GPx, and SOD activity; the LPO activity, and the LPO
10 concentration are summarized in Figure 1 and Table 6. The CAT, GPx, and SOD activities and
11 the LPO concentration, were carried out with the aim of investigating whether Hg concentrations
12 present in the organism of the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species could
13 trigger an oxidative stress state.

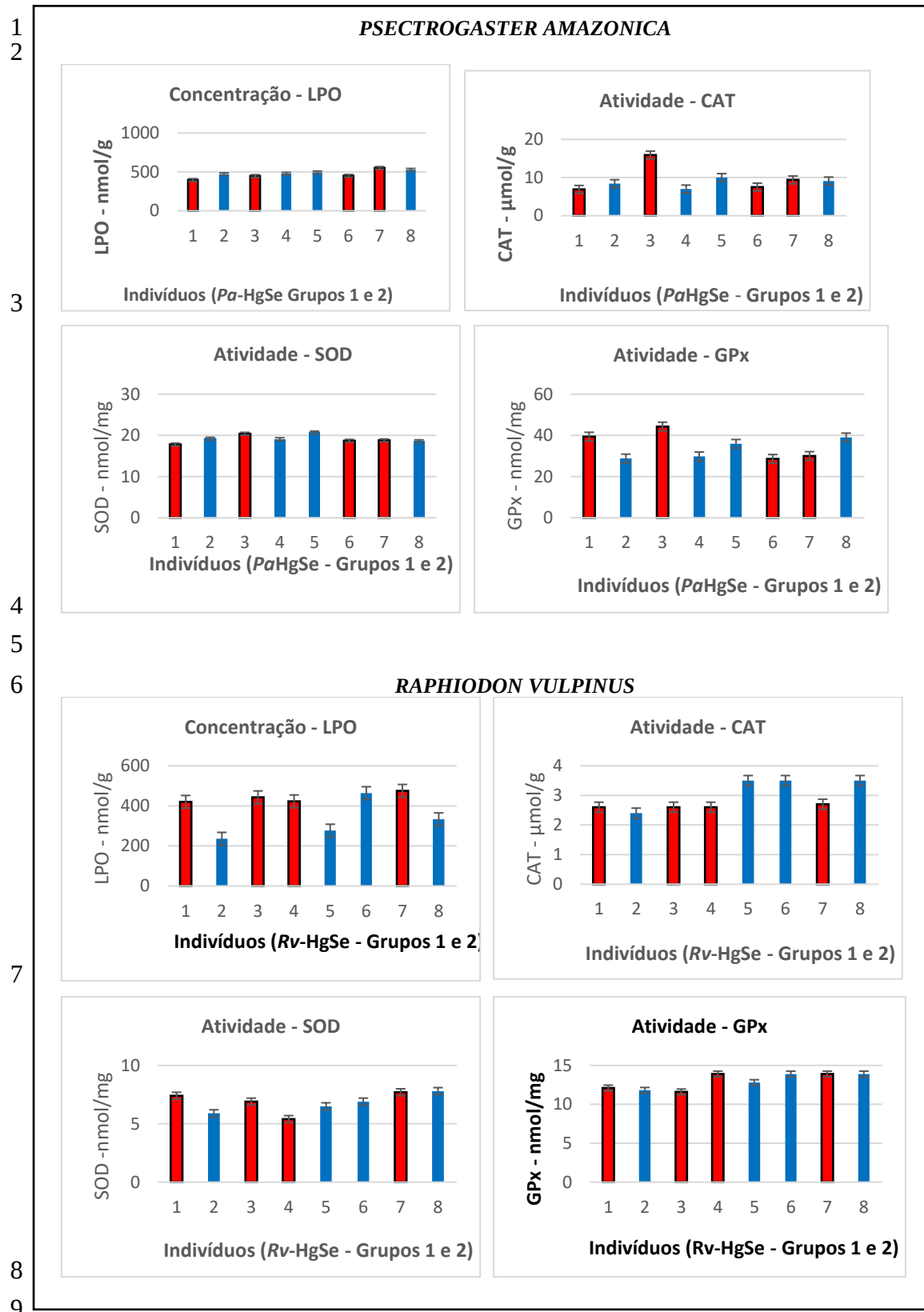


Figura 1. Activity of SOD, CAT and GPx enzymes, and LPO concentration determined in the muscle tissue of “individuals” of species *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species.

