

Estudo metaloproteômico do mercúrio em amostras de tecido hepático de peixes coletados na área de influência do AHE JIRAU - Bacia do rio Madeira

JOSÉ CAVALCANTE SOUZA VIEIRA

Biólogo

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *BIOMOLÉCULAS - ESTRUTURA E FUNÇÃO*.

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Estudo metaloproteômico do mercúrio em amostras de tecido hepático de peixes coletados na área de influência do AHE JIRAU - Bacia do rio Madeira

JOSÉ CAVALCANTE SOUZA VIEIRA

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *BIOMOLÉCULAS - ESTRUTURA E FUNÇÃO*.

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

BOTUCATU – SP

Ano 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha -----

Prof. Dra. Fernanda Mani -----

Prof. Dr. Paulo dos Santos Roldan -----

Exemplar correspondente á redação final da
Dissertação para obtenção do título de Mestre
em Biologia Geral e Aplicada, defendida pelo
aluno José Cavalcante Souza Vieira e
aprovada pela Comissão Julgadora em 25 de
fevereiro de 2014.

Porf. Dr. Pedro de Magalhães Padilha
Presidente da Banca

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Vieira, José Cavalcante Souza.

Estudo metaloproteômico do mercúrio em amostras de tecido hepático de peixes coletados na área de influência do AHE JIRAU - Bacia do rio Madeira / José Cavalcante Souza Vieira. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Capes: 20801009

1. Peixe - Pesquisa. 2. Mercúrio. 3. Eletroforese. 4. Espectrometria de massa. 5. Metaloproteínas. 6. Madeira, Rio (RO e AM).

Palavras-chave: 2D-PAGE; Eletroforese; Mercúrio; Metaloproteômica.

AUXÍLIOS FINANCEIROS

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Processos: 2012/24035-5 (M) e 2010/51332-5



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

P&D: 6631-0001/2012

Contrato Jirau 004/13



CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Processo: 472388/2011-8



FUNDIBIO – Fundação do Instituto de Biociências



Dedico este trabalho aos meus pais JOSÉ CAVALCANTE e MARIA VIEIRA. Meus amigos, companheiros inseparáveis em todos os momentos de minha vida, por tudo que fizeram e fazem por mim. São os grandes responsáveis pelo meu sucesso, luta, dedicação... Vocês merecem todo o meu respeito, carinho, amor e admiração.

Dedico também a meu avô Pedro Cavalcante

Meu amigo, meu companheiro.

Que o Sr esteja em um bom lugar!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me dado forças, coragem e saúde para buscar realizar meus sonhos. Buscar além dos meus horizontes, ter ousadia para enfrentar as dificuldades financeiras, distância da família e buscar algo novo. Obrigado meu Deus por tudo!!!

A meus pais, José e Maria, por serem meus principais incentivadores e me apoiarem em tudo. Dar-me condições para que pudesse estudar. Muitas vezes ter deixado de comprar uma roupa, um calçado ou até mesmo algo para comer para investir em meus estudos. Amo vocês!! Obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim. Vocês são meus alicerces verdadeiros, meus amigos e companheiros para qualquer hora ou lugar. Sem o apoio de vocês eu não teria chegado a lugar algum!

Agradeço a toda minha família por todo apoio que me dão: minha avó Joana, meu tio Orozino, minhas irmãs Elizete e Marizete (Biólogas também). Obrigado!! Meus sinceros agradecimentos por todo apoio, carinho e companhia!

Aos meus professores que me incentivaram muito, me inspiraram, me fizeram acreditar mais em mim: Elza, Mauro, José Libério, Luíza, Helder, Fina, Pedro Padilha e todos os outros que fizeram parte de minha caminhada até o momento. Agradeço!!

A todos meus grandes amigos e amigas que conquistei durante minha vida. Meus amigos da escola, da faculdade... Por onde passei durante minha caminhada. A companhia de vocês tornou meus dias mais bonitos!

A minha namorada Grasieli de Oliveira (Bióloga) que desde que conheci tem tornado meus dias mais felizes e me ajudado com as correções dos meus textos. Mesmo estando a maior parte do tempo longe de mim tem me dado todo apoio, carinho, compreensão, respeito... você é incomparável! Te amo! Obrigado Amor!!!

Ao meu orientador Pedro de Magalhães Padilha pela dedicação, paciência, bondade, amizade, respeito. Por ter confiado em mim e no meu potencial, me dando essa oportunidade. Pessoa que aprendi a admirar muito e me espelhar. Obrigado prof. Pedro!

A meus colegas e amigos de laboratório: Cilene, Tetê, Felipe, Bruna, Mariana, Nubya, João, Paula Lima, Paula Martin, Vânia, Carla Pozzi (Carlita) e Camila Braga pela companhia, ajudas que me deram e por fazer dos meus dias mais felizes. Obrigado pelas piadas bobas que nos fizeram rir muitas!!

Obrigado Camila Braga, por estar sempre à disposição para ajudar a corrigir meus textos, tirar minhas dúvidas, pelos debates nas horas que os experimentos não estavam dando certo. Agradeço muito sua colaboração!

Agradeço a Carlita (Carla Pozzi) por sempre atender meus pedidos de socorros, me enviando material para estudos, apoio e pelas músicas do fundo do baú... e a Paula Martin pelas apostilas didáticas que me ajudaram muito! Obrigado!

A todos os amigos que fiz aqui na UNESP, que ajudaram principalmente quando cheguei, doando coisas para montar minha casa: Fina, Gaby, Lurdinha, Elaine, Luciana Manuel, Fabinho, prof. Fernando... a todos que conheço e são meus amigos. Obrigado!

Obrigado a todos os professores do Departamento de Química e Bioquímica do IB-UNESP/Botucatu por estarem dispostos a me ajudar no que precisei. A professora Fernanda Mani pela oportunidade de estágio docência e aos professores que me deram aulas durante o mestrado. Obrigado!!

A FAPESP e CAPES pela concessão das bolsas. Sem essa ajuda financeira eu não seria capaz de realizar meus estudos.

OBRIGADO A TODOS!!!

O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.

Cora Coralina

“Ser sincero ok, ser verdadeiro ok, mas não confunda seu direito a ter sentimentos com autorização para magoar quem não tem nada a ver com suas neuroses.”

Marisa de Abreu - Psicóloga

“Deus é o dono de tudo. Devo a Ele a oportunidade que tive de chegar aonde cheguei. Muitas pessoas têm essa capacidade, mas não têm essa oportunidade. Ele a deu para mim, não sei por quê. Sei que não posso desperdiçá-la”.

Ayrton Senna

HOMENAGEM AO ORIENTADOR

Caro professor e orientador **Pedro de Magalhães Padilha!**

Sabes que tuas palavras são a linha mestra para a gente!

Sempre que nos encontramos na situação de aluno/orientando, nos sentimos um pouco desorientados, precisando que alguém nos dê o norte a seguir, que nos diga palavras que gerem os famosos "desequilíbrios", palavras que nos incentivem a seguir em busca de algo maior, novo e maior, e que nos mostre novos horizontes, ou eu diria que não necessariamente mostre estes horizontes, mas que nos digam que eles existem e, assim, a gente parte em busca deles, inicialmente tateando no escuro, mesmo não tendo muita certeza que eles existam, mas acreditando no que foi dito, portanto, eles devem existir, até que, num belo dia ... uma luz, como uma estrela a nos guiar, nos indica o caminho para este novo, lindo, curioso, instigante e surpreendente horizonte.

(Rute)

Muito obrigado Professor Pedro, por todo apoio, paciência, compreensão, companheirismo, etc. que me dedicou durante essa fase tão importante de minha vida! Por me ajudar a vencer as dificuldades, superar muitas de minhas limitações. Obrigado por me espelhar no seu exemplo de profissional dedicado, honesto, prestativo... que é! É um orgulho para mim essa oportunidade de ter sido um dos seus orientados de mestrado.

Agradeço a confiança que depositou e deposita em mim!

MEUS MELHORES AGRADECIMENTOS!!

Sumula Curricula - 2012-2013 (Período de mestrado)

José Cavalcante Souza Vieira.

Dados pessoais

Nascimento: 22/03/1982

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Poxoréo/MT

Profissão: Biólogo

Formação acadêmica

Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidades Federal de Mato Grosso – UFMT/Rondonópolis/MT.

Artigos

POZZI, C. M. C.; BRAGA, C. P.; **VIEIRA, J. C. S.**; OKOSHI, M. P.; PADILHA, P. M. Metalloproteomic approach to the determination of calcium, iron and zinc bound to secretory immunoglobulin A in human milk. **The FASEB Journal** (Online) ^{JCR}, v. 27, p. 141, 2013.

BRAGA, C. P.; POZZI, C. M. C.; **VIEIRA, J. C. S.**; PADILHA, C. C. F.; OKOSHI, M. P.; FERNANDES, A. A. H.; PADILHA, P. M. Application of two-dimensional electrophoresis for plasma of normal and diabetic rats. **The FASEB Journal** (Online) ^{JCR}, v. 27, p. 141, 2013.

MORAES, P. M.; SANTOS, F. A.; CAVECCI, B.; PADILHA, C. C. F.; **VIEIRA, J. C. S.**; ROLDAN, P. S.; PADILHA, P. M. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. **Food Chemistry** ^{JCR}, v. 141, p. 2614-2617, 2013.

MORAES, P. M. ; SANTOS, F. A. ; PADILHA, C. C. F. ; **VIEIRA, J. C. S.**; ZARA, L. F. ; PADILHA, P. M. . A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. **Biological Trace Element Research** (Online) ^{JCR}, v. 148, p. 1, 2012.

MESSA, M.; **VIEIRA, J. C. S.**; CARDOSO, M. R. L.; SOUZA, F. S. SOS Rios do Brasil. **Bio-Ciente**, v. 10, p. 01, 2012.

Resumos publicados em congressos

POZZI, C. M. C.; SANTOS, P.; **VIEIRA, J. C. S.**; LIMA, P. M.; MOURAES, P. M.; SANTOS, F. A.; BALDASSINI, W. A.; CAVECCI, B.; BRAGA, C. P.; PADILHA, P. M. Análise proteômica de colostro, leite de transição e leite maduro humanos por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). In: 5^{to} Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2012, Montevidéo. **Anais do 5^{to} Congresso Iberoamericano de Química Analítica**, 2012.

BALDASSINI, W. A.; SANTOS, F. A.; CAPELLUPPI, L.; CHARDULO, L.; KATO, L. H.; PADILHA, P. M.; **VIEIRA, J. C. S.**; POZZI, C. M. C. Otimização de métodos bioanalíticos para avaliação das enzimas proteolíticas cálcio-dependentes -calpaína, m-calpaína e seu inibidor endógeno calpastatina em amostras do músculo Longissimus dorsi de bovinos da raça Nelore.. In: 5^o Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2012, Montevidéu. 2^o Congresso Uruguayo de Química Analítica, 2012.

POZZI, C. M. C.; BRAGA, C. P.; **VIEIRA, J. C. S.**; OKOSHI, M. P.; PADILHA, P. M. Metalloproteomic approach to the determination of calcium, iron and zinc bound to secretory immunoglobulin A in human milk. In: Experimental Biology, 2013, Boston, 2013, BOSTON. **The FASEB Journal**, 2013., 2013. v. 27.

MOURAES, P. M.; SANTOS, F. A.; CAVECCI, B.; PADILLHA, C. C. F.; **VIEIRA, J. C. S.**; ROLDAN, P. S.; ZARA, L. F.; PADILHA, P. M. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. In: **17 European Conference on Analytical Chemistry**, 2013, Varsóvia. EuroANALYSIS, 2013.

BRAGA, C. P.; **VIEIRA, J. C. S.**; CAVECCI, B.; PADILLHA, C. C. F.; FERNANDES, A. A. H.; PADILHA, P. M. TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS FOR PLASMA OF DIABETIC RATS. In: 3rd International Congress on Analytical Proteomics, 2013, São Pedro. **3rd ICAP**, 2013.

SANTOS, F. A.; CAVECCI, BRUNA; MORAES, P. M.; SANTOS, A.; **VIEIRA, J. C. S.**; PADILHA, P. M. . Estudo Metaloproteômico do Mercúrio em Leite Materno Coletado da População Ribeirinha do Rio Madeira - Rondônia. In: XVIII Congresso Brasileiro de Toxologia, 2013, Porto Alegre - RS. XVIII Congresso Brasileiro de Toxologia, 2013.

BRAGA, C. P.; **VIEIRA, J. C. S.**; CAVECCI, B.; MOURAES, P. M.; LIMA, P. M.; SANTOS, F. A.; FERNANDES, A. A. H.; PADILHA, P. M. Development of analytical methods for the application of metallomics in plasma of diabetic rats. In: 145th OMICS Group Conference, 2013, Las Vegas, NV, USA. Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques, 2013. v. 4.

SPEROTTO, F. C. S.; BRAGA, C. P.; **VIEIRA, J. C. S.**; LIMA, P. M. ; MOURAES, P. M.; CAVECCI, B. ; SANTOS, F. A. ; FERNANDES, A. A. H. ; PADILHA, P. M. Analysis of protein expression changes of rat plasma. In: 145th OMICS Group Conference, 2013, Las Vegas, NV, USA. Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques, 2013. v. 4.

PEIXOTO, M. R. L. V.; LIMA, P. M.; CAVECCI, B.; **VIEIRA, J. C. S.**; QUEIROZ, J. V.; PADILHA, P. M. Metalloproteomic Profile of Selenium in Muscle Tissue of Nile Tilapia: Preliminary Results. 2013. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

PEIXOTO, M. R. L. V.; LIMA, P. M.; QUEIROZ, J. V.; MOURAES, P. M.; **VIEIRA, J. C. S.**; CAVECCI, BRUNA; BRAGA, C. P.; PADILHA, P. M. Avaliation of Zinc Concentrations in Protein Spots of Muscle of Nile Tilapia Fed With Zinc Organic. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

QUEIROZ, J. V.; MORAES, P. M.; LIMA, P. M.; BRAGA, C. P.; **VIEIRA, J. C. S.**; PEIXOTO, M. R. L. V.; CAVECCI, B.; PADILHA, P. M. Metalomic Profile of Muscle Samples of Nile Tilapia (Oreochromis niloticus): Preliminary Results. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

QUEIROZ, J. V.; MORAES, P. M.; LIMA, P. M.; BRAGA, C. P.; **VIEIRA, J. C. S.**; CAVECCI, B.; PEIXOTO, M. R. L. V.; PADILHA, P. M. Metalomic Study of Hg in Amazon Fishes. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Trabalho apresentados em congressos

VIEIRA, J. C. S.; CAVECCI, B.; PADILHA, P. M. ESPECIAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO DE PEIXES DA REGIÃO AMAZÔNICA - ABORDAGEM METALOPROTEÔMICA. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

VIEIRA, J. C. S.; CAVECCI, B.; BRAGA, C. P.; QUEIROZ, J. V.; MOURAES, P. M.; PEIXOTO, M. R. L. V.; LIMA, P. M.; PADILHA, P. M. Use of GFAAS for Quantification of Hg in Muscle Samples of Fish in the Amazon Region-Brazil. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; QUEIROZ, J. V.; CAVECCI, B.; PEIXOTO, M. R. L. V.; PADILHA, P. M. Quantification of Mercury by GFAAS in Samples of Liver Tissue in the Region of AHE Jirau-Amazon-Brazil. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Participação em eventos científicos

5º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes. 2013. (Simpósio).

XII Workshop da Pós-Graduação. 2013. (Congresso).

Impactos sócio-Econômico-Ambiental de Pequenas Centrais Hidrelétricas : É Possível Dimensioná-los?. 2013. (Simpósio).

2nd Spring School in Food Quality and Safety. 2012.

Premio

Premiado como melhor POSTER apresentado no XII Workshop da Pós-Graduação UNESP. ESPECIAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO DE PEIXES DA REGIÃO AMAZÔNICA - ABORDAGEM METALOPROTEÔMICA. 2013. (Simpósio).

Disciplinas cursadas

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada – 2 créditos. Conceito A

Estratégias analíticas para estudos metalômicos de amostras biológicas – 5 créditos. Conceito A

Tópicos especiais em Botânica: Food and Plant Sciences Spring School – 2 credits Conceito A

Fundamentos de métodos analíticos aplicados em Análises de Alimentos – 5 credits. Conceito A

Tópicos Especiais: Aplicação de Radiação de Microondas no Preparo de Amostras – 2 créditos.

Conceito A

Expressão Gênica: Mecanismos de Regulação e Métodos de Análises – 4 créditos. Conceito A

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada

Novas Estratégias Imunoterapêuticas Baseadas na Utilização de Células Dendríticas – 1 crédito.

Conceito A

Biossensores: Definição e Aplicações – 4 créditos. Conceito A

Fundamentos sobre Ética e Prática na Experimentação Animal – 3 créditos. Conceito A

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada

Transtornos audiomotores: da pesquisa Básica a clínica – 2 créditos. Conceito A

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada – 2 créditos. Conceito A

Tópicos Especiais em Nutrição e Saúde de Peixes – 2 créditos. Conceito A

A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil

Paula M. Moraes · Felipe A. Santos ·
Cilene C. F. Padilha · José C. S. Vieira · Luiz F. Zara ·
Pedro de M. Padilha

Received: 5 June 2012 / Accepted: 26 August 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract This paper presents preliminary findings for a metallomics study of mercury in the muscle of the fish species from Amazonas, Brazil, after protein separation by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and subsequent evaluation of mercury by synchrotron radiation X-ray fluorescence. The fluorescence spectra revealed mercury in two protein spots. The mercury-containing protein spots showed molecular weights of 20.8 ± 0.7 and 19.8 ± 0.5 kDa and isoelectric points of 5.6 ± 0.2 and 7.5 ± 0.3 , respectively.

Keywords Metallomics study · Mercury in fish · 2D PAGE · SR XRF

Introduction

The environmental mercury contamination that occurred in Amazonia from the 1980s up to the mid-1990s is once more under debate due to the environmental burden left by gold mining and its potential for human contamination. However, recent studies have demonstrated that high concentrations of

mercury from non-anthropogenic sources are also found in abiotic and biotic compartments in various regions of Amazonia. Regardless of the source of contamination, studies aimed at elucidating the mechanisms of mercury toxicity are essential for the socioenvironmental development of this region [1].