Analyzing the results in Figure 1, the values referring to the SOD, CAT, and GPx enzyme activities and the LPO concentration were apparently not correlated with $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$, considering individuals with lower (i.e., red bars) and higher concentrations (i.e., blue bars) of Se and Hg for both the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species. It is possible to observe maximum and minimum values of CAT, SOD, and GPx activities and LPO concentrations among individuals who presented lower and/or higher concentrations of Hg and/or Se (Table 6).

Tabela 6. Spearman's Correlation Coefficient calculated in relation to $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$ and the activities of the enzymes CAT, SOD and GPx, and LPO concentration in the muscle tissue of *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus*.

Variables	LPO CCSp.	CAT CCSp.	SOD CCSp.	GPx CCSp.
<i>Psectrogaster amazonica</i>	-	-	-	-
Group with $<C_{Hgtotal}$	-0,9840*	-0,04105 ^{NS}	-0,5412*	0,6137*
Group with $>C_{Hgtotal}$	-0,2419 ^{NS}	-0,1160 ^{NS}	0,4781 ^{NS}	-0,06230 ^{NS}
Group with $<C_{Setotal}$	-0,9829*	-0,04270 ^{NS}	0,7915*	0,6310*
Group with $>C_{Setotal}$	-0,2424 ^{NS}	-0,1142 ^{NS}	0,5963*	-0,06270 ^{NS}
<i>Raphiodon vulpinus</i>	-	-	-	-
Group with $<C_{Hgtotal}$	-0,9413*	-0,7287*	-0,6072*	0,4106 ^{NS}
Group with $>C_{Hgtotal}$	-0,4641 ^{NS}	0,4074 ^{NS}	-0,1865 ^{NS}	0,7909*
Group with $<C_{Setotal}$	-0,9625*	-0,7835*	-0,6168*	0,5275*
Group with $>C_{Setotal}$	-0,2537 ^{NS}	0,4233 ^{NS}	-0,3355 ^{NS}	0,8906*

CCSp. – Spearman Correlation Coefficient; * Significant ($p < 0,05$); NS – non-significant ($p \geq 0,05$)

The Spearman correlation coefficient (CCSp) values, calculated by correlating the lowest $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$ with the CAT, SOD, and GPx activities and LPO concentration followed the same behavior (Table 3), presenting seven CCSp.(+) ($p < 0.05$) with values ranging from 0.59–0.89 and nine CCSp.(–) with values ranging from –0.54 to –0.98. Most CCSp.(+) and/or (–) values were non-significant ($p \geq 0.05$). In relation to LPO concentrations, it can be observed for both fish species that the groups with lower $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$ presented CCSp.– and significant, however, the groups with higher $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$ present CCSp. non-significant. The values of CCSp. for CAT they presented CCSp.(–) only for the groups with lower $C_{Hgtotal}$ and $C_{Setotal}$ of *Raphiodon vulpinus*. The other values of CCSp.(+) and/or CCSp.(–) were non-significant for the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species. In relation to SOD (i.e., the *Psectrogaster amazonica* species), CCSp.(+) values were observed and significant for the groups with lower $C_{Setotal}$, and there were non-significant values for the groups with lower $C_{Hgtotal}$. Still

in relation to SOD for *Raphiodon vulpinus*, CCSp.(–) values were significant for the groups with lower $C_{Hg_{total}}$ and $C_{Se_{total}}$ and were non-significant for the groups with higher $C_{Hg_{total}}$ and $C_{Se_{total}}$. As for GPx, in relation to the *Psectrogaster amazonica* species, significant values of CCSp.(+) were observed for the groups with lower $C_{Hg_{total}}$ and $C_{Se_{total}}$, whereas the CCSp. values were non-significant for the groups with higher $C_{Hg_{total}}$ and $C_{Se_{total}}$. In relation to the *Rhaphiodon vulpinus* species, GPx activity values showed positive, significant correlations CCSp.(+) for the groups with higher $C_{Hg_{total}}$, lower $C_{Se_{total}}$, and higher $C_{Se_{total}}$. Bittarello et al. (2020) worked with the *Plagioscion squamosissimus* (i.e., carnivorous) and *Colossoma macropomum* (i.e., omnivorous) species from the Brazilian Amazon and observed a trend toward greater GPx activity and LPO concentration in the liver tissue of the *Plagioscion squamosissimus* species, which had the highest concentration of mercury. The calculated CCSp. values demonstrated the occurrence of a negative correlation between GPx activity with the Hg_{total} concentration (-0.7040 , $C_{Hg_{total}} = 279 \pm 4.41 \mu g kg^{-1}$); this was not observed with the data reported in this study, which presents a positive correlation. These authors concluded that the GPx inhibition by Hg could be related to the Hg–Selenol interaction; in this paper, however, Se determinations were not made in the fish liver-tissue samples, which would provide greater support to the results thereof. Data in the present study demonstrated a positive correlation between GPx activity in relation to C_{Hg} in the *Raphiodon vulpinus* species, which has higher Hg concentrations. However, a positive correlation with C_{Se} was also indicated, which were higher than C_{Hg} . The Se determinations allowed us to calculate the Se HBV values, which presented positive values and greater-than-1 for the *Pa*–HgSe 2 (*Psectrogaster amazonica* species, non-predatory with higher C_{Hg}) and *Rv*–HgSe 2 (*Raphiodon vulpinus* species, predator with higher C_{Hg}) groups. The results reported herein therefore provide new insights into studies on the attenuating effect of Se on the ability of Hg mercury to generate an oxidative species and the possible triggering of oxidative stress.

4. Conclusions

The average Hg:Se molar ratio presented lower values in relation to the average Se:Hg molar ratio for the *Psectrogaster amazonica* (i.e., non-predator) and *Raphiodon vulpinus* (i.e., predator) species, which reflected positive Se HBV values for two groups (i.e., with higher and lower C_{Hg}) of both fish species, which confirmed that the organism

1 of both species has available selenium in the muscle tissue to attenuate the toxic effects
 2 of mercurial species. The PRAVA in the muscle proteome identified few proteins and/or
 3 enzymes with *up-* or *downregulation*. Moreover, a reduced number of unique proteins
 4 were expressed in the group with higher C_{Hg} , which also presented higher C_{Se} than C_{Hg} ;
 5 notably, the group with higher C_{Hg} also presented higher C_{Se} than C_{Hg} . It can therefore be
 6 inferred that Se could attenuate the Hg negative action on functions these proteins and/or
 7 enzymes through Se:Hg complex formation on the structures of these macromolecules.
 8 The results of SOD, CAT, and GPx enzyme activities and the LPO concentrations showed
 9 higher correlations with C_{Se} than C_{Hg} , which indicates the nonoccurrence of oxidative
 10 stress in the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* species. These insights
 11 determine that consumption of the *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus*
 12 species as a source of protein for traditional populations from the Amazon does not
 13 present a risk of exposure to mercurial species.

References

Almeida, E.C.; Faria, V.D., Cirinêu, F.D.; Santiago, M.G.A., Miotto, B.; Vieira, J.C.S.; Braga, C.P., Adamec, J., Fernandes, A.A.H., Buzalaf, M.A.R., Padilha, P. M., 2024. Metalloproteomic Investigation of Hg-Binding Proteins in Renal Tissue of Rats Exposed to Mercury Chloride. International Journal Molecular Science 25, 164.

Assunção, A. S. A., Martins, R. A., Vieira, J. C. S., Rocha, L. C., Krenchinski, F. K. L., Buzalaf, M. A. R., Sartori, J. R., Padilha, P. M., 2023. *Shotgun* proteomics reveals changes in the pectoralis major muscle of broilers supplemented with passion fruit seed oil under cyclic heat stress conditions. Food Research International 167, 112731.

Bataglioli, I. C., Vieira, J. C. S., Queiroz, J. V., Fernandes, M. S., Bittarello, A. C., Braga, C. P.; Buzalaf, M. A. R.; Adamec, J., Zara, L. F., Padilha, P. M., 2019. Physiological and functional aspects of metal-binding protein associated with mercury in the liver tissue of pirarucu (*Arapaima gigas*) from the Brazilian Amazon. Chemosphere 236, 124320.

Bataglioli, I. C. B., Queiroz, J. V., Vieira, J. C. S., Cavalline, N. G., Braga, P. B., Buzalaf, M. A. R., Zara, L. F., Adamec, A., Padilha, P. M., 2022. Mercury metalloproteomic profile in muscle tissue of *Arapaima gigas* from the Brazilian Amazon. Environ. Monit. Assess 194, 705-716.