The environmental changes resulting from the construction and operation of the Jirau Hydroelectric Power Plant in the Madeira river basin could alter the mercury dynamics in this environmental area. The average total mercury concentrations recorded in the last decade in the Madeira river basin, where the Jirau hydropower project is located, indicate that mercury concentrations have remained within their natural levels in Amazonian rivers. However, it is known that the transformation and remobilisation processes of previously unavailable mercury species can alter their chemical configuration, thereby making them available to the aquatic environment [2].

The identification of biomarkers related to the mapping and expression of metalloproteins associated with mercury could provide early indicators of fish contamination and human exposure resulting from changes in the water quality of reservoirs. Such an effort may protect the riverine population of areas directly and indirectly affected by hydroelectric enterprises in the Amazon region. In this context, metallomics—a recently proposed field of science—brings together analytical and biochemical studies about the fractionation and characterisation of metal-binding proteins. This new field of science has contributed to the elucidation of the physiological and functional aspects of metalloproteins responsible for the transport of metal ions in live organisms [3]. The identification of a biomarker for mercury toxicity through metallomics would likely be based on mercury-transporting metalloproteins whose expression can increase or decrease in response to changes in limnological characteristics and with the availability of mercury

P. M. Moraes · F. A. Santos · C. C. F. Padilha · J. C. S. Vieira ·
P. de M. Padilha (✉)
Instituto de Biociências, UNESP,
Botucatu, SP, Brazil
e-mail: padilha@ibb.unesp.br

L. F. Zara
Campus de Planaltina, Universidade de Brasília – UNB,
Brasília, DF, Brazil

P. de M. Padilha
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica,
UNICAMP,
Campinas, SP, Brazil

Published online: 07 September 2012

Springer



Short communication

GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil



Paula M. Moraes^{a,d}, Felipe A. Santos^{a,d}, Bruna Cavecci^{b,d}, Cilene C.F. Padilha^{a,d}, José C.S. Vieira^{a,d}, Paulo S. Roldan^c, Pedro de M. Padilha^{a,e,*}

^a UNESP – São Paulo State University, Biosciences Institute, Botucatu, SP, Brazil

^b UNESP – São Paulo State University, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, SP, Brazil

^c University of Alagoas - IQB/UFAL, Maceió, AL, Brazil

^d University of Brasília, Faculdade de Planaltina, Distrito Federal, Brazil

^e National Institute of Bioanalytical Sciences and Technology, UNICAMP – Campinas State University, Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2012

Received in revised form 23 April 2013

Accepted 5 May 2013

Available online 17 May 2013

Keywords:

Mercury in fish

GFAAS

Chemical modifier

Permanent modifier

Amazon fish

ABSTRACT

In the present study, a simple, rapid and sensitive method was developed for the determination of mercury concentrations in the muscle tissue of fish from the Brazilian Amazon using graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) following acid mineralization of the samples in an ultrasonic cold water bath. Using copper nitrate as a chemical modifier in solution and sodium tungstate as permanent modifier, we were able to attain thermal stabilization of the mercury up to the atomisation temperature of 1600 °C in the GFAAS assay. The calculated limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.014 and 0.047 mg kg⁻¹, respectively.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chemical and biological pollution in the Madeira river basin is one of the primary social and environmental problems in the Amazon. Mercury contamination, which scarred the Amazon from the 1980s through the mid-1990s, is once again a topic of discussion due to the environmental hazards associated with gold mining activities and the danger of contamination that these activities pose to society. The construction and use of the Jirau hydroelectric plant in the Madeira River basin may, because of environmental changes, modify the chemical species of mercury, resulting in high levels of soluble forms. Mercury species, including methylmercury, are present in aqueous medium, can be absorbed by aquatic biota and accumulate in organisms. As a result, the level of mercury is magnified at high levels of the food chain (Pfeiffer, Lacerda, Salomons, & Malm, 1993).

In the Amazon, fish is the main source of food for coastal communities. Several studies performed over the last two decades indicate high concentrations of mercury in Amazonian fish. In general, all of these studies suggest that bioaccumulation throughout the

food chain is the reason behind the high mercury levels in Amazonian fish. Mercury from natural and/or anthropogenic sources, upon entering aquatic ecosystems, participates in biogeochemical cycles mediated by microorganisms. In these cycles, mercury is chemically transformed, bioaccumulated and biomagnified in the food chain. Thus, predatory fish, including the gilthead bream and peacock bass, accumulate high levels of mercury and can act as a vehicle of this toxin to their consumers, such as reptiles, birds and humans. Thus, the consumption of fish may pose a risk to human health (Bidone, Castilhos, Santos, Souza, & Lacerda, 1997).

The determination of the concentrations of mercury species in biological samples is challenging due to low concentrations of the mercury species, and the evaluation of toxicity is difficult because the toxicity depends on the specific mercury species. Several studies in the literature describe methods for the determination of the concentrations of mercury species using atomic spectrometry techniques. Examples of these techniques include flow injection analysis (FIA), coupled with cold vapour atomic absorption spectrometry (CVAAS) and assisted by sample mineralization in a microwave oven for total mercury determination (Gallignani et al., 1998); solid-phase methylmercury preconcentration and concomitant determination by CVAAS (Mondal & Das, 2003); acid extraction and slurry sampling procedures for the determination

* Corresponding author at: UNESP – São Paulo State University, Biosciences Institute, Botucatu, SP, Brazil.

E-mail address: padilha@ibb.unesp.br (Pedro de M. Padilha).

RESUMO

Neste trabalho de Dissertação, buscou-se avaliar e quantificar o teor de mercúrio presente em amostras de tecido hepático dos peixes jaraqui, tucunaré e filhote da área de influencia da AHE JIRAU - Bacia do rio Madeira, buscando definir um biomarcador proteico (metaloproteínas, metalotioneínas) para monitoramento deste elemento tóxico em peixes da região amazônica. Para realização desta pesquisa, utilizou-se técnicas de proteômica/metalômica: eletroforese bidimensional (2D-PAGE), espectrometria de massas, espectrometria de absorção atômica e bioinformática. Por espectrometria atômica foi possível analisar e quantificar o mercúrio presente nos *spots* proteicos com massa molar menor que 50 kDa, obtidos no fracionamento das proteínas por 2D-PAGE. As caracterizações das proteínas foram feitas por espectrometria de massas (ESI-MS), podendo assim, fazer uma correlação do mercúrio presente nos *spots* com as proteínas caracterizadas. Com esses resultados, podemos definir um perfil de biomarcador proteico para o mercúrio nas amostras estudadas. A seleção de *spots* para esse estudo foi baseada em trabalhos da literatura que afirmam a afinidade do mercúrio por proteínas de baixa massa molar e nas quantificações de mercúrio por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), já que nos *pellets* de massa molares maiores que 50 não foi detectado mercúrio. Nas determinações por GFAAS, somente *spots* proteicos com massa molar menor que 20 kDa apresentaram mercúrio na faixa de concentração de 11,30 a 83,40 mg g⁻¹. Esses *spots* proteicos apresentaram mercúrio nas quantificações por espectrometria de absorção atômica. De um total de 24 *spots* caracterizados, foram identificadas por ESI-MS 13 proteínas que apresentaram características de biomarcadoras deste elemento nas amostras estudadas.

ABSTRACT

In this dissertation work, we sought to evaluate and quantify the amount of mercury present in samples of fish jaraqui, tucunaré and filhote from the influence area of the AHE JIRAU - the Madeira basin, aiming to define a protein biomarker (metalloproteins, metallothionein) for monitoring this toxic metals in the environment. For this research, we used techniques of proteomics: two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE), mass spectrometry, atomic absorption spectrometry and bioinformatics. With the atomic absorption analysis was possible to analyze and quantify the mercury in protein spots obtained from the 2D-PAGE of protein and pellets of greater molar mass and smaller than 50 kDa. The characterization of the proteins were performed by mass spectrometry (ESI-MS), and thus being able to make a correlation between mercury in spots and proteins found in them. With these results, we can define a profile of protein biomarker for mercury in the applied samples. The selection of spots for this study was based on literature reports claiming affinity of mercury for proteins of low molecular weight and the measurements of mercury made by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS), since the pellets with molar mass greater than 50 was not found mercury. Utilizing the GFASS requirements, the spots which their molecular mass were less than 20 kDa contained mercury concentration in the range of 11.30 to 88.40 mg g⁻¹. Presented mercury in spots quantified by the atomic absorption spectrometry method. From 24 ESI-MS characterized spots, were identified 17 proteins, which may be used as biomarkers of this metal in the aquatic environment.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%Vol – volume normalizado de um spot no gel

1D-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em uma dimensão

2D-PAGE – eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

AAS – espectrometria de absorção atômica

ACET – acetileno

AHE – Aproveitamento Hidrelétrico

BG - background

CHAPS - 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato

DTT - 1,4-ditiotreitol

ESI MS MS – espectrometria de massas em sequência com ionização por *electrospray*

FAAS – espectrometria de absorção atômica com atomização por chama

GFAAS – espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

Hg - mercúrio

IEF - Focalização Isoelétrica

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

kV - quilovolt

mA - miliampere

mM - milimolar

MM - Massa Molar

Pd - paládio

pH – potencial hidrogeniônico

pI - Ponto Isoelétrico

ppb – parte por bilhão

rpm – rotação por minuto

SDS – dodecil-sulfato de sódio

spot - Banda 2D de proteínas

TEMED - N,N',N,N'-tetrametiletilenodiamina

V - volt

v – volume

Vh – volt-hora

W – watt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo global do Mercúrio (SOUZA E BARBOSA, 2000).

Figura 2 – Sítios para ligação com metais presentes na metalotioneína. Os círculos denotam íons metálicos divalentes (ex: Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) (VILLAR, 2006).

Figura 3: Diagrama de funcionamento e de componentes de um espectrômetro de massas (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

Figura 4. Ilustração do processo de formação de íons numa fonte de *electrospray* (GROSS, 2011).

Figura 5. Esquema de funcionamento de espectrometria de absorção atômica de chama.

Figura 6. Pontos de coleta na Bacia do rio Madeira.

Figura 7. Esquema geral do experimento.

Figura 8. Gel a 15% (m/v) obtido por 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido hepático de jaraqui. Os números e círculos em azul indicam os *spots* nos quais foram identificadas a presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS/MS.

Figura 9. Gel a 15% (m/v) obtido por 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido hepático de tucunaré. Os números e círculos em azul indicam os *spots* nos quais foram identificadas a presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS/MS.

Figura 10. Gel a 15% (m/v) obtido por 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido hepático de filhote. Os números e círculos em azul indicam os *spots* nos quais foram identificadas a presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS/MS.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programação utilizada na IEF para fitas com gradiente de pH 3-10.

Tabela 2. Programação da 2D-PAGE.

Tabela 3. Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de mercúrio em extratos ácidos obtidos a partir de amostras mineralizadas de *spots* proteicos obtidos de gel de eletroforese 2D-PAGE de tecido hepático de peixes.

Tabela 4. Análise de correlação entre os géis considerando três corridas eletroforéticas no fracionamento das proteínas das amostras de hepático das espécies de peixes estudadas.

Tabela 5. Resultados obtidos na determinação de mercúrio nos *pellets* de maior e menor massa molar (MM), nas amostras de tecido muscular (TM) e hepático (TH).

Tabela 6. Valores obtidos na determinação da concentração de mercúrio por GFAAS nos *spots* proteicos das amostras de tecido hepático de jaraqui, tucunaré e filhote.

Tabela 7. Estimativa do número de átomos de mercúrio por molécula de *spot* proteico das amostras de tecido hepático de jaraqui, tucunaré e filhote.

Tabela 8. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido hepático de Jaraqui.

Tabela 9. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido hepático de Tucunaré.

Tabela 10. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido hepático de Filhote.

Conteúdo

1. INTRODUÇÃO	25
1.1. As represas hidrelétricas	26
1.2. Mercúrio, origem e transformações	29
1.3. Metilação de mercúrio	31
1.4. Meios de contaminação do pescado e ser humano por mercúrio.....	32
1.5. Afinidade de metais por proteínas	33
1.5.1. Metalotioneínas (MTs).....	34
1.5.2. Proteômica	36
1.5.3. Metaloproteômica	37
1.5.4. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	38
1.5.5. Espectrometria de massas	39
1.5.6. Espectrometria de absorção atômica.....	42
2. OBJETIVOS.....	43
2.1. Objetivos gerais	43
2.2. Objetivos específicos	44
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	44
3.1. Equipamentos utilizados durante os experimentos	44
3.2. Reagentes e soluções.....	45
3.3. Trabalho de campo.....	47
3.4. Espécies de peixes em estudo	47
3.5. Coletas e preparo das amostras	49
3.6. Quantificação das proteínas	50
3.7. Separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE).....	50
3.8. Tratamento das imagens	52
3.9. Determinação de mercúrio total.....	52
3.9.1. Preparação da curva analítica.....	53
3.9.2. Procedimentos analíticos	54
3.9.3. Digestão trípica dos <i>spots</i> proteicos para caracterização por ESI MS/MS.....	54
I. Remoção do corante.....	55
II. Redução e alquilação	55
III. Digestão trípica das proteínas.....	56

IV. Eluição dos peptídeos.....	56
3.9.4. Caracterização das proteínas por ESI MS/MS.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. Determinação da concentração e proteína total	57
4.2. Fracionamento das proteínas por 2D-PAGE.....	58
4.3. Avaliação quantitativa de mercúrio	62
4.4. Caracterização dos spots proteicos por ESI MS/MS	66
4.5. - 39S Ribosomal protein L36 mitochondrial	70
4.6. - Parvalbumin	70
4.7. - Ubiquitin -40S ribosomal protein S27a	71
4.8. - GTP Cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein (GCHRF)	71
4.9. - Keratin. type II cytoskeletal 8.....	72
4.9.1. - Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1	72
4.9.2. - Zinc finger and BTB domain containing protein 24.....	73
4.9.3. - Dual specificity protein phosphatase 22-B	73
4.9.4. - N – Terminal Xaa – Pro – Lys N – Methyltransferase 1	74
4.9.5. - Macoilin-2	74
5. CONCLUSÕES.....	75
6. BIBLIOGRAFIA.....	77
7. Apêndices.....	90
Apêndice I.....	90
Apêndice II	92

1. INTRODUÇÃO

O pescado é uma das fontes de proteína mais consumida pela população humana no mundo. Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura, a produção mundial de pescado em 2011 alcançou 126 milhões de toneladas. O Brasil poderá se tornar um dos maiores produtores até 2030, ano em que a produção pesqueira nacional teria condições de atingir 20 milhões de toneladas por ano (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2013).

No peixe, encontramos vários nutrientes dos quais nosso organismo necessita, tais como: ferro, vitamina B12, cálcio, fósforo, iodo, cobalto, fontes de ômega 3, entre outros. Além disso, os pescados são boas fontes de aminoácidos essenciais, que participam da formação de proteínas necessárias para constituir e renovar a musculatura, auxiliando no processo de crescimento; e seu consumo está associado com a prevenção de doenças cardiovasculares e neurológicas. No entanto, nas últimas décadas vem crescendo a preocupação com a contaminação dos pescados por metais tóxicos, especialmente em relação ao mercúrio (Hg) que possui alta toxicidade. Esse elemento tem a capacidade de acumular nos tecidos dos seres que compõem os ecossistemas aquáticos e conseqüentemente em toda a cadeia trófica, aumentando seus níveis nos predadores de topo de cadeia (NEVADO et al., 2010). O mercúrio é um poluente global liberado a partir de duas fontes: naturais (erupções vulcânicas, incêndios florestais, queima de biomassa, volatilização de baixa temperatura e erosões) e antropogênicas (que incluem a combustão de combustíveis fósseis, mineração, resíduos e produção química) (LINDBERG et al., 2007; PIRONE et al., 2010).

O mercúrio é uma neurotoxina potente para os seres humanos, em particular, se o metal estiver na forma metilada. Dependendo da sua concentração nos tecidos dos seres vivos, pode ocorrer desnaturação de proteínas, inativação de enzimas e alteração da atividade celular (JESUS et al., 2008). Um dos primeiros passos em direção a bioacumulação de metilmercúrio em cadeias alimentares aquáticas é a metilação de formas inorgânicas do metal, um processo que é mediado principalmente por bactérias anaeróbicas (HSU-KIM et al., 2013). Sua ampla distribuição nos ecossistemas aquáticos resulta de processos naturais e atividades antrópicas (NEVADO et al., 2010).

Estudos observaram aumento nas concentrações de mercúrio em peixes de reservatórios hidrelétricos (BRABO et al., 1999; NEVADO et al., 2010; AMORIM et al., 2012). Nestes locais, devido ao grande acúmulo de águas e aos alagamentos de regiões muitas vezes contaminadas por

este tóxico, o nível de mercúrio disponível nas águas cresce aderindo-se as partículas em suspensão e muitas vezes sedimentando.

A contaminação por mercúrio tem sido reconhecida como uma questão importante desde o início da década de 1970, e hoje em dia, há uma abundância de evidências de que este metal onipresente é um dos mais tóxicos para os organismos vivos (MELA et al., 2013). Existem várias formas químicas do mercúrio no ambiente natural; sendo que, dentre os compostos de mercúrio, o metilmercúrio (MeHg) é o mais importante em termos de toxicidade e efeitos na saúde (QIU et al., 2009). A principal via de absorção de peixes é dietética (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 1999, 2002; SCUDDER et al., 2009); consequentemente, peixes predadores do topo de cadeia representam ligações importantes entre a contaminação por mercúrio e a saúde humana (LEBEL et al., 1998; ASCHNER 2002). O metilmercúrio afeta principalmente: fígado, mucosa intestinal, rins, músculo, sangue, além do sistema nervoso (BAATRUP, 1991; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 1999, 2002, 2006; MELA et al., 2007, 2010; RABITTO et al., 2011).

Os resultados obtidos neste estudo mostram evidências da interação do mercúrio com proteínas das amostras de tecido hepático dos peixes estudados.

Estudos vêm demonstrando que a construção de grandes reservatórios hidrelétricos (represas), pode disponibilizar espécies mercuriais até então inertes para a cadeia alimentar (HSU-KIM et al., 2013).