Bittarello, A.C., Vieira, J.C.S., Braga, C.P., de Paula Araújo, W.L., da Cunha Bataglioli, I., da Silva, J.M., Buzalaf, M.A.R., Fleuri, L.F., Padilha, P.M., 2019. Characterization of molecular biomarkers of mercury exposure to muscle tissue of *Plagioscion squamosissimus* and *Colossoma macropomum* from the Amazon region. *Food Chem.* 276, 247–254.

Bittarello, A. C., Vieira, J. C. S., Braga, C. P., Bataglioli, I. C., Oliveira, G., Rocha, L. C., Zara, L. F., Buzalaf, M. A. R., Oliveira, L. C. S., Adamec, J., Padilha, P. M., 2020. Metalloproteomic approach of mercury-binding proteins in liver and kidney tissues of *Plagioscion squamosissimus* (corvina) and *Colossoma macropomum* (tambaqui) from Amazon region: Possible identification of mercury contamination biomarkers. *Science of The Total Environment* 711, 134547.

Beutler, E., 1975. Red cell metabolism: A manual of biochemical a methods. Grune&Stron, New York.

Crouch, R. K., Gandy, S. E., Kimsey, G., Galbraith, R. A., Galbraith, G. M. P., Buse, M. G., 1981. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 30, p. 235–241.

Erden, M., Bor, N. M., 1984. Changes of reduced glutathion, glutathion reductase, and glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. *Biochemical Medecine* 31, 217-227.

Garcia, J. S.; Magalhães, C. S., Arruda, M. A. Z., 2006. Trends in metal-binding and metalloproteins analysis. *Talanta* 69, 1-15.

Gochfeld, M., Joanna Burger, J., 2021. Mercury interactions with selenium and sulfur and the relevance of the Se:Hg molar ratio to fish consumption advic. *Environmental Science and Pollution Research* 28 18407–18420.

Jiang, Z. Y., Woollard, A. C. S., Wolff, S. P., 1991. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853–856.

Kaneko, J., N. Ralston, N., 2007. Selenium and mercury in pelagic fish in the Central North Pacific near Hawaii, *Biol. Trace Elem. Res.* 119 (2007) 242–254.

- Lino, A. S., Kasper D, Guida Y. S., Thomaz J. R., Malm, O., 2018. Mercur and selenium in fishes from the Tapajós River in the Brazilian Amazon: An evaluation of human exposure. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 48, 196–201.
- Malabarba, L. R., Malabarba, M. C., 2020. Phylogeny and classification of Neotropical fish. In: *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*, 19, Academic Press.
- Mellingen, R.M., Myrmel, L.S., Rasinger, J.D., Lie, K.K., Bernhard, A., Madsen, L., Nøstbakken, O.J. D., 2022. Selenomethionine Reduce Mercury Tissue Levels and Modulate Methylmercury Induced Proteomic and Transcriptomic Alterations in Hippocampi of Adolescent BALB/c Mice. *International Journal Molecular Science* 23, 12242.
- Moraes, P. M., Santos, F. A., Cavecci, B., Padilha, C. C. F., Vieira, J. V. S., Roldam, P. S., Padilha, P.M., 2013. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. *Food Chemistry* 141, 2614–2617.
- Mounicou, S., Szpunar, J., Lobinski, R., 2009. Metallomics: The concept and methodology. *Chem Soc Rev* 38, 1119–1138.
- Pacheco, A. C., Bartolette, R., Caluca, J. F., De Castro, A. L. M., Albrecht, M. P., Caramaschi, E. P., 2009. Dinâmica alimentar de *Rhaphiodon vulpinus* Agassiz, 1829 (Teleostei, Cynodontidae) no alto Rio Tocantins (GO) em relação ao represamento pela UHE Serra da Mesa. *Biota Neotropica* 9:3, 77-84.
- Pearson, R. G., 1963. Hard and Soft Acids and Bases, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3533–3539.
- Ralston, N. V. C., Raymond, L. J., 2018. Mercury's neurotoxicity is characterized by its disruption of selenium biochemistry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1862, 2405–2416.
- Santiago, M. G. A., Faria, V. D., Cirinêu, F. D., da Silva, L. L. L.Q., Almeida, E. C., Cavallini, G. C., Vieira, J. C. S., Fernandes, A. A. H., Braga, C. P., Zara, L. F., Buzalaf, M. A. R., Adamec, J., Padilha, P.M., 2022. Metalloproteomic approach to liver tissue of rats exposed to mercury. *Chemosphere*, 312, 137222.