1.1. As represas hidrelétricas

As represas desempenham um grande papel econômico e social no mundo. A geração de energia elétrica é indispensável nos dias atuais. Hoje quase metade dos rios do mundo tem uma grande hidrelétrica e a previsão é que aumente a cada ano por causa da grande demanda por eletricidade e por essa fonte ser considerada a mais limpa. Existem aproximadamente 45.000 represas de grande porte em todo o globo terrestre, localizadas principalmente em grandes bacias como a do Amazonas, Congo e Mekong. Só no Brasil existem mais de 500 hidrelétricas representando, em média 24% de todo o potencial hidroenergético do país (COUTO et al., 1996; TUBAKI et al., 2004). Estes reservatórios acumulam grandes volumes de água, inundando áreas imensas de vegetação e com isso acabam disponibilizando mercúrio para o meio. As concentrações de mercúrio em peixes de lagos são elevadas devido ao aumento da ciclagem global de mercúrio. Um caso especial de elevadas concentrações de mercúrio nos peixes ocorre

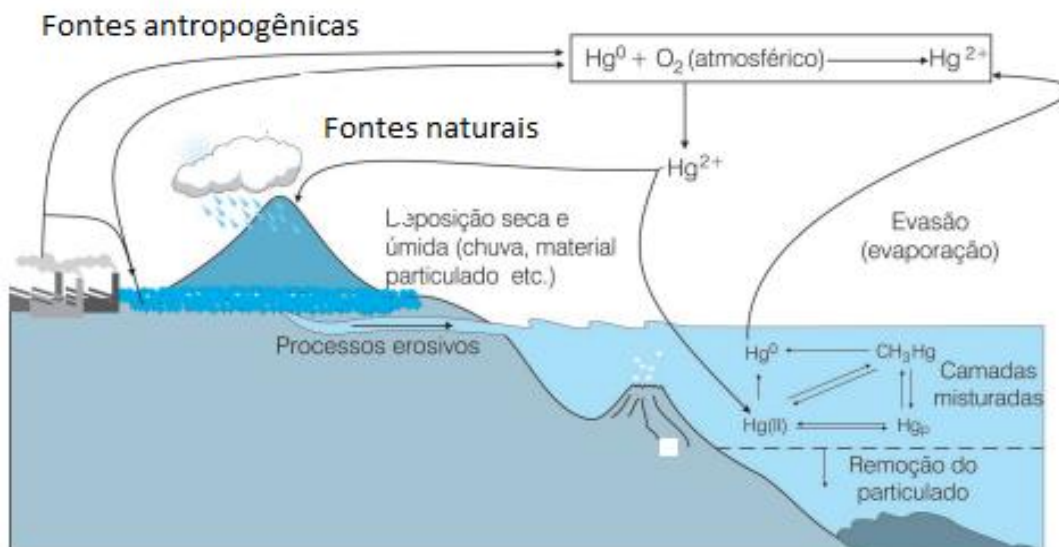
em novos reservatórios hidrelétricos por causa do aumento das taxas de conversão de mercúrio em metilmercúrio. As pessoas e os animais selvagens que comem esses peixes de reservatórios hidrelétricos têm um elevado risco de acumular metilmercúrio em seu organismo (MAILMAN et al., 2006).

No Canadá, já foram estabelecidas estratégias para diminuir o acúmulo de mercúrio/metilmercúrio nos reservatórios hidrelétricos (MAILMAN et al., 2006). As tentativas que estão sendo testadas incluem reduções, tais como: das fontes de mercúrio antes da inundação, da taxa de metilação do mercúrio, da bioacumulação e biomagnificação. As estratégias levantadas englobam selecionar o local para minimizar os impactos, pesca intensiva, adicionar selênio, acrescentar cal para sistemas ácidos, queimar a área antes da inundação, remoção de árvores em pé, acrescentar fósforo, desmetilar o metilmercúrio por luz ultravioleta, limitar a área inundada, especialmente as zonas úmidas, entre outras (MAILMAN et al., 2006). Todavia, não são bem conhecidos os efeitos que estes meios alternativos podem causar aos seres vivos, o que sabemos é que o selênio em quantidades excessivas é tóxico e as queimadas reduzem a produção de metilmercúrio, porém potencializa a bioacumulação nos organismos por motivos ainda desconhecidos. A melhor estratégia será aquela que beneficiará a todos, pelo menos em partes.

Estudos realizados mostraram que as barragens causam impactos sobre a ciclagem de mercúrio, (Figura 1). Esse processo tem recebido atenção considerável por causa de elevadas concentrações de metilmercúrio em peixes e outros organismos em represamentos (MAILMAN et al., 2006). Solos inundados e com matérias orgânicas proporciona o local ideal para metilação, gerando um aumento na concentração de metilmercúrio nos reservatórios de água. As concentrações de metilmercúrio em microrganismos do reservatório podem permanecer elevadas por décadas, gerando um aumento de metilmercúrio na alimentação dos peixes (SCHETAGNE et al., 2000).

Uma das preocupações na criação de represa é o fato de muitas, quando velhas acumularem sedimentos orgânicos e nutrientes, que em longo prazo, pode conter uma pilha de mercúrio nos sedimentos da represa que se tornaria uma preocupação sobre a remoção ou vazamento da barragem (STANLEY et al., 2003; HARRISON et al., 2009).

Figura 1. Ciclo global do Mercúrio. Fonte: Adaptado de SOUZA & BARBOSA, 2000.



O desenvolvimento de complexos hidrelétricos na bacia do rio Madeira tem despertado discussões científicas sobre os possíveis processos de remobilização e biodisponibilidade das espécies de mercúrio em reservatórios da região Amazônica. Estudos em diversos reservatórios brasileiros, tanto no Sudeste como na Amazônia, têm demonstrado que o mercúrio associado ao material particulado em suspensão, sedimentos e plâncton, apresenta-se especialmente em sua forma inorgânica. A forma inorgânica ocorre principalmente no início (montante) dos reservatórios e, a ocorrência de gradiente crescente de importância da forma orgânica, ao longo do tempo, atinge maiores valores nas áreas mais profundas, próximas à barragem. A poluição química e biológica na bacia do rio Madeira configura um dos principais problemas sócio-ambientais da Amazônia, podendo, neste aspecto, ser entendida como uma região que agrega características de um laboratório natural, cujo estudo poderá ser referência para toda a região. A contaminação pelo mercúrio, que marcou a Amazônia na década de 80 até meados de 90, volta a ser cenário de discussão devido aos passivos ambientais deixados pela atividade de garimpagem de ouro e pelo potencial de contaminação que estes passivos representam para a sociedade (COUTO et al., 1996; TUBAKI et al., 2004).

Na Amazônia os altos teores de mercúrio encontrados em solo, sedimentos, peixes e humanos, inicialmente foram atribuídos à atividade de garimpos de ouro, entretanto, estudos recentes mostraram que as altas concentrações de mercúrio nos compartimentos abióticos e bióticos são também encontradas em regiões sem fontes antrópicas. O fato é que, independentemente da fonte de contaminação, estudos relacionados à elucidação dos

mecanismos de toxicidade do mercúrio são de fundamental importância para o desenvolvimento sócio-ambiental da região amazônica (FADINI et al., 2001).

Considerando o exposto, o desenvolvimento de biomarcadores relacionados ao mapeamento e expressões de metaloproteínas associadas ao mercúrio poderá indicar previamente possíveis riscos de contaminação do pescado e a exposição humana devido a alterações da qualidade da água em reservatórios, resguardando a população ribeirinha das áreas de influência direta e indireta dos empreendimentos hidrelétricos na região Amazônica. Nesse contexto, a metalômica – área científica proposta recentemente – integra estudos analíticos e bioquímicos, contemplando fracionamento e caracterização de proteínas associadas com metais. Esta nova área do conhecimento científico tem contribuído no esclarecimento dos aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas responsáveis pelo transporte de íons metálicos nos organismos vivos (HARAGUCHI et al., 2004; GARCIA et al., 2006). A elucidação de um biomarcador de toxicidade do mercúrio utilizando a metalômica está associada às metaloproteínas associadas com mercúrio que possam apresentar aumento ou diminuição de expressão, frente às alterações das características limnológicas e disponibilidades das espécies de mercúrio no ambiente, fornecendo assim, informações em relação ao transporte de mercúrio na biota e nos seres humanos.

1.2. Mercúrio, origem e transformações

O mercúrio é um elemento natural comum no ambiente, liberado por erupções vulcânicas, degaseificação da crosta terrestre, evaporações de águas, queima de carvão, incineradores e combustíveis fósseis. Mas também é liberado em grande quantidade por atividades humanas como os fungicidas na agricultura, setores da indústria de produção de soda e cloro, lâmpadas fluorescentes, produtos farmacêuticos e odontológicos e na amalgamação de ouro e prata (HSU-KIM et al., 2013).

Formas inorgânicas de mercúrio são transportadas por longas distâncias na atmosfera e depositadas na paisagem onde podem ser levadas pelas chuvas até lagos, rios, riachos e reservatórios.

O mercúrio é um dos poluentes ambientais mais perigosos com um grande número de formas físicas e químicas (NEVADO et al., 2010). Embora todas as formas de mercúrio sejam tóxicas, compostos alquimercuriais são de maior preocupação por causa de sua fácil penetração através das membranas biológicas, eficiente bioacumulação, alta volatilidade e longo prazo para

ser eliminado dos tecidos (MOORE & RAMAMOORTHY, 1984; CRESPO-LÓPEZ et al., 2005; CLARKSON & MAGOS, 2006).

O mercúrio na sua forma líquida é pouco absorvido pelo trato gastrointestinal não sendo considerado de grande risco para os seres vivos. Por outro lado, seus vapores quando inalados, penetram facilmente nas membranas alveolares atingindo a circulação sanguínea. Ao alcançar o sangue, fígado e rins, ele é oxidado a formas divalentes (Hg iônico) pelo complexo hidrogênio peróxido catalase passando a representar uma das maiores fontes de intoxicação verificada em laboratórios industriais e de pesquisa. O mesmo ocorre com pacientes que possuem obturações dentárias a base de amalgamação manipulada por dentistas mal orientados que usam essas amalgamas de mercúrio sem segurança (NEVADO et al., 2010).

Estudos relatam que a exposição acima de 2 mg/m² de vapor de Hg elementar por algumas horas, causa bronquite química aguda e pneumonite. Após duas horas de exposição observa-se danos aos pulmões com formação de uma membrana hialina e fibrose pulmonar (FARO, 2000).

Dentre os compostos de mercúrio orgânico, o metilmercúrio é o mais tóxico, bem mais que a forma metálica, e é responsável pelos danos mais importantes à saúde observados em humanos. Isto se deve, provavelmente, à sua lenta eliminação. No cérebro e rins, esta eliminação leva um tempo considerável (até mesmo alguns anos). O sistema nervoso central é o alvo principal do metilmercúrio, onde afeta, principalmente, áreas específicas do cérebro, como cerebelo e lobos temporais. A intoxicação por metilmercúrio se caracteriza por ataxia (perda da coordenação dos movimentos voluntários), a disartria (problemas nas articulações das palavras), a parestesia (perda da sensibilidade nas extremidades das mãos e pés e em torno da boca), visão de túnel (constricção do campo visual), perda da audição, disfunções imunológicas, além de atravessar a placenta, transferindo-se para o feto. Os primeiros sintomas da intoxicação afetam geralmente a região perianal e aparecem alguns dias após a exposição. Uma contaminação severa pode causar cegueira, coma e morte. O período médio de latência varia frequentemente, de 16 a 38 dias (BAKIR et al., 1973; POLLARD et al., 1997).

Diferente do metilmercúrio, o mercúrio inorgânico tem menor capacidade de atravessar a barreira placentária, ficando em maior concentração no líquido amniótico, mas tem grande capacidade de transporte no leite materno causando grandes danos ao feto, principalmente no seu sistema neurológico (SHENKER et al., 2000). Estudos feitos com linhagens de células na presença de mercúrio também demonstraram mutações cromossômicas e/ou gênicas (NEVADO et al., 2010).

A poluição aquática por metais tóxicos tem sido considerada uma das mais perigosas formas de poluição ambiental, pois esses metais não são degradáveis e acumulam em organismos vivos podendo levar da intoxicação até a dizimação da biota. Muitos estudos já foram feitos a respeito de como ocorre a metilação do mercúrio em meios aquáticos, entretanto, ainda não são totalmente conhecidos todos os caminhos de transformação do mercúrio em metilmercúrio. Na sua forma gasosa elementar (Hg^0), o mercúrio é capaz de atingir distâncias globais. No ambiente aquático, a principal forma de mercúrio é Hg inorgânico (II) onde as reações redox nas águas superficiais podem resultar nas perdas de mercúrio gasoso elementar para a atmosfera. O metilmercúrio é uma porção pequena do total de mercúrio em água e sedimentos, entretanto, é a mais tóxica para os organismos podendo alcançar 90% do total de mercúrio bioacumulado em peixes, 10 vezes mais que seu total na água, levando a um sério risco a saúde humana (NEVADO et al., 2010).

1.3. Metilação de mercúrio

Pesquisas vêm demonstrando varias formas do processo de ocorrência da metilação do mercúrio (HSU-KIM et al., 2013). Em concentrações baixas de oxigênio, esse processo de produção e degradação é predominantemente microbiano. Processos abióticos para formação de metilmercúrio também podem ocorrer, particularmente através de vias que envolvem a luz solar (SICILIANO et al., 2005; JAMES, 1993). Acredita-se que a degradação solar seja a principal via para a decomposição do metilmercúrio na superfície da coluna de água (HAMMERSCHMIDT et al., 2006 e 2010). Contudo, em água doce e nas zonas aquáticas costeiras, microrganismos anaeróbicos prosperando em zonas anóxicas (como sedimentos bentônicos, solo saturado, coluna de água estratificada, perifiton e biofilmes) são os produtores dominantes de metilmercúrio. Porém, uma parte significativa é produzida por uma variedade de microrganismos, destacando principalmente as bactérias redutoras de sulfeto (SBR) (HSU-KIM et al., 2013; LIN et al., 2012).

O mercúrio associado ao material particulado em suspensão tende a sedimentar, enquanto o mercúrio dissolvido encontra-se mais biodisponível e pode ser incorporado pela biota (ROULET et al., 1998; HYLANDER et al., 2000). O processo de metilação do mercúrio, que aumenta significativamente sua biodisponibilidade e acumulação ao longo da cadeia alimentar, é favorecido em ambientes aquáticos anóxicos ou subóxicos, levemente ácidos, com concentrações elevadas de matéria orgânica dissolvida e atividade microbiológica intensa. Em áreas de

remanso, lagos marginais, de inundação e em reservatórios artificiais, essas características biogeoquímicas estão mais propensas a ocorrer (TUOMOLA et al., 2008).

Estima-se que nos garimpos da região amazônica brasileira, desde a década de 50 até a década de 90 foram despejadas aproximadamente 200 toneladas de mercúrio, já que a proporção é mais de um kg de mercúrio para cada kg de ouro extraído (BRABO et al., 1999). A bacia do rio Madeira foi uma das mais prejudicada pelas grandes quantidades de mercúrio lançados pelas minas de ouro, contaminando rios, lagos, sedimentos, plantas, animais e seres humanos.

1.4. Meios de contaminação do pescado e ser humano por mercúrio

Acredita-se que o mercúrio inorgânico (II) possa ser transportado para dentro dos microrganismos gram-negativos, através das membranas biológicas, onde ocorre a metilação, e o transporte pode ser mediado por proteínas e vias que estão sendo estudadas, entre elas estão: as proteínas de transporte das quais fazem parte a merc, Merp e MERT, por via Acetil-CoA (HSU-KIM et al. 2013).

Estudos realizados por Moraes et al. (2013) demonstraram que em peixes carnívoros, o nível de mercúrio é bem superior aos níveis encontrados nos não carnívoros, indicando que os consumidores desses peixes contaminados acabam bioacumulando o mercúrio em seu organismo. Muitos pescados já são encontrados com níveis de mercúrio nos seus tecidos igual ou superior ($0,5\mu\text{g g}^{-1}$, peso úmido ou 500 ng g^{-1}) aos recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1991; WHO, 1990).

Além da contaminação do ser humano por metilmercúrio através da ingestão de pescado o mercúrio na sua forma elementar também contamina as pessoas que o manuseiam. Seus vapores são aspirados e quando alcançam os pulmões, atravessam as membranas alveolares alcançando a corrente sanguínea. Os compostos solúveis do mercúrio são absorvidos pelas mucosas, os vapores por via inalatórias e os insolúveis pela pele e pelas glândulas sebáceas. Uma vez no sangue, ele se fixa às proteínas (principalmente albumina) e aos glóbulos vermelhos, sendo daí distribuído para vários sistemas orgânicos. O mercúrio pode transpor a barreira placentária e atingir o feto causando grandes danos à saúde, inclusive ao sistema nervoso (SHENKER et al., 2000).

O mercúrio e seus compostos também provocam efeitos a nível celular. Linfócitos e linhagens linfoblásticas celulares humanas, tratados tanto com mercúrio orgânico e inorgânico, apresentaram um decréscimo significativo em termos de capacidade proliferativa, produção de

citocinas e secreção de imunoglobulinas e decréscimo significativo nos níveis de CD4, e principalmente em linfócitos CD8. A redução de função das células linfóides é resultado da citotoxicidade induzida pelo mercúrio. Também foi observado alteração da mitocôndria e indução de apoptose em células-T (GUO et al., 1998), além de mutações a nível cromossômico e gênico sendo estas responsáveis pelo surgimento de cânceres e doenças hereditárias (Queiroz et al., 1999).

1.5. Afinidade de metais por proteínas

Os íons metálicos constituem uma pequena porção (4%) do tecido corporal dos seres vivos, entretanto, possuem um papel muito importante como componente estrutural e em muitos processos vitais. Como elementos estruturais, destacamos o papel de integrantes de compostos do corpo, tais como ferro na hemoglobina, iodo na tiroxina, o cobalto na vitamina B₁₂ e o enxofre na tiamina e na biotina. Eles atuam na estabilização dessas biomoléculas através da proteção de cargas negativas. Existem funções nas quais o balanço de íons é importante, por exemplo, na formação dos ossos (quantidade e a relação entre cálcio e fósforo); atividade muscular (relação entre cálcio e potássio no fluido extracelular). No aspecto funcional, podemos destacar seu papel catalisador nos sistemas enzimáticos – por meio da ligação desses íons a substratos orientando assim a reação, e a mediação nas reações de óxido-redução – através de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico (ROMANOWSKI et al., 2001).

Os íons metálicos ligados às proteínas e metaloproteínas representam uma grande porção do número total de proteínas. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas requerem a presença de um íon metálico para realizar atividade biológica. Esses íons são responsáveis por muitos processos metabólicos, como conversão de energia na fotossíntese e respiração, expressão e regulação gênica (VALLEE, 1979).

As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas de metal ligante (do inglês metal-binding). A primeira caracteriza-se pela alta afinidade da interação metal-proteína, enquanto que na segunda a interação metal-proteína é de baixa afinidade, com isso essa ligação é facilmente quebrada. Fracamente ligados às proteínas estão os íons monovalentes como o sódio e o potássio. De intensidade moderada temos o magnésio e o cálcio. Dentre os metais que apresentam forte ligação às proteínas, mais frequentemente estão os metais de transição, tais como o ferro, o cobre, o zinco, o manganês, o molibdênio e o cobalto. Estes, devido às suas propriedades (densidade, pequeno raio atômico e interação via eletromagnética e forças

eletrostáticas) estão ligados à maioria das metaloproteínas. Outro grupo de metaloproteínas, as chamadas metalotioneínas (MTs) – classificadas segundo sua massa molar – apresentam alta afinidade não só com íons metálicos essenciais, como o cobre e o zinco, mas também com os metais potencialmente tóxicos, como o cádmio e o mercúrio. Estas metalotioneínas estão presentes em vertebrados, plantas, fungos, algas e até em bactérias metal-resistentes (KAGI & SCHAFFER, 1988).

1.5.1. Metalotioneínas (MTs)

As metalotioneínas são encontradas em todos os filos animais, algumas plantas, fungos e cianobactérias. Constituem uma classe de proteínas citosólicas de baixo peso molecular (entre 6 e 10 kDa), sua estrutura molecular é composta de uma única cadeia de aminoácidos (cerca de 60 aminoácidos) dos quais aproximadamente 30% são cisteínas (que contem grupos sulfidríla - SH) que são sítios para ligações com metais. As metalotioneínas não possuem aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos. Sua estrutura é composta por dois domínios que consistem, em geral, de um 'cluster' (Figura 2) com três sítios e outro com quatro sítios nos quais átomos de metais podem se ligar (NORDBERG, 1998). A abundância de ligantes 'tiol' dos resíduos de cisteína presentes na estrutura da MT confere a esta proteína uma alta afinidade por íons metálicos, tanto essenciais como Cu^{2+} , Zn^{2+} , etc. como não essenciais, Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , etc., e apresenta a seguinte ordem de afinidade por cátions metálicos $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (VIARENGO, 1999). Essa característica particular que faz das MTs proteínas de grande interesse sob o ponto de vista bioquímico, mais especificamente relacionado com a detoxificação de metais (CHANG, et al, 2006). A presença de metais traços ou mesmo essenciais em grandes quantidades faz com que aumente a taxa de síntese das MTs, estas capazes de proteger a estrutura celular de interações não específicas com os metais traços ou promover a detoxificação causadas por metais essenciais em excesso no interior da célula (HAMER, 1986; VIARENGO & CANESI, 1991; ROESIJADI, 1992; VIARENGO & NOTT, 1993; TESSIER et al., 1996).

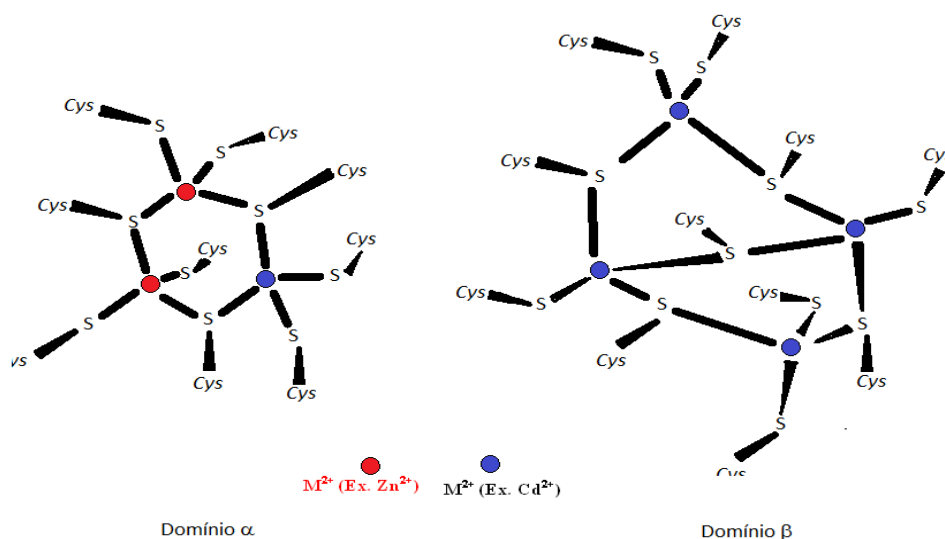
Por ter a quantidade aumentada quando expostas a metais, as MTs são consideradas importantes e biomarcadores específicos, detectando a resposta do organismo frente a poluentes inorgânicos presentes no ambiente. Quando os metais tóxicos entram nas células, ocorre uma competição entre eles e os metais essenciais por ligantes como as metaloproteínas e metalotioneínas, essas últimas, por sua vez atuam na detoxificação do organismo. Em mamíferos e peixes, ha relatos de indução de síntese de MTs tanto por agentes endógenos ou exógenos

(KAGI, 1993), ou quando o organismo é submetido a condições de stress como calor, frio e atividades físicas intensas (VIARENGO et al., 1999). A síntese ocorre principalmente no fígado e rim. Além da detoxificação, as MTs também atuam no combate a radicais livres que são moléculas que tem um número ímpar de elétrons em seu ultimo nível energético tornando-os muito reativos. Os radicais reagem com gorduras, proteínas e DNA para captação de elétrons, causando lesões tanto nas células como nos genes e pode favorecer a manifestação de doenças relacionadas ao envelhecimento (MELENDEZ et al., 2012; LEMOS et al., 2010).

Foi demonstrado em estudo *in vitro* que a afinidade das metaloproteínas por metais seguem a seguinte ordem; $Hg^{2+} > Cu^{2+}$, $Bi^{3+} >> Cd^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+}$. Isso mostra que o Zn é facilmente substituído pelos outros metais mais tóxicos (VIARENGO, 1991, 1999, KAGY, 1993).

Para estudar essas MTs, atualmente existem várias ferramentas de suporte, entre elas estão à eletroforese, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS) e a espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (ESI-MS). A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) é muito usada por permitir uma ótima separação das proteínas e peptídeos para mapeamento das espécies metálicas nos *spots* proteicos por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e/ou espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) e caracterização das proteínas por ESI-MS (LIMA et al., 2010; NEVES et al., 2012).

Figura 2 – Sítios para ligação com metais presentes na metalotioneína. Os círculos denotam íons metálicos divalentes (ex: Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}). Fonte VILLAR, 2006.



1.5.2. Proteômica

O termo proteoma foi inicialmente usado por *Wilkins* e *Williams* em 1993, para descrever o complemento proteico total do genoma (BELIZARIO et al., 2000). Refere-se às proteínas expressas por um genoma em um dado momento. Enquanto o genoma proporciona somente informação estática, o proteoma fornece uma visão geral da máquina da célula (MANSO et al., 2005).

O principal objetivo da ciência do proteoma é fazer uma análise abrangente e em alta escala das proteínas, a proteômica. Com área de atuação ampla, a proteômica abrange identificação e quantificação de proteínas nas células, tecidos, fluidos biológicos, análises de mudança de expressão normal das proteínas verso a expressão em células doentes, caracterização de modificações pós-traducionais, estudo de interação entre proteínas, entre outras funções (BERANOVA-GIORGIANNI, 2003).

Com cerca de trinta anos de existência, essa nova linha de pesquisa, a proteômica, só veio ganhar forças em meados da década de 1990 com o desenvolvimento de três novas áreas: a eletroforese bidimensional (2D-PAGE); a espectrometria de massas para a análise de proteínas separadas por 2D-PAGE com alta precisão; e as grandes descobertas do genoma que foram catalogadas e disponibilizadas em bancos de dados. Esses três avanços foram o ponto de partida da proteômica (MANSO et al., 2005).

Com a descoberta e codificação do genoma humano (conjunto de todos os genes) os pesquisadores passaram a olhar com outros olhos o sequenciamento das proteínas que atuam no organismo, já que estas controlam as funções do organismo (ESCOBAR & MIRANDA, 2001). Codificando essas proteínas, será possível a produção de novos fármacos para controle ou até mesmo a cura de várias doenças humanas (KAZMI & KRULL, 2001).

O proteoma de um ser não é estático, podem ocorrer mudanças com o desenvolvimento do organismo ou com mudanças no seu ambiente. O proteoma é mais complexo que o genoma, não apenas devido ao número de proteínas, mas, também, devido às inúmeras possibilidades de interações entre elas e a estrutura tridimensional que a mesma possui indo interferir decisivamente no papel que ela realiza (KAZMI & KRULL, 2001; LANÇAS, 2003). Por esses motivos, há grande interesse em estudar e entender esses processos, pois descobrindo a função que cada proteína desenvolve dentro do organismo, as mudanças que elas podem sofrer ou as interações que podem realizar na presença de elementos químicos essenciais ou não, como

elementos potencialmente tóxicos, podem traçar metas para minimizar, evitar ou até mesmo a cura de casos sem solução até então.

1.5.3. Metaloproteômica

A metaloproteômica é um campo novo comparado a genômica e proteômica. Sua área de estudo gira em torno das espécies metálicas ou metaloides dentro de uma célula, tecido ou fluido biológico, focada na exploração da função dos metais associados às proteínas, concentrações de espécies metálicas individuais presentes e estrutura da biomolécula (LOBINSKI et al., 2006; MOUNICOU et al., 2009; GÓMEZ-ARIZ et al., 2004; SZPUNAR, 2005).

A descoberta das funções dos metais nos organismos tem proporcionado vários benefícios para a ciência. Principalmente os estudos das interações dos metais com as proteínas que vem cada vez mais tentando explicar as funções dos íons dentro do organismo, o papel biológico deles quando ligados a proteínas, as ativações ou inativações de enzimas entre outros, devido sua presença ou não. Alguns elementos-traços são conhecidos por serem essenciais como: Fe, Cu, Co, Mo, Zn, ou benéficos como: V, Cr, Ni, Se, B, ou por apresentarem toxicidade ao organismo, como: Hg, Cd e Pb (LOBINSKI et al., 2006).

A metalômica é um campo da pesquisa que se define pela interação do genoma, proteoma e distribuição dos metais e metaloides existentes entre as diferentes espécies e compartimentos celulares. Essa distribuição refere-se à totalidade de espécies metálicas individuais em uma célula, englobando os elementos inorgânicos (livres e complexados) e o conjunto de seus complexos com biomoléculas, especialmente com proteínas, que é o metaloproteoma (SZPUNAR, 2008).

O estudo da metalômica nos organismos vivos poderá fornecer informações valiosas sobre como um íon metálico está distribuído e coordenado às proteínas; sua essencialidade e/ou toxicidade; como também, a concentração individual da espécie metálica; contribuindo assim no melhor entendimento dos aspectos fisiológicos e funcionais dessas biomoléculas (HARAGUCHI, 2004; GARCIA et al., 2006).

As técnicas mais empregadas na metalômica na etapa de fracionamento/purificação das biomoléculas são: a eletroforese em gel de poliacrilamida em uma ou duas dimensões (PAGE, 2D-PAGE) e a cromatografia líquida (LC) multidimensionais; e na etapa de determinação quantitativa/qualitativa são utilizadas técnicas de sensibilidade compatível como a fluorescência

de raios-X com radiação síncrotron (SR-XRF), a espectrometria de absorção atômica em chama ou em forno de grafite (FAAS/GFAAS) e a espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP MS). Para caracterizar as biomoléculas (metaloproteínas e/ou proteínas metal ligante) as técnicas mais utilizadas são a espectrometria de massas por tempo de voo acoplada à ionização dessortiva de matriz assistida por laser (MALDI-TOF MS) (HARAGUCHI, 2004; GARCIA et al., 2006; MOUNICOU et al., 2009; RICHARDSON 1998) e a espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (ESI-MS) (LIMA et al., 2010; NEVES et al., 2012).

1.5.4. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

Aproximadamente 60 anos o mundo científico ficou conhecendo a molécula de DNA com sua sequência de peptídeos, mas isso não era o suficiente para resolver todos os questionamentos da ciência. Foi apenas o início de uma das várias linhas de pesquisa que veio a surgir mais tarde. Com os estudos, surgiu a necessidade de conhecer a função dessa molécula, o que era produzido por ela, e qual seria o papel desses compostos dentro do organismo dos seres vivos. Para que esses estudos fossem realizados, foram desenvolvidas técnicas especiais para separação e identificação desses compostos (proteínas). Entre essas descobertas se destaca a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) por apresentar ótima separação das proteínas, possibilitando análise com segurança e precisão dos *spots* revelados, além de permitir a resolução simultânea de centenas de proteínas. Isso só é possível pelo fato desse processo ser baseado em duas etapas diferentes: primeira e segunda dimensão, levando em consideração características independentes das proteínas – ponto isoelétrico e massa molar – para se obter uma separação eficiente (BERANOVA-GIORGIANNI, 2003; O'DONNELLA et al., 2004).

A primeira dimensão consiste na focalização isoelétrica (IEF) onde as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico em fitas com gel impregnado e gradiente de pH. O gradiente de pH, o tamanho e largura das fitas podem variar. A faixa ampla de pH proporciona uma visão geral das proteínas, entretanto, para obtenção de áreas mais específicas ou de maior interesse são empregadas faixas de pH que melhor reproduz essas proteínas, (3-10, 4-7 ou 6-11) (BERANOVA-GIORGIANNI, 2003; ONG & PANDLEY, 2001).

Na segunda dimensão (2D-PAGE), as proteínas são separadas com base na sua massa molar em um gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio. Cada proteína migra até

determinado ponto do gel com a aplicação de uma corrente elétrica. Depois de corado, esses pontos (*spots*) podem ser visualizados no gel. Cada *spot* desses corresponde uma ou mais proteínas com massa molar e pontos isoelétricos diferentes (LABORATÓRIO DE PROTEÔMICA – UNIFESP, 2012; GÖRG et al., 2004). Entretanto, para a etapa de 2D-PAGE ter melhor qualidade é necessário alguns tratamentos das proteínas da amostra antes da corrida como: desnaturação, desagregação, redução e solubilização para promover a ruptura das interações moleculares e garantir que cada *spot* represente um polipeptídeo individual (POZZI, 2013). O procedimento correto vai depender de cada amostra, já foram publicados vários protocolos de eletroforese bidimensional, entretanto, não se pode aplicá-los universalmente. A cada amostra diferente, devemos ajustá-los para melhores separações dos *spots* proteicos nos géis. Essa técnica ainda é a mais popularmente usada na separação de proteínas por apresentar boa resolução e ser de mais fácil acesso.

1.5.5. Espectrometria de massas

Ferramenta analítica indispensável nas ciências farmacêuticas, medicina, química, bioquímica, proteômica e etc., a espectrometria de massas tem um longo histórico desde a sua criação até os dias de hoje. Os princípios de sua invenção começaram por volta de 1910 quando J. J. Thomson separou os átomos e moléculas de um gás, de acordo com suas massas. Em 1919, Francis William Aston aperfeiçoou o aparelho de Thomson e produziu um novo tipo de aparelho de raios positivos. Esse tinha maior resolução, separava melhor os íons de diferentes massas, cada uma, correspondendo a um número definido de íons, com mesma razão carga/massa, e por mostrar um espectro de linhas foi chamado de **espectrógrafo de massas**. Esse aparelho destinava-se a determinações de massas atômicas. Nessa mesma época, Dempster criou um aparelho mais simples para medir isótopos que foi chamado de espectrômetro de massas (Mass Spectrometer-MS).

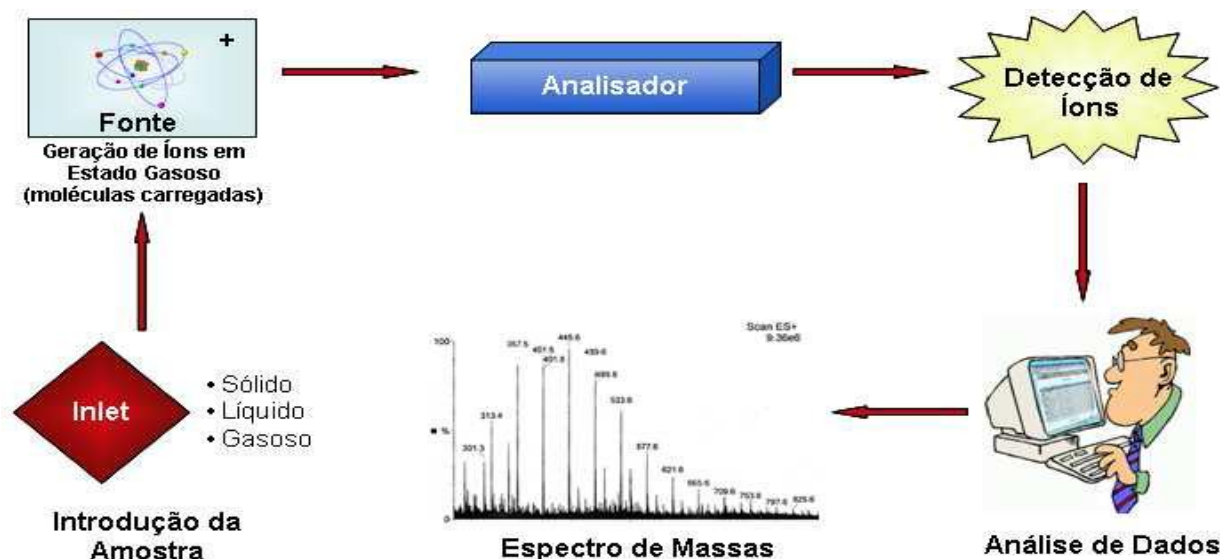
A espectrometria de massas baseia-se na separação de íons, positivos ou negativos, produzidos a partir de átomos ou moléculas, simples ou complexas, de acordo com a razão massa/carga (m/z). Essa técnica (Mass Spectrometry) é uma poderosa ferramenta que foi usada, inicialmente na determinação de massas atômicas e, atualmente vem sendo empregada para determinar estrutura de compostos orgânicos, análise de misturas orgânicas complexas, análise elementar e determinação da composição isotópica dos elementos. Entretanto, a espectrometria de massas só começou a ser aplicada em determinações de massas moleculares de proteínas na década

de 1980 com o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais especializados, tornando-se uma ferramenta revolucionária na química de proteínas moderna (UNIPROTE-MS, 2013).

As proteínas fracionadas por 2D-PAGE podem ser identificadas com base em características únicas que são medidas por um espectrômetro de massas. A elucidação da estrutura de substâncias desconhecidas, a análise de analitos forenses e ambientais, o controle de qualidade de remédios, alimentos e polímeros: todos dependem fortemente da espectrometria de massas (GROSS, 2011).

Um espectrômetro de massas é formado por três sistemas básicos: uma fonte de ionização, um analisador de massas e um sistema de detecção (Figura 3).

Figura 3: Diagrama de funcionamento e de componentes de um espectrômetro de massas. Fonte: APPLIED BIOSYSTEMS, 2005.

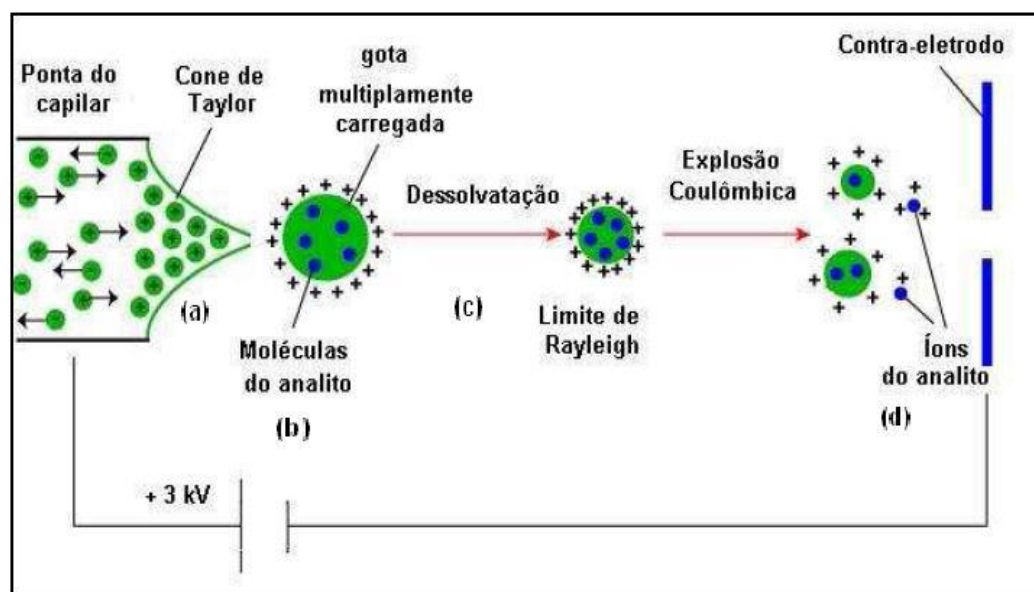


Na fonte de ionização, as amostras são ionizadas antes da análise. Existem técnicas que são muito energéticas e outras que são mais brandas. Entre essas mais brandas estão a Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI) e Ionização por *Electrospray* (ESI), possibilitaram a expansão da espectrometria de massas para os campos de biologia e ciências biomédicas, e atualmente são os métodos mais empregados (HOFFMAN & STROOBANT, 2007; GROSS, 2011). O termo “ionização branda” significa que os íons formados possuem baixa energia interna, o que permite a observação de espécies iônicas moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação.

A MALDI-TOF MS (espectrometria de massas por tempo de voo acoplada à ionização dessortiva de matriz assistida por laser) é empregada na obtenção da “impressão digital”

(*fingerprint*) de peptídeos e proteínas. Já a ESI-MS MS (espectrometria de massas com ionização por *electrospray*), geralmente hifenada à separação por HPLC, é utilizada na elucidação da sequência peptídica e identificação da proteína correspondente (NEWMAN, 2001). ESI é uma técnica relativamente simples e branda que realiza a transferência de íons da solução para a fase gasosa. Esta técnica é eficaz na análise de moléculas grandes não voláteis e que podem adquirir cargas (proteínas e ácidos nucleicos). A produção de íons requer, essencialmente, dois passos: dispersão de gotas altamente carregadas, quase à pressão atmosférica, seguida por condições que permitam a evaporação da gota. As pequenas gotas são geradas por um *spray* eletrolítico e os íons são liberados. Para que esse processo ocorra é necessária uma alta tensão (1,0 a 7,0 kV) em contato com a solução eletrolítica. Essa solução é composta de um solvente volátil contendo o analito iônico em concentrações baixas, aproximadamente 10^{-6} a 10^{-4} mol/L. A transferência de íons da fase condensada até a fase gasosa começa a pressão atmosférica e gradualmente prossegue para o alto vácuo do analisador de massas (GROSS, 2011). Como esta técnica ioniza moléculas diretamente da solução, é facilmente acoplável a técnicas de cromatografia líquida como HPLC, UHPLC e eletroforese capilar (KLITZKE, 2012; GUERRERA & KLEINER, 2005; POZZI, 2013).

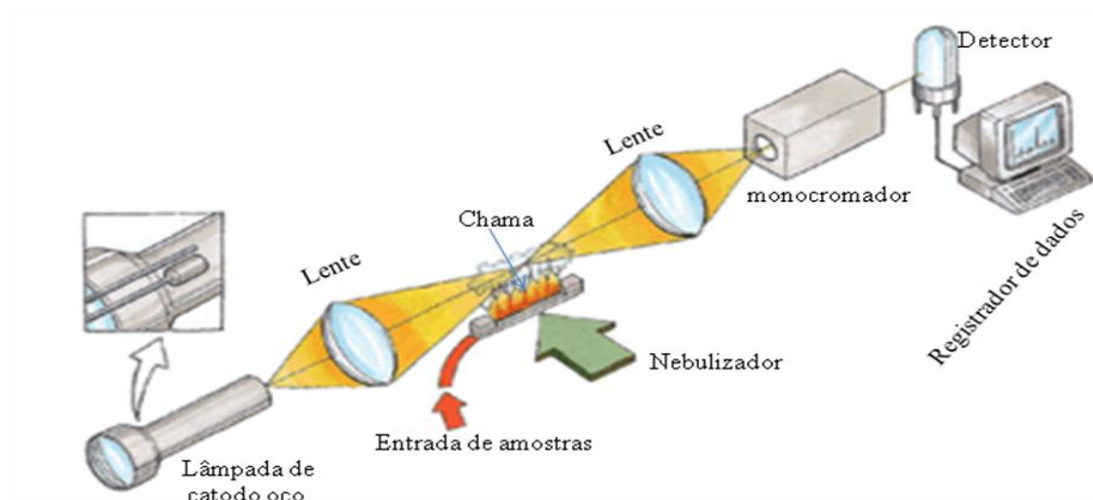
Figura 4. Ilustração do processo de formação de íons numa fonte de *electrospray*. Fonte: GROSS, 2011.



1.5.6. Espectrometria de absorção atômica

Espectrometria de absorção atômica, também chamada de espectrofotometria de absorção atômica é uma técnica analítica usada para quantificar/qualificar metais presentes em uma solução (embora possa ser utilizado amostras sólidas), na qual átomos gasosos livres absorvem radiação eletromagnética em um comprimento de onda específico, produzindo um sinal correspondente e proporcional à concentração dos átomos livres presentes no caminho óptico (IVANOVA, 2005). Os átomos são excitados por uma fonte de energia e seus elétrons sofrem um salto quântico, essa energia é liberada para o meio e o elétron volta a seu estado fundamental novamente. Essa energia liberada é captada pelo aparelho para leitura. A fonte de chama pode ser formada por uma mistura de ar comprimido e acetileno ou óxido nitroso (espectrometria de absorção atômica de chama) (figura 5).

Figura 5: Esquema de funcionamento de espectrometria de absorção atômica de chama. Fonte: Adaptado de APPLIED BIOSYSTEMS, 2005.



O instrumento de espectrometria de absorção atômica consiste de cinco componentes básicos:

- 1 - A fonte de luz, que emite o espectro do elemento de interesse,
- 2 - A "célula de absorção", na qual os átomos da amostra são produzidos,
- 3 - O monocromador, para a dispersão da luz e seleção do comprimento de onda a ser utilizado,
- 4 - O detector, que mede a intensidade de luz, transforma este sinal luminoso em um sinal elétrico e o amplifica.

5 - Um display (ou registrador) que registra e mostra a leitura depois do sinal ser processado. (MARSHAL, 1997; SKOOG & NIEMAN, 1998).

Existem basicamente quatro tipos de absorção atômica:

1 - Espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS). A amostra em solução é aspirada, misturada com um fluxo de ar comprimido e acetileno ou óxido nitroso, nebulizada por um nebulizador, levada a chama, atomizada e medida a intensidade da radiação emitida pelos átomos excitados gerando resultados (MARSHAL, 1997; SKOOG & NIEMAN, 1998).

2 - Espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos: Os íons metálicos e/ou metalóides são convertidos ao hidreto metálico correspondente mediante, geralmente, reação com borohidreto. Este método é mais utilizado para determinar elementos de difícil determinação por chama como: arsênio, antimônio e selênio, devido, à dificuldade de redução dos hidretos destes elementos ao estado atômico gasoso (MARSHAL, 1997; SKOOG & NIEMAN, 1998).

3 - Espectrometria de absorção atômica por vaporização a frio (CVAAS). Os íons do metal são primeiramente reduzidos à forma elementar e arrastado por um gás até o caminho ótico, onde os átomos sofrem interação com a radiação. Devido à volatilidade apresentada pelo mercúrio elementar, não necessita da utilização de chama, daí a denominação "vapor frio". Este procedimento é utilizado na determinação de mercúrio (TAKASE et al. 2002; WINE et al., 1997).

4 - Espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GFAAS): Nesta técnica as amostras são depositadas num pequeno tubo de grafite, que é aquecido para atomizar e vaporizar o analito. Os átomos livres absorvem a luz em comprimento de onda específico (dependendo do metal desejado) e as leituras são feitas (MARSHAL, 1997).

Com todo esse avanço de tecnologias voltadas para análises tanto de proteínas quanto de metais potencialmente tóxicos, foi possível a realização das análises desejadas e comprimento com segurança e exatidão das propostas lançadas para esse projeto de mestrado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Identificação de possíveis metaloproteínas/e ou *metal binding* biomarcadoras de toxicidade do mercúrio, aplicáveis à vigilância ambiental e saúde humana nas áreas de influência direta e

indireta do AHE JIRAU – Bacia do rio Madeira, de forma a contribuir com a estimativa da magnitude de exposição total ou parcial ao mercúrio.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar métodos analíticos visando o fracionamento/separação de proteínas por eletroforese 2D-PAGE de amostras de tecido hepático de peixes coletados na área do AHE JIRAU – Bacia do rio Madeira;
- Analizar as imagens obtidas nos géis de poliacrilamida utilizando programa específico para estimar as massas molares e os pIs dos *spots* proteicos fracionados;
- Otimizar procedimentos de extração de mercúrio dos *spots* para quantificação por GFAAS;
- Caracterizar as proteínas presentes nos *spots* onde foram detectados/quantificados presença de mercúrio por ESI MS.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos utilizados durante os experimentos

- Agitador por efeito Vórtex, marca Vivax, modelo AC-110V (Korea);
- Agitador magnético Corning, modelo PC-420 (USA)
- Balança analítica marca GEHAKA, modelo, BG - 400 (SP, Basil);
- Balança analítica marca Toledo, modelo, AG245 (Switzerland);
- Banho Maria, UNIQUE, modelo USC-18000A (SP, Brasil);
- Caixa para hidratação de tiras de eletroforese IPGBOX GE (Saint Maurice, França);
- Cuba para eletroforese do tipo 2D-PAGE, marca GE (Uppsala, Suécia);
- Espectrofotômetro UV/Visível, marca ThermoSpectronic, modelo Genesys 6 (Rochester, EUA);
- Espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU AA 6800;
- Forno de microondas Speedwave, modelo SW-4, série n. 000435 (Germany)
- Mesa Agitadora, Tecnal, modelo TE-140 (SP, Brasil);
- Scanner para gel ImageScanner III GE (Suécia).
- Sistema de purificação PURELAB Ultra, marca ELGA LabWater (Saint Maurice, França);
- Sistema para SDS-PAGE, marca Amersham Biosciences, modelo SE 600 Ruby (Uppsala,

Suécia);

- Sistema para focalização isoelétrica, marca GE Healthcare, modelo Ettan IPGphor 3 (Uppsala, Suécia);
- Ultracentrífuga refrigerada, Hettich, modelo Universal 320R (Germany);
- Vidrarias convencionalmente utilizada em um laboratório de Química Analítica e Eletroforese.
- Pipetas Gilson (França).

3.2. Reagentes e soluções

- Ácido Acético Glacial, $C_2H_4O_2$, MM = 60,05 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Clorídrico, HCl, MM = 36,46 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Etilenodiaminotetracético dipotássico (K_2EDTA), $C_{10}H_{14}O_8N_2K_{22}H_2O$, MM = 404, 46 g/mol (Merck, Brasil);
- Ácido Fosfórico 85%, H_3PO_4 , MM = 98,00 g/mol (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Ácido Nítrico, HNO_3 , MM = 63,01 g/mol (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Acrilamida, C_3H_5NO , MM = 71,08 g/mol (GE Healthcare, Life Sciences, Germany);
- Agarose grau Biologia Molecular (BioAgency, São Paulo, Brasil);
- Albumina de Soro Bovino (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- AmBic 100 mM (1 L): 7,906 g de bicarbonato de amônio (AmBic), 1 L de água ultrapura
- AmBic 50 mM (500 mL): Preparar a partir do AmBic 100 MM, 250 mL de AmBic 100 MM, 250 mL de água ultrapura;
- AmBic 25 MM (250 mL): Preparado a partir do AmBic 100 MM, 62,50 mL de AmBic 100 MM, completar para 250 mL com água ultrapura;
- Anfólitos, pH de 3 a 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Azul de Bromofenol, $C_{19}H_9Br_4NaO_5S$, MM = 691,94 g/mol (BioAgency, São Paulo, Brasil);
- Coomassie blue G-250, $C_{47}H_{50}N_3NaO_7S_2$, MM = 854,03 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ditiotretitol (DTT), $C_4H_{10}O_2S_2$, MM = 154,24 g/mol (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), $C_{12}H_{25}OSO_3Na$, MM = 288,38 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Belgica);

- Eluente A (50 mL): 25 mL de ACN, 5 mL de ácido fórmico 10%, 20 mL de água ultrapura;
- Eluente B (50 mL): 30 mL de metanol (grau HPLC), 5 mL de ácido fórmico 10%, 20 mL de água ultrapura;
- Etanol, C_2H_6O , MM = 46,07 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Fitas para focalização isoelétrica com anfólitos imobilizados de pH 3 a 10 e 6 a 11, (GE Healthcare Life Sciences, Belgica);
- Glicerol 87%, $C_3H_8O_3$, MM = 92,09 g/mol (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Iodoacetamida, C_2H_4INO , MM = 184,96 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Belgica);
- Metanol, CH_4O , MM = 32,04 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- N, N'-metilenobisacrilamida, $C_7H_{10}N_2O_2$, MM = 154,17 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Belgica);
- N, N', N, N'-tetrametilenodiamina (TEMED), $C_6H_{16}N_2$, MM = 116,20 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Wathin EU);
- Óleo Mineral (GE Healthcare Life Sciences, Germany);
- Padrão Proteico de Massa Molar (GE Healthcare Life Sciences, UK);
- Peroxido de Hidrogênio 30%, H_2O_2 , PA. (Merck, Germany);
- Persulfato de Amônio, $N_2H_8S_2O_8$, MM = 228,20 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Belgica, Sweden);
- Solução Bloqueadora (50 mL): 25 mL de ACN 100%, 25 mL de ácido fórmico 10%;
- Solução de Alquilação (10 mL): Preparar na hora, 101,75 mg de iodoacetamida, 10 mL de AmBic 50 MM;
- Solução Descorante (1 L): 500 mL de ACN 100%, 250 mL de água ultrapura, 250 mL de AmBic 100 MM;
- Solução de Redução (10 mL): Preparar na hora, 30,88 mg de DTT, 10 mL de AmBic 50 MM;
- Sulfato de Amônio, $H_8N_2O_4S$, MM = 132,14 g/mol (J.T. BACKER, USA); 3-[3-colamidopropil-dimetilamônio]-1-propano sulfonato (CHAPS), $C_{32}H_{58}N_2O_7S$, MM = 614,88 g/mol (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Tiourea, CH_4N_2S , MM = 76,12 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Belgica);
- Tris-hidroximetil amino metano, $C_4H_{11}O_3N$, MM = 121,14 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Belgica, Suécia);
- Ureia, CH_4N_2O , MM = 60,06 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Wathin EU).

3.3. Trabalho de campo

Todo o processo metodológico envolvendo os trabalhos de campo, ou seja, estabelecimento das estações de amostragens e as espécies de peixes coletadas foram conduzidos em parceria com pesquisadores que desenvolvem o Programa de Monitoramento do Comportamento de Hg na área do Aproveitamento Hidrelétrico de Jirau (programa financiado pela Agência Nacional de Energia Elétrica – ANEEL).

3.4. Espécies de peixes em estudo

As três espécies selecionadas para o desenvolvimento das análises deste mestrado são: tucunaré (*Cichla ssp*), filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) e jaraqui (*Semaprochilodus sp.*).

Tucunaré (*Cichla ssp*). Fonte: www.cpt.com.br

Ordem: *Perciformes*; Família: *Cichlidae*



São peixes ósseos de pequeno porte, geralmente alcançam 50 cm em média e apresentam uma mancha escura na nadadeira caudal. Seu habitat natural é a bacia amazônica, porém ele foi introduzido nas represas do sudeste, trazendo alguns problemas, como o desaparecimento de algumas espécies que passaram a ser capturadas pelos tucunarés. São peixes diurnos de topo de cadeia que se alimentam de outros peixes, crustáceos, insetos, aranhas e etc. Os tucunarés perseguem sua presa até conseguir capturá-las. Quando pequenos, os tucunarés nadam em cardumes de 200 indivíduos ou mais, apresentam três manchas ao longo do corpo que vão se tornando em listras com o crescimento do peixe. Na fase adulta, preferem nadar em casais ou até solitários.

Filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*). Fonte: www.pescaeolution.com

Ordem: *Siluriformes* Família: *Pimelodidae*



O piraíba ou filhote, como é conhecido pela população amazonense, o *Brachyplatystoma filamentosum* é um peixe de água doce da região amazônica do Brasil. Seu habitat são as bacias do Araguaia e do Amazonas. Pode atingir até 2,50 m de comprimento e 300 kg de peso corporal. Tem grande importância comercial, possuindo carne muito apreciada na culinária brasileira, principalmente na região de origem. É considerado o maior peixe de água doce brasileiro depois do pirarucu, sendo da família dos grandes bagres. Habita o fundo dos canais dos rios. É um peixe carnívoro e voraz se alimentando de peixes inteiros, como peixes de couro, pacu, traíra, matrinxã, cascudo, cachorra, piranha e etc. Apresenta o dorso cinza oliva ou mais claro e ventre com coloração próxima ao branco, com seis barbilhões sensitivos na região anterior da cabeça.

Jaraqui (*Semaprochilodus* sp.). Fonte www.rondonoticias.com.br

Ordem: *Characiformes*; Família: *Prochilodontidae*.



São peixes de médio porte, atingindo tamanho máximo de 24-30 cm. Nas nadadeiras caudal e anal apresentam faixas transversais de coloração amarela e preta, alternadamente. Como característica principal da família Prochilodontidae, são peixes de hábito bentopelágico e apresentam grandes lábios móveis, com várias fileiras de dentes falciformes, que permitem “raspar” a matéria orgânica de várias superfícies. Portanto, grande parte da sua dieta é detritívora; alimentando-se de detritos, microorganismos associados ao sedimento e algas. Os

cardumes vivem se deslocando pelo canal para desovar ou à procura de novas áreas para alimentação e dispersão. Na região amazônica, a preços populares, a espécie é facilmente encontrada em todas as feiras, mercados e restaurantes.

3.5. Coletas e preparo das amostras

As coletas de amostras de fígado dos peixes jaraqui (*Semaprochilodus spp*), filhote (*Brachyplatystoma filamentosus*) e tucunaré (*Cichla spp.*) foram feitas considerando a sazonalidade regional (cheia, enchente, vazante e seca), na região da Usina Hidrelétrica de Jirau, rio Madeira, Rondônia/Brasil (Figura 6).

Os peixes foram anestesiados com solução de benzocaína (100 mg L⁻¹) e em seguida eutanasiados para a retirada do fígado, sendo esses congelados em nitrogênio líquido (N₂) na Base de Operações do Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico, localizada na área do Canteiro de Obras do AHE Jirau. Em seguida foram transportados em caixas de isopor para o laboratório de estudos metalômicos (Laboratório de Bioanalítica e Eletroforese) do Instituto de Biociências – Departamento de Química e Bioquímica/UNESP/Botucatu-SP, onde foram macerados manualmente com N₂ e armazenados em tubos falcon® a -20°C até a realização das análises.

As amostras de tecido hepático dos peixes foram descongeladas, maceradas durante 10 min. com o auxílio de almofariz e pistilo na proporção de 1 g de amostras para 1 mL de H₂O ultrapura, seguido por 20 minutos de centrifugação a 10000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e repetido o processo de centrifugação novamente a fim de desprezar a massa de células do tecido hepático e obter um extrato proteico mais limpo, deste, recolhido 1 mL e transferido para um frasco eppendorf® e adicionado 1 mL de solução gelada etanol/clorofórmio (1/1) e levado a centrifuga a 4°C por mais 15 minutos a fim de separar as proteínas de menor massa molar. Novamente foi recolhido 1 mL do centrifugado e transferido para um novo eppendorf®, adicionou-se a esse, 400µL de solução gelada etanol/ácido clorídrico (proporção 2,5:1), deixado de repouso na geladeira por uma hora e repetido o processo de centrifugação como citado anteriormente. Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado e obtido o *pellet* de proteínas de menor massa molar usado para quantificação de proteínas e corridas 2D-PAGE como descrito a seguir.

Figura 6. Pontos de coleta na Bacia do rio Madeira. Fonte: BASTOS W. R et al., 2009.



3.6. Quantificação das proteínas

A concentração de proteínas totais das amostras de fígado de peixes foi determinada pelo método do Biureto usando albumina de soro bovino como padrão. A curva analítica foi construída com concentrações de 10 a 100 g/L a partir de uma solução estoque de albumina (100 g/L).

Um total de 50 μ L de amostra/padrão e 2,5 mL do reativo de Biureto foram misturados e levados a banho-maria a 32°C por 15 min. Após 5 minutos em temperatura ambiente, as leituras foram feitas em espectrofotômetro a 545nm.

3.7. Separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

O *pellet* de massa molar inferior a 50 kDa obtido anteriormente, foi diluído em uma solução de solubilização contendo uréia 7 mol L⁻¹; tiouréia 2 mol L⁻¹; CHAPS (3-[(3-colaminopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato) a 2% (m/v); anfólitos 0,5% (v/v) em pH variando de 3 a 10; azul de bromofenol 0,002% (m/v). A diluição do *pellet* foi feita de tal forma que a concentração de proteínas totais resultante fosse a mesma para todas as amostras: 1,5 μ g/ μ L. Um volume de 250 μ L dessa solução foi adicionado às fitas de 13 cm contendo gel de poliacrilamida e com gradiente de pH de 3 a 10 para que estas fossem reidratadas com solução contendo a própria amostra.

As fitas foram reidratadas por 12h em caixa IPGBOX a temperatura ambiente, em seguida, levadas para o sistema de focalização isoeletrica (IEF) Ettan™ IPGphor™ 3. As corridas

IEF das fitas (gradiente de pH de 3 a 10) foram realizadas seguindo-se as programações descritas na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Programação utilizada na IEF para fitas com gradiente de pH 3-10

Etapa	Tensão (V)	Acúmulo (Vh)
1	500	500
2	1000	800
3	10000	11300
4	10000	3000

Terminada a corrida de IEF, as fitas foram equilibradas em duas etapas. Na primeira etapa, utilizou-se 10 mL de solução contendo uréia 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 em suas formas reduzidas. Na segunda etapa, utilizou-se uma solução de composição similar, entretanto, o DTT foi substituído por iodoacetamida 2,5% (m/v), para obter-se a alquilação dos grupos tióis das proteínas e com isso prevenir uma possível reoxidação (GORG et al., 2000; SILVA JUNIOR, 2001; BERKELMAN & STENSTEDT, 1998).

Na segunda etapa do processo eletroforético (2D-PAGE), as fitas foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 15% (m/v), previamente preparado em placa de 180 x 160 x 1,5mm. Aplicou-se os padrões de massa molar - β-fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa) - ao lado das fitas e ambos foram selados com solução de agarose 0,5% (m/v). A programação da corrida, feita na cuba SE 600 Ruby (GE Healthcare Bioscience AB), está descrita na tabela a seguir (Tabela 2).

Tabela 2: Programação da 2D-PAGE

Etapa	Corrente	V	Tempo
1	300	100	30 minutos
2	300	250	3 horas

Após a corrida, as proteínas foram fixadas no gel, durante 1h, empregando-se uma solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v). As proteínas foram reveladas empregando-se o corante Coomassie coloidal, que ficou em contato com o gel durante 72 horas.

O corante foi retirado e os géis lavados com água ultrapura até a retirada completa do corante, sendo revelados os *spots* proteicos.

3.8. Tratamento das imagens

Os géis, após remoção do corante, foram escaneados e as imagens analisadas pelo programa ImageMaster Platinum, versão 7.0. As imagens passaram por um processo de edição automática e manual para a retirada de falsos *spots*, onde pode se obter dados como o número de *spots* por gel, pI, massa molar dos *spots*, volume dos *spots* e massa de proteína.

Os parâmetros escolhidos para a obtenção das imagens dos géis foram: *resolução* 300 dpi, *zoom* 100% e *depth* (regula o nível de cinza do pixel) 12 ou 16 bits por pixel; os quais foram selecionados a partir das recomendações do fabricante. As imagens capturadas foram gravadas no formato tif e mel, em seguida, importadas para tratamento das mesmas no programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE HEALTHCARE, 2007).

O tratamento das imagens foi sempre realizado para dois géis por amostra obtidos de um mesmo processo de separação eletroforéticas, totalizando oito géis por tratamento.

Iniciou-se pelo ajuste de contraste da imagem do gel de forma a melhorar a visualização pelo analista. Depois, realizou-se a seleção de uma pequena região do gel, a qual continha *spots* de expressão intermediária. Os parâmetros para a detecção: *smooth* (fixa o número de vezes que o programa homogeneiza a região selecionada antes de seguir a detecção) – 3; *saliency* (medida que baseia-se na curvatura do *spot*, filtra *spots* reais) – 30; e *min area* (elimina regiões menores que as indicadas) – 5. Em seguida, estenderam-se estes parâmetros para todo o gel por meio de uma ferramenta do programa para a detecção automática.

A correlação obtida entre os géis foi feita pela equivalência entre os *spots* dos dois géis (*matching*), onde os *spots* foram comparados quanto à sua distribuição, volume, intensidade relativa, ponto isoelétrico (pIs) e massa molar (MM).

3.9. Determinação de mercúrio total

A determinação de mercúrio total nas amostras de tecido hepático dos peixes (pool de amostras), nos extratos proteicos, nos *pellets* e nos *spots* proteicos foi feita por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) conforme procedimento já publicado e descrito a seguir (MORAES et al., 2013).

As amostras de tecido hepático, extratos, *pellets* e *spots* proteicos foram mineralizadas da seguinte forma: cerca de 50 mg (pesadas em triplicata em balança analítica com precisão de

centésimo de miligrama) de amostra de tecido hepático, e/ou 6 *spots* proteicos (obtidos das duplicatas de três corridas – em cada corrida obteve-se 2 géis), e/ou a massa total dos *pellets* proteicos de cada uma das duas etapas da precipitação fracionada (~100 mg; obtidos pela diferença da massa inicial do microtubo e a massa final, depois da precipitação das proteínas) foram transferidos para frascos de digestão de 5 mL. Para cada frasco de digestão foram transferidas alíquotas de 1,00 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de frascos foi colocado em banho de ultrassom da UNIQUE à temperatura de 40°C e 135 Watts de potência, até completa mineralização das amostras (extrato transparente). Em seguida, os extratos ácidos obtidos foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL completando-se os volumes com água ultrapura (18,2 MΩ cm⁻¹). Para validação do método de mineralização foi utilizado padrão certificado *Fish Protein* DORM 4 – NRC contendo 410±55 µg kg⁻¹ de mercúrio total (MORAES et al., 2013).

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

As paredes interiores do tubo de grafite com plataforma integrada utilizado nas análises de mercúrio foram recobertos com tungstênio. No processo de recobrimento do tubo, alíquotas de 25 µL de solução modificador tungstato de sódio 1000 mg L⁻¹ foram injetadas dentro do atomizador, o qual foi em seguida submetida ao programa descrito por Silva et al. (2007). Íons de tungstênio foram depositados sobre a plataforma do tubo de grafite com aquecimento até 500°C, formando uma camada de carbeto de tungstênio, que funciona como modificador químico. Após este tratamento, a vida útil do tubo foi de 483 queimas (MORAES et al., 2013).

3.9.1. Preparação da curva analítica

A curva analítica foi preparada utilizando amostrador automático com solução padrão de mercúrio (Merck). Alíquotas de 2, 4, 8, 12 e 16 µL de uma solução padrão de mercúrio 2,50

$\mu\text{g L}^{-1}$ foram combinadas com 4 μL de solução de nitrato de Cu (II) 100 mg L^{-1} e água ultrapura suficiente para um volume final de 20 μL de solução. As concentrações das soluções-padrão de mercúrio variou entre 0,25 e 2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estas soluções foram, em seguida, injetadas no tubo de grafite do espectrômetro recoberto com carbeto de tungstênio usando a micropipeta do amostrador automático. As medidas de absorbâncias foram feitas em triplicata, o programa de aquecimento do tubo de grafite, otimizado para a análise de mercúrio é mostrado na Tabela 3 (MORAES et al., 2013).

3.9.2. Procedimentos analíticos

Após a fase de preparação das amostras (preparação dos extratos ácidos), alíquotas de 20 μL obtida pela mistura de 10 μL de extrato ácido com 4 μL de solução de nitrato de Cu (II) 100 mg L^{-1} e 6 μL de água ultrapura, foram injetados dentro do tubo de grafite revestido com carbeto de tungstênio usando micropipeta do amostrador automático. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, utilizando o programa de aquecimento do tubo de grafite apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de mercúrio em extratos ácidos obtidos a partir de amostras mineralizadas de *spots* e/ou *pellets* proteicos obtidos de gel de eletroforese 2D-PAGE de tecido hepático de peixes.

Etapas	Temp. (°C)	Estágios		Fluxo de argônio (L min^{-1})
		Rampa (s)	Patamar (s)	
Secagem	90	5	0	1
Secagem	120	5	5	1
Pirólise	250	5	5	1
Pirólise	800	5	10	1
Atomização	1600	2	5	0
Limpeza	1800	5	0	1

3.9.3. Digestão trípica dos *spots* proteicos para caracterização por ESI MS/MS

Os *spots* protéicos foram extraídos dos géis utilizando-se um bisturi, sendo cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm^3 . Os segmentos foram transferidos para microtubos de

2 mL contendo ácido acético 1% e mantidos em geladeira até os passos subsequentes, descritos a seguir:

I. Remoção do corante

- Com uma pipeta de 200 μ L, o ácido acético foi retirado e os segmentos dos *spots* foram lavados com a solução descorante adicionando um volume suficiente para cobrir o gel, mantendo-se em repouso por 10 min.

- A solução descorante foi removida em seguida e o processo de lavagem repetido até a retirada total do corante comassie blue e que o gel ficasse transparente. Após as lavagens foi adicionado acetonitrila, e após agitação a mistura foi mantida em repouso por 10 min (decorrido esse tempo o gel deve ficar branco).

- A acetonitrila foi removida e o procedimento descorante foi repetido por mais uma vez. Após remoção da acetonitrila o tubo permaneceu aberto por 30 min para que o resíduo remanescente desse solvente fosse evaporado à temperatura ambiente.

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

II. Redução e alquilação

- Os fragmentos de gel foram reidratados em aproximadamente 200 μ L de solução de redução e incubados a 56°C por 40 min.

- Com auxílio de uma pipeta, a solução de redução foi removida e adicionou-se aproximadamente 200 μ L de solução de alquilação. Em seguida, a mistura foi incubada na ausência de luz por 30 min à temperatura ambiente.

- A solução de alquilação foi removida e os fragmentos lavados com bicarbonato de amônio 25 mmol L⁻¹ por 3 min.

- Após esse tempo a solução de bicarbonato de amônio foi removida e os fragmentos foram desidratados duas vezes com acetonitrila por 10 min. A acetonitrila foi descartada e o resíduo remanescente nos fragmentos foi evaporado à temperatura ambiente.

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

III. Digestão trípica das proteínas

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

IV. Eluição dos peptídeos

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

- Foi adicionado em seguida aproximadamente 100 μ L de acetonitrila e transferiram-se os microtubos para banho ultrassom por 15 min. a 40°C. Após esse tempo, os microtubos foram retirados do ultrassom, foi dado um *spin* em centrífuga e os sobrenadantes foram transferidos para os microtubos de 1,5 mL;

- Finalmente, os microtubos de 1,5 mL com a solução contendo os peptídeos extraídos foram submetidos à secagem em um concentrador a vácuo sob temperatura a 30°C até aproximadamente 1 μ L. Após esse processo, as alíquotas das soluções contendo os peptídeos foram armazenadas em freezer até análise por espectrometria de massas.

3.9.4. Caracterização das proteínas por ESI MS/MS

As alíquotas das soluções contendo os peptídeos foram analisadas para obtenção dos espectros de massas utilizando Plataforma UPLC em espectrômetro de massa com fonte ionização por ESI e analisador de massas híbrido Xevo G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado com sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA). A identificação das proteínas foi feita por meio de busca em banco de dados *Uniprot* (WWW.UNIPROT.ORG).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da concentração e proteína total

A obtenção dos *pellets* proteicos foi feita utilizando-se o processo de precipitação fracionada, conforme descrito no item 3.7 da presente dissertação, com o objetivo de obter uma fração com proteínas maiores (massa molar >50 kDa) e outra fração com proteínas menores (massa molar <50 kDa). A literatura descreve que o mercúrio apresenta maior afinidade por proteínas com massa molar abaixo de 10 kDa, as chamadas metalotioneínas – proteínas que por apresentarem grande porcentagem de cisteínas (aminoácidos que contém grupos sulfidril, classificados como base mole) formam complexos estáveis com o mercúrio. Dessa forma, optou-se por trabalhar com as proteínas presentes na fração de menor massa molar, na tentativa de identificar possíveis proteínas ligadas ao mercúrio.

Assim como na primeira etapa do trabalho, o primeiro procedimento também foi a determinação do teor total de proteína nos extratos obtidos a partir da solubilização dos *pellets*

proteicos das amostras de tecido hepático das espécies de peixes estudadas, com o objetivo de aplicar uma quantidade de massa proteica conhecida nas fitas de IEF das corridas eletroforéticas. Essas determinações foram feitas utilizando-se o método do Biureto (SYKES et al., 1987). As concentrações de proteína total nos extratos dos *pellets* de menor massa molar foram (g L^{-1}): Tecido hepático – jaraqui: $17,80 \pm 0,45$, tucunaré: $18,20 \pm 0,44$ e filhote: $18,60 \pm 0,43$.

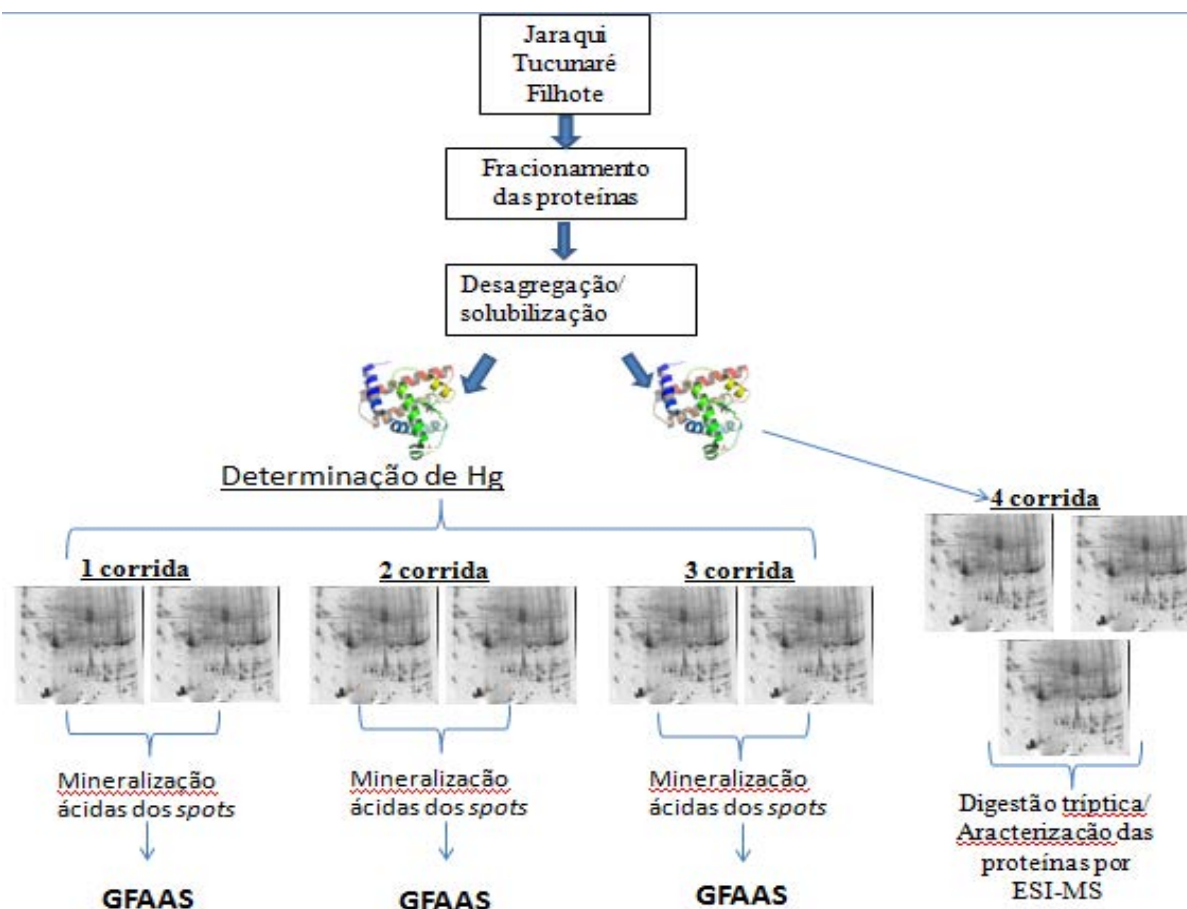
Com base no resultado da concentração de proteína total presente nas amostras de tecido hepático, foi possível calcular o volume de amostra (extrato proteico) a ser aplicado nas fitas de IEF na etapa de hidratação, anterior à focalização isoeletrica (separação das proteínas em 1D), a fim de se obter uma massa de proteína de 375 μg , que, com base no manual do sistema IEF, pode favorecer uma melhor separação das proteínas no gradiente de pH 3-10 (BERKLMAN & STENSTEDT 1998). Observa-se também que os resultados obtidos nas amostras de tecido hepático apresentam valores bem próximos, o que demonstra que o processo de extração foi eficiente e homogêneo.

4.2. Fracionamento das proteínas por 2D-PAGE

Nessa etapa do trabalho os experimentos de eletroforese 2D-PAGE foram feitos em quatro repetições de corridas, com dois géis cada, das seguintes espécies: jaraqui (*Semaprochilodus* sp.), tucunaré (*Cichla* spp.) e filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*), utilizando-se os extratos obtidos na ressolubilização dos *pellets* proteicos de menor massa molar (<50 kDa).

Os géis obtidos em três corridas (seis géis) de cada amostra foram utilizados na determinação de mercúrio nos *spots* proteicos e os outros géis obtidos na quarta corridas de cada amostra foram utilizados para a caracterização das proteínas por ESI-MS/MS dos *spots* proteicos que apresentaram mercúrio (Figura 7)

Figura 7. Esquema geral do experimento.



As análises de correlação entre as repetições dos géis (*matching*) e a contagem de *spots* proteicos obtidos em cada gel foram feitas utilizando-se os parâmetros para obtenção das imagens. Nas Figuras 8-10 são apresentados um exemplo de cada gel obtido nas quatro repetições das corridas eletroforéticas das amostras de tecido hepático das espécies de peixes estudadas. Os resultados médios das análises de correlação entre as duas repetições dos géis, bem como a contagem média de *spots* dos mesmos, são apresentados na Tabela 4. Os *spots* proteicos destacados com círculo são aqueles nos quais foi detectada a presença de mercúrio e determinada às concentrações deste elemento por GFAAS (MORAES et al., 2013).

Figura 8. Gel a 15% (m/v) obtido por 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido hepático de jaraqui. Os números e círculos em azul indicam os *spots* nos quais foram identificadas a presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS/MS.

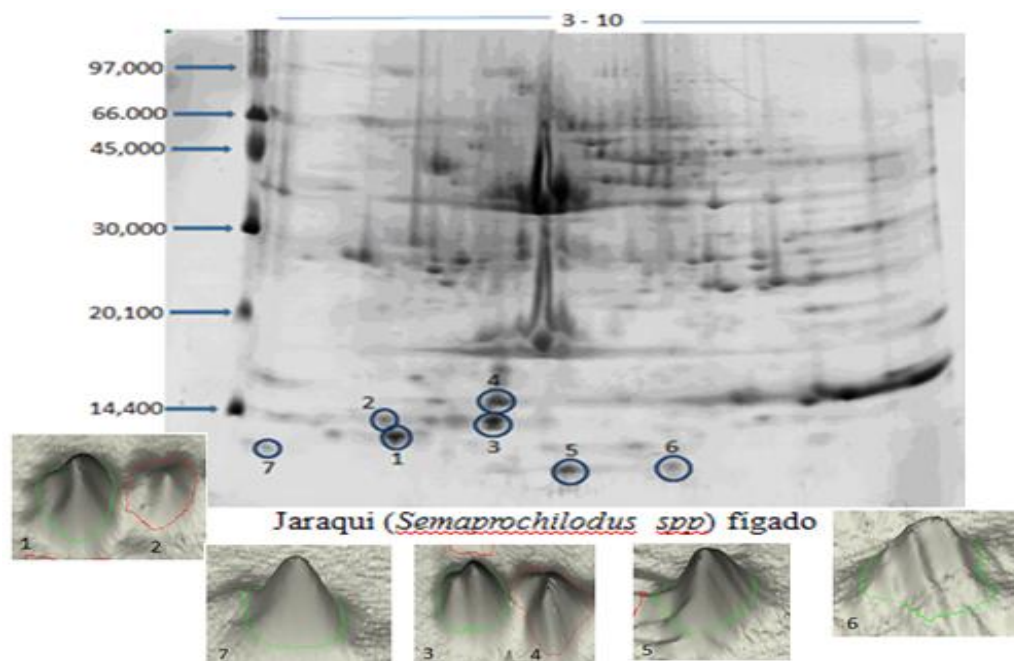


Figura 9. Gel a 15% (m/v) obtido por 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido hepático de tucunaré. Os números e círculos em azul indicam os *spots* nos quais foram identificadas a presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS/MS.

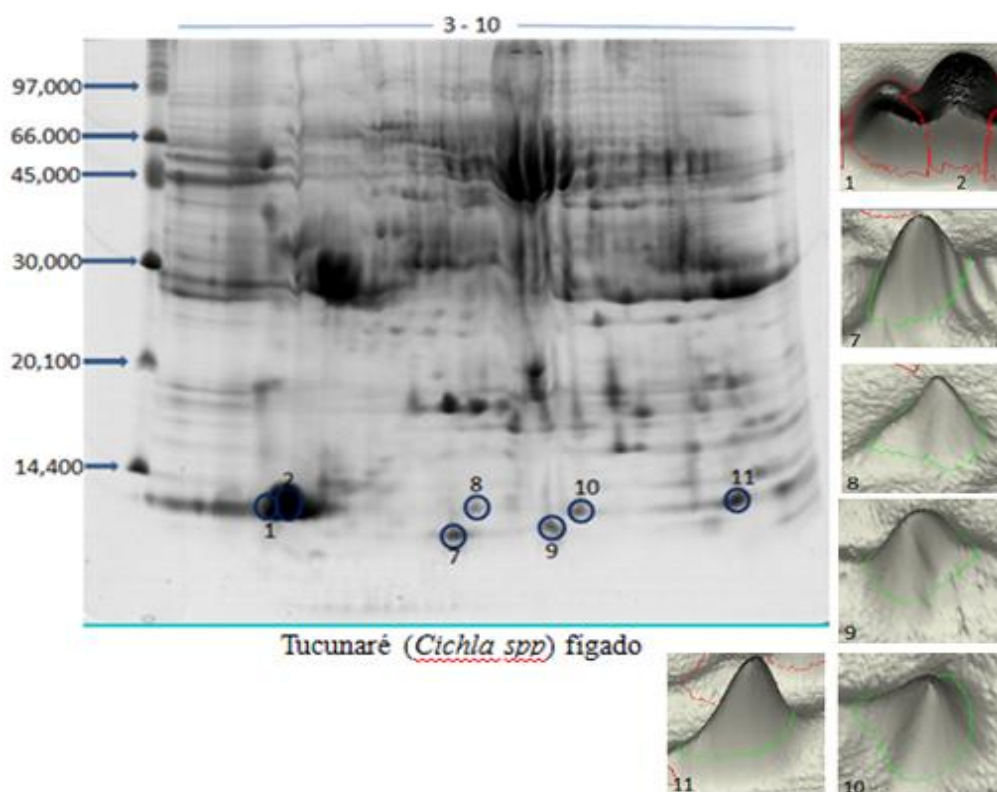


Figura 10. Gel a 15% (m/v) obtido por 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido hepático de filhote. Os números e círculos em azul indicam os *spots* nos quais foram identificadas a presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS/MS.

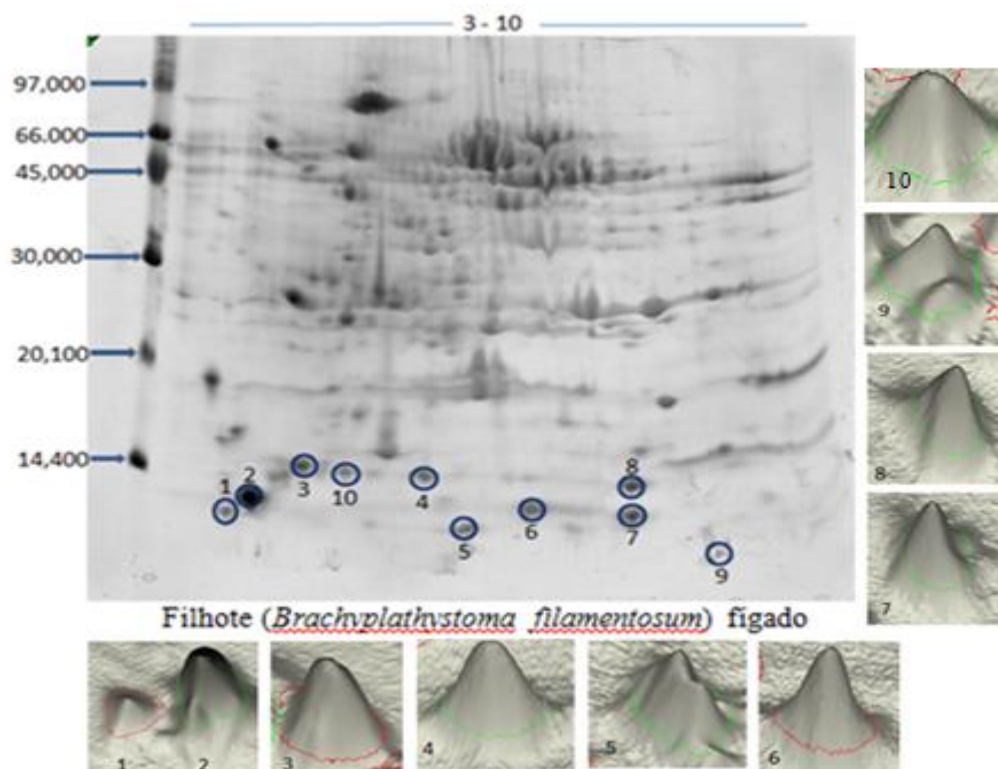


Tabela 4. Análise de correlação entre os géis considerando quatro corridas eletroforéticas no fracionamento das proteínas das amostras de tecido hepático das espécies de peixes estudadas.

Espécies de peixes	Nº médio de <i>spots</i> (n=8)	Correlação média entre os géis (<i>matching</i>)
Jaraqui	276 ± 6	82 ± 3 %
Tucunaré	332 ± 9	80 ± 3 %
Filhote	308 ± 7	93 ± 3 %

A análise de correlação entre os géis, considerando as quatro corridas eletroforéticas, demonstrou que em média mais de 80% dos *spots* proteicos estavam presentes nos oito géis das amostras de tecido hepático das espécies de peixes estudadas. Deve-se destacar que o número médio de *spots* encontrados nos géis e o *matching* (correlação entre os géis), considerando quatro corridas eletroforéticas – com dois géis por corrida – apresentaram desvios padrões menores que 5%.

4.3. Avaliação quantitativa de mercúrio

A determinação de mercúrio nessa etapa do trabalho, além de ter sido feita nas amostras de tecido hepático das espécies de peixes estudadas, também foram feitas nos *pellets* proteicos obtidos no processo de precipitação fracionada das proteínas (*pellets* com > massa molar e com < massa molar). O objetivo desse procedimento foi fazer um balanço de massa de mercúrio em relação à concentração desse elemento nas amostras de tecidos e nos *spots* proteicos. Na Tabela 5 são apresentadas as concentrações de mercúrio nos *pellets* proteicos obtidos, a concentração de mercúrio nas amostras de tecido hepático das espécies dos peixes e a concentração de mercúrio em padrão certificado de proteína de músculo de peixe. Foi utilizado o padrão DORM 4 – NRC para validar o método de determinação de mercúrio otimizado (MORAES et al., 2013).

Tabela 5. Resultados obtidos na determinação de mercúrio nos *pellets* de maior e menor massa molar (MM), nas amostras de tecido hepático (TH).

Espécies de peixes	<i>Pellets</i> de TH (>MM)	<i>Pellets</i> de TH (<MM)	Tecido Hepático	DORM 4 –NRC*
Jaraqui	n.d.	277 ± 4	426 ± 6	-
Tucunaré	n.d.	438 ± 9	674 ± 13	-
Filhote	n.d.	402 ± 7	617 ± 11	-
Padrão certificado	-	-	-	403 ± 12

Concentração de mercúrio em $\mu\text{g kg}^{-1}$; n.d. – não detectado.

*Padrão certificado de proteína de músculo de peixe contendo $410 \pm 55 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 5, observa-se que aproximadamente 65% do mercúrio presente nas amostras de tecido hepático está ligado nas proteínas dos *pellets* de massa molar menor que 50 kDa. Como não foi detectado mercúrio nos extratos dos *pellets* proteicos de massa molar maior que 50 kDa, pode-se inferir, considerando que o processo de extração tenha sido eficiente, que 65% do mercúrio presente nas amostras de tecido hepático dos peixes estudados estão ligados à fração proteica e que 35% pode estar ligado em outros compostos e/ou macromoléculas, como por exemplo, lipídeos.

Ainda, se compararmos as concentrações de mercúrio nas amostras de tecido hepático quando comparados com as concentrações obtidas nas amostras de tecido muscular das espécies de peixes estudadas (tucunaré - 435 ± 11 ; filhote - 378 ± 9 e jaraqui - 132 ± 4). Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos da literatura, que destaca maior acúmulo de metais

potencialmente tóxicos (como o mercúrio) no fígado de peixes (AFONSO et al., 2008; BEBIANNO et al., 2007). No caso, o fígado pode conter maior concentração de proteínas com grupos tióis e/ou sulfidrilas, que por apresentarem átomos de enxofre, atuam como base mole Lewis, formando complexos estáveis com ácidos moles de Lewis, como no caso, o mercúrio (PEARSON, 1963).

Os dados apresentados são considerados confiáveis, pois foram validados com base no resultado obtido na determinação de mercúrio no padrão certificado DORM 4 – NRC de proteína de músculo de peixe. A Tabela 5 mostra que o valor experimental do desvio padrão relativo obtido nas amostras é menor que 3% e, que o valor experimental absoluto do padrão certificado ($403 \mu\text{g kg}^{-1}$) é cerca de 2% menor que o valor certificado absoluto ($410 \mu\text{g kg}^{-1}$), o que comprova a exatidão e precisão do método otimizado para determinação de mercúrio.

As concentrações de mercúrio nos *spots* proteicos obtidos nas corridas por 2D-PAGE com os *pellets* de menor massa molar também foram determinadas utilizando-se o método por GFAAS otimizado (MORAES et al., 2013). Essas determinações indicaram a presença de mercúrio nos *spots* proteicos destacados com círculo nos géis de poliacrilamida apresentados nas Figuras 8-10. A Tabela 6 mostra os valores de concentração de mercúrio determinados em cada *spot* proteico, com suas respectivas massas molares (MM) e pontos isoelétricos (pI), além da massa de proteína determinada utilizando-se o programa ImageMaster 2D Platinum 7.0.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 6, pode-se observar que as concentrações de mercúrio nos *spots* proteicos apresentam valores na faixa de 12,50 a 83,40 mg g^{-1} . No entanto, os resultados apresentados nessas tabelas não fornecem muitas informações sem que tenham sido caracterizadas as proteínas desses *spots* proteicos. Dessa forma, foi feita a conversão da estimativa das massas de *spots* proteicos e das massas de mercúrio para quantidade de moléculas de proteínas no *spot* proteico e quantidade de átomos de mercúrio. Para isso, consideraram-se as respectivas massas molares dos *spots* proteicos, a massa molar do mercúrio ($200,59 \text{ g mol}^{-1}$), a constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$) e que $1 \text{ kDa} = 1,661 \times 10^{-24} \text{ g}$. Esses cálculos possibilitaram a estimativa de quantos átomos de mercúrio estariam presentes por moléculas de *spot* proteico (LIMA et al., 2010; SANTOS et al., 2011; NEVES et al., 2012). Os resultados obtidos nesses cálculos são mostrados na Tabela 7 em termos de número de átomos mercúrio por molécula do *spot* proteico considerado. Os cálculos referentes ao *spot* JH1 são mostrados como exemplo no apêndice II.

Tabela 6. Valores obtidos na determinação da concentração de mercúrio por GFAAS nos *spots* proteicos das amostras de tecido hepático de jaraqui, tucunaré e filhote.

Spots Proteicos	Massa Molar (kDa)	pI	Massa de proteína (µg)	Concentração de Hg (mg g⁻¹)
JH1	13,00	4,10	0,90	25,80
JH2	13,80	4,10	2,10	27,10
JH3	13,60	5,30	9,50	28,30
JH4	14,60	5,60	8,50	12,90
JH5	11,50	6,10	5,80	35,00
JH6	11,60	7,20	2,10	51,00
JH7	12,50	3,10	1,90	14,00
TH1	12,30	3,90	12,60	15,50
TH2	12,50	4,10	36,40	15,90
TH7	11,40	6,10	3,00	31,00
TH8	12,40	6,40	1,00	29,90
TH9	11,60	7,30	2,10	33,40
TH10	12,20	7,60	1,50	13,30
TH11	12,60	9,30	5,10	15,00
FH1	12,20	3,50	2,30	14,50
FH2	12,70	3,80	8,50	14,90
FH3	14,10	4,90	5,90	13,00
FH4	13,60	5,70	3,20	12,50
FH5	11,50	6,20	4,30	33,90
FH6	12,30	6,90	6,10	15,40
FH7	12,20	8,00	4,70	14,20
FH8	13,30	8,00	5,90	14,10
FH9	10,50	8,90	0,60	83,40
FH10	13,70	4,90	2,40	12,50

JH1–JH7 *spots* do fígado de jaraqui; TH1–TH2 e TH7–TH11 *spots* do fígado de tucunaré; FH1–FH10 *spots* do fígado de filhote.

Tabela 7. Estimativa do número de átomos de mercúrio por molécula de *spot* proteico das amostras de tecido hepático de jaraqui, tucunaré e filhote.

Spots Proteicos	Nº de moléculas no <i>spot</i> proteico $\times 10^{13}$	Nº de átomos de Hg $\times 10^{13}$	Nº de átomos de Hg por moléculas de proteína
JH1	4,00	7,00	1,70
JH2	9,00	17,00	1,90
JH3	42,00	81,00	1,93
JH4	35,00	33,00	0,94
JH5	30,00	61,00	2,03
JH6	11,00	32,00	2,91
JH7	9,00	8,00	0,90
TH1	62,00	59,00	0,95
TH2	176,00	174,00	0,99
TH7	16,00	28,00	1,80
TH8	5,00	9,00	1,80
TH9	11,00	21,00	1,90
TH10	7,00	6,00	0,86
TH11	24,00	23,00	0,96
FH1	11,00	10,00	0,90
FH2	40,00	38,00	0,95
FH3	25,00	23,00	0,92
FH4	14,00	12,00	0,86
FH5	23,00	44,00	1,90
FH6	30,00	28,00	0,93
FH7	23,00	20,00	0,87
FH8	27,00	25,00	0,93
FH9	4,00	15,00	3,80
FH10	10,00	9,00	0,90

JH1–JH7 *spots* do fígado de jaraqui; TH1–TH2 e TH7–TH11 *spots* do fígado de tucunaré; FH1–FH10 *spots* do fígado de filhote.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 7 é possível estimar a proporção de átomos de mercúrio por molécula de *spot* proteico, dividindo-se um valor pelo outro. Dessa forma, é possível fazer as seguintes inferições: os *spots* do tecido hepático JH4, JH7, TH1, TH2, TH10–TH11, FH1–FH4, FH6–FH8 e FH10, apresentam aproximadamente um átomo de mercúrio por molécula de *spot* proteico; os *spots* do tecido hepático JH1, JH2, JH3, JH5, TH7–TH9 e FH5, apresentam aproximadamente dois átomos de mercúrio por molécula de *spot* proteico; o *spot* do tecido hepático JH6, apresenta três átomos de mercúrio por molécula de *spot* proteico; e o *spot* do tecido hepático FH9, apresenta quatro átomos de mercúrio por molécula de *spot* proteico. Esses resultados, embora estimativos, sugerem que pode existir uma relação estequiométrica entre o número de átomos de mercúrio e o número de moléculas dos *spots* proteicos, o que seria

uma possível indicação de que esses *spots* podem se tratar de metaloproteínas (LIMA et al., 2010; SANTOS et al., 2011; NEVES et al., 2012).

4.4. Caracterização dos *spots* proteicos por ESI MS/MS

Concluídas as etapas de fracionamento das proteínas por 2D-PAGE, análise da imagens dos géis contendo os *spots* proteicos, avaliação quantitativa do mercúrio nos *pellets* e nos *spots* proteicos – sendo estas as estratégias de estudo utilizando as componentes de seletividade e de sensibilidade – partiu-se então para a etapa de caracterização dos *spots* proteicos nos quais foram identificados e quantificados mercúrio, utilizando-se a componente estrutural e como ferramenta a espectrometria de massas. Assim, utilizando as condições experimentais descritas no item 5.9, nessa etapa do trabalho foram analisados por ESI MS/MS todos os *spots* proteicos destacados com círculos nos géis obtidos por 2D-PAGE e apresentados nas Figuras 8-10. Foi possível caracterizar com sucesso 18 proteínas, de um total de 24 *spots* proteicos, considerando os *spots* nos quais foi identificada a presença de mercúrio e estimado o número de átomos desse elemento no *spot* proteico com base na sua concentração determinada por GFAAS (LIMA et al., 2010; SANTOS et al., 2011; NEVES et al., 2012; MORAES et al., 2013).

Em alguns *spots* proteicos foram encontradas mais de uma proteína na busca no banco de dados, o que pode ocorrer no processo de caracterização de proteínas por espectrometria de massas (RISON et al., 2000). No entanto, foi assumido uma condição de compromisso no fechamento da classe de proteína, considerando o maior *score* e/ou cobertura e, também os dados de massa molar e pI obtidos por 2D-PAGE (experimental) em relação à massa molar teórica obtidas no banco de dados *Uniprot* (WWW.UNIPROT.ORG). As Tabelas 8-10 apresentam os dados de caracterização obtidos na análise por ESI MS/MS com a provável proteína identificada com base nas condições descritas acima. Em relação às proteínas não identificadas em 6 *spots* proteicos, foi devido a dificuldade para fechar o processo de caracterização foi devido ao fato de se encontrar mais de uma possibilidade para a sequência de peptídeos. No entanto, será dada continuidade nos trabalhos de busca no banco de dados procurando fechar a caracterização desses *spots* proteicos.

Tabela 8. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido hepático de Jaraqui.

<i>Spot Gel</i>	<i>Proteína</i>	<i>Acesso</i>	<i>Score</i>	<i>pI/MM do spot</i>	<i>MM ESI</i>	<i>MM teórica Uniprot</i>	<i>Cobertura (%)</i>	<i>Peptídeos sequenciados</i>
JH1	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	48.5226	4,10/13,00	11.98	11.30	9.43	SGFIEEEELK
JH2	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	47.7782	4,10/13,80	12.30	11.60	10.09	LFLQNFSAGAR
JH3	Não identificada	-	-	5,30/13,60	-	-	-	-
JH4	Não identificada	-	-	5,60/14,60	-	-	-	-
JH5	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_ICTPU	126.013	6,10/11,50	19.80	18.00	5.77	ESTLHLVLR GGAKK
JH6	Keratin. type II cytoskeletal 8	K2C8_DANRE	745.119	7,20/11,60	59.40	57.80	2.12	LALDIEIATYR
JH7	39S ribosomal protein L36. mitochondrial	RM36_DANRE	50.9635	3,10/12,50	14.05	12.94	11.21	SLVGSLTR SALKK

Tabela 9. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido hepático de Tucunaré.

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	MM ESI	MM teórica Uniprot	Cobertura	(%)	Peptídeos sequenciados
TH1	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPKA	549.6608	3,90/12,30	11.80	11.60	10.09		LFLQNFSAGAR
	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	139.6307		11.97	11.30	9.43		SGFIEEEEELK IGIDEFAALVKA
TH2	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	193.7939	4,10/12,50	12.30	11.60	10.09		LFLQNFSAGAR NFFAKVGLSAK
TH7	Zinc finger and BTB domain-containing protein 24	ZBT24_DANRE	61.8005	6,10/11,40	79.60	75.40	3.13		SALPPSSSSPAVLALHSATHK
TH8	Keratin. type II cytoskeletal 8	K2C8_DANRE	74.8358	6,40/12,40	59.379	57.760	2.12		LALDIEIATYR
TH9	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_ICTPU	135.2119	7,30/11,60	19.80	18.00	11.54		ESTLHLVLR EGIPPDQQR
TH10	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_ICTPU	32.1558	7,60/12,20	19.80	18.00	5.77		ESTLHLVLR TLSDYNIQK
TH11	Dual specificity protein phosphatase 22-B	DS22B_DANRE	106.8153	9,30/12,60	21.40	20.60	8.74		VLPDLYLGNFKDARDR

Tabela 10. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido hepático de Filhote.

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	MM ESI	MM teórica Uniprot	Cobertura (%)	Peptídeos sequenciados
FH1	Glycolipid transfer protein	GLTP_DANRE	13.7211	3,50/ 12,20	24.99	23.95	6.7	FIQVLLQSLVDGDK
FH2	Não identificada	-	-	3,80/12,70	-	-	-	-
FH3	Não identificada	-	-	4,90/14,10	-	-	-	-
FH4	Não identificada	-	-	5,70/13,60	-	-	-	-
FH5	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_ICTPU	101.5258	6,20/11,50	19.80	18.00	11.54	ESTLHLVLR EGIPPDQQR
FH6	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	BHMT1_DANRE	1442.33	6,90/12,30	46.50	44.10	9.5	AGPWTPEAAAHEHPEAVR AGSNVMQTFTFYASDDK AGPWTPEAAAHEHPEAVRQLHR
FH7	Macoilin-2	MACO2_DANRE	15.7996	8,00/12,20	81.96	78.30	2.58	QEREAEAAAAAAAAAASK
FH8	Não identificada	-	-	8,00/13,30	-	-	-	-
FH9	N-terminal Xaa-Pro-Lys N-methyltransferase 1	NTM1A_DANRE	72.7424	8,90/10,50	26.50	25.30	11.66	DVPPTVDGMLGGYGSISSIDINGSKK DVPPTVDGMLGGYGSISSIDINGSKK
FH10	GTP cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein	GFRP_DANRE	268.8754	4,90/13,70	10.30	10.02	11.24	PYILISTQIR

Os resultados apresentados nas tabelas 8-10 mostram que foi possível caracterizar por ESI MS/MS 17 proteínas. Nos *spot* proteicos nos quais foram identificadas mais de uma proteína, pode-se inferir que no caso, tratam-se de isoformas e/ou fragmentos de uma proteína de maior massa molar (OFFER et al., 1993). A seguir discutiremos a função dessas proteínas caracterizadas nos *spots* proteicos analisados por ESI MS/MS fracionadas do tecido hepático das amostras de peixes estudadas.

4.5. - 39S Ribosomal protein L36 mitochondrial

Trata-se de uma proteína componente da subunidade do ribossomo mitocondrial, participando ativamente na síntese de outras proteínas no interior da mitocôndria. Essa proteína não está associada a íons metálicos considerando as informações obtidas na literatura até o momento (MANJULI et al., 2008). No entanto, apresentam na sequência peptídica cadeias terminais com átomos de nitrogênio que podem formar ligações não específicas com íons metálicos divalentes, como o mercúrio, formando uma proteína do tipo *metal-binding* (GARCIA et al., 2006; MANJULI et al., 2008). O *spot* JH7 de tecido hepático de jaraqui foi caracterizado como sendo essa proteína com mercúrio incorporado em sua estrutura, mas, com baixa intensidade, não podendo ser candidato a um possível biomarcador desse elemento.

4.6. – Parvalbumin

É uma proteína de baixa massa molar (11-12 kDa), apresenta as isoformas *parvalbumin-2*, *parvalbumin alfa* e *parvalbumin beta*, todas as três isoformas normalmente se ligam à íons cálcio. Essa proteína está diretamente envolvida em processos de relaxamento muscular após ocorrência de contração. Essa proteína é basicamente formada por sequências peptídicas que contém serina e alanina – aminoácidos que apresentam estruturas com grupos carboxílicos, amino e hidroxila, suscetíveis à complexação de íons metálicos divalentes, principalmente cálcio e magnésio (BERBEL et al., 1996). A *Parvalbumin* ligada ao mercúrio foi a proteína mais identificada nos *spots* proteicos analisados, sendo que a isoforma *parvalbumin-2* foi caracterizada nos *spots* JH2 e TH2 de tecido hepático de jaraqui e tucunaré, respectivamente; a *parvalbumin alfa* foi caracterizada no *spot* TH1 de tecido hepático de tucunaré; e a *parvalbumin beta* foi caracterizada nos *spots* JH1 e TH1 de tecido hepático de jaraqui e tucunaré, respectivamente. A literatura até o momento não apresenta nenhum trabalho que discute a possibilidade da ligação de mercúrio e/ou outros metais potencialmente tóxicos na *parvalbumin* ou em suas isoformas. No entanto, por essa proteína apresentar sítios de ligações de metais divalentes disponíveis, podem formar ligações com íons Hg^{2+} (GARCIA et al., 2006; BERBEL

et al., 1996). Dessa forma, pode-se inferir que o mercúrio pode ter se incorporado às isoformas da *parvalbumin* por ligações não específicas formando uma proteína *metal-binding*, não sendo configurado como um cofator metálico (GARCIA et al., 2006). Deve-se destacar que todos os *spots* caracterizados com isoformas da *parvalbumin* ligadas ao mercúrio apresentaram intensidade significativa e relação estequiométrica entre número de átomos de mercúrio por moléculas de *spots* proteicos, o que pode candidatar esses *spots* a possíveis biomarcadores de mercúrio.

4.7. - Ubiquitin -40S ribosomal protein S27a

Proteína que, quando ligada de forma covalente, pode estar envolvida na reparação do DNA, regulação do ciclo celular, endocitose, degradação lisossomal; pode também estar envolvida em processos de sinalização que conduzem à ativação do fator de transcrição NF-kappa-B; e na sua forma livre, pode ativar proteínas quinases e ter papel na sinalização celular. Essa proteína apresenta domínios com grupos específicos para ligação de zinco (*zinc-finger metal binding domains*) (CHEVALIER et al., 1996). Por apresentar domínios específicos ligados a átomos de zinco, que apresentam características semelhantes ao mercúrio (ácido mole), pode também se ligar a outros íons divalentes como o cobre, o cádmio e o mercúrio (GARCIA et al., 2006; PEARSON ET AL., 1963; CHEVALIER et al., 1996). Os *spots* JH5, TH9, TH10 e FH5 de tecido hepático de jaraqui, tucunaré e filhote, respectivamente, foram caracterizados como sendo essa proteína com mercúrio incorporado em sua estrutura. Como todos esses *spots* apresentaram intensidade significativa, podem ser considerados possíveis candidatos à biomarcadores de mercúrio. Os dados obtidos por GFAAS demonstraram que esses *spots* apresentam uma relação estequiométrica com o mercúrio, o que reforça a hipótese dessa proteína atuar como biomarcador desse elemento.

4.8. - GTP Cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein (GCHRF)

Trata-se de uma enzima que ajuda na regulação da biossíntese de tetrahydrobiopterina, por meio da inibição de retorno da taxa da enzima limitante GTP ciclo I (GTP CHI), sendo codificada pelo gene GCHRF. A tetrahydrobiopterina é o cofator necessário para a hidroxilação de aminoácidos aromáticos e formação da sequência peptídica (YONEYAMA et al., 2001). Postula-se que essa enzima pode atuar na regulação do metabolismo da fenilalanina no fígado e na produção de neurotransmissores de aminas biogênicas e do óxido nítrico. Essa enzima possui cadeias laterais compostas por dois grupos tióis que normalmente apresentam Zn^{2+} coordenado. Acredita-se que a coordenação do Zn^{2+} ioniza os grupos hidroxila que atuam com nucleófilos do

anel imidazol presente na GTP (YONEYAMA et al., 2001). Por apresentar tais cadeias laterais coordenadas com zinco, que apresentam características semelhantes aos íons Hg^{2+} (ácido mole), pode-se inferir que o mercúrio possa deslocar os íons Zn^{2+} dos grupos tióis, ligando-se às cadeias laterais da GCHRF (GARCIA et al., 2006; PEARSON ET AL., 1963; YONEYAMA et al., 2001). O *spot* FH10 de tecido hepático de filhote foi caracterizado como sendo essa enzima com mercúrio incorporado em sua estrutura. Como esse *spot* apresentara intensidade significativa, pode ser considerado possível candidato à biomarcador de mercúrio. Os dados obtidos por GFAAS demonstraram que esse *spot* apresenta uma relação estequiométrica com o mercúrio, o que reforça a hipótese dessa enzima atuar como biomarcador desse elemento.

4.9. - Keratin. type II cytoskeletal 8

Proteína que atua na ligação do aparelho contrátil à distrofina nos costâmeros do músculo estriado, podendo apresentar mais de uma isoforma. Essa proteína é dita