Silva, F. A., Neves, R. C. F., Quintero-Pinto, L. G., Padilha, C. C. F., Jorge, S. M. A., Barros, M. M., Pezzato, L. E., Padilha, P. M., 2007. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. *Chemosphere* 68, 1542–1547.

Szpunar J., 2005. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst* 130(4), 442-465.

Tomza-Marciniak, A., Pilarczyk, B., Drozd, R., Pilarczyk, R., Juszczak-CzasnojC, M., Havryliak, V., Podlasinska, J., Udała, J., 2023. Selenium and mercury concentrations, Se:Hg molar ratios and their effect on the antioxidant system in wild mammals. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 322, 121234.

Vieira, J. C. S., Braga, C. P., de Queiroz, J. V., Cavecci-Mendonça, B., de Oliveira, G., de Freitas, N. G., Fernandes, A. A. H., Fernandes, M. D. S., Buzalaf, M. A. R., Adamec, J., Zara, I. F., Padilha, P. M., 2023.. The effects of mercury exposure on Amazonian fishes: An investigation of potential biomarkers. *Chemosphere* 2023, 316, 137779.

CAPÍTULO IV

Implicações

1 IMPLICAÇÕES

2 A presença de mercúrio na região amazônica representa uma preocupação
3 significativa devido aos seus efeitos tóxicos nos ecossistemas e na saúde humana,
4 especialmente através do consumo de peixes contaminados. No entanto, a pesquisa
5 sugeriu que o selênio pode atenuar os efeitos nocivos do Hg nos organismos. Por meio da
6 metalômica, esta tese explorou os mecanismos pelos quais o Se exerce seu efeito protetor
7 em duas espécies de peixes amazônicos, *Psectrogaster amazonica* (Branquinha) e
8 *Raphiodon vulpinus* (Cachorra), no rio Madeira, Rondônia/Brasil.

9 Tanto o 2D-PAGE quanto a técnica *Shotgun* têm suas limitações. Contudo, ao adotar
10 abordagens proteômicas diferentes nos tecidos musculares e hepáticos estudados neste
11 trabalho, revela-se um potencial quando analisadas em conjunto. Isso pode fornecer uma
12 explicação mais abrangente e uma visão completa dos diferentes proteomas.

13 Os resultados do estudo revelaram várias implicações importantes:

14 Identificação de *Metal Binding Proteins* (MBP): A análise metalômica revelou a
15 presença de MBPs associadas ao Hg e Se no tecido hepático e muscular das espécies
16 estudadas. A identificação dessas proteínas sugere a formação de complexos binucleares
17 de Hg/Se, indicando um possível mecanismo pelo qual o Se pode mitigar a toxicidade do
18 Hg.

19 Ligação do Selênio e Proteção contra Estresse Oxidativo: A ligação do Se com as
20 MBPs pareceu estar associada à ausência de estresse oxidativo nas amostras estudadas,
21 conforme demonstrado pela atividade das enzimas antioxidantes. Isso sugere que a
22 presença de Se pode ajudar a prevenir os danos oxidativos induzidos pelo Hg.

23 Reservas de Selênio no Tecido Muscular: Os valores de Selênio para benefícios à
24 saúde (Se HBVs) foram superiores aos valores considerados protetores para ambas as
25 espécies de peixes, indicando que elas possuem reservas adequadas de Se para controlar
26 os efeitos tóxicos do Hg.

27 Expressão Diferencial de Proteínas em Resposta à Exposição ao Hg e Se: A análise
28 proteômica revelou diferenças na expressão de proteínas em grupos com diferentes
29 concentrações de Hg e Se. Proteínas únicas expressas em grupos com maiores
30 concentrações de Hg e Se sugerem adaptações específicas das espécies para lidar com a
31 toxicidade do Hg.

32 Esses achados têm implicações importantes não apenas para a compreensão dos
33 mecanismos de toxicidade do Hg em peixes, mas também para o desenvolvimento de

- 1 estratégias de manejo e conservação dos ecossistemas aquáticos da região amazônica.
- 2 Além disso, destacam a importância do consumo consciente de peixes para a segurança
- 3 alimentar das populações locais. Essa pesquisa fornece novos insights que podem orientar
- 4 futuros estudos sobre a interação entre o Hg e o Se em ecossistemas aquáticos e suas
- 5 implicações para a saúde humana e ambiental.
- 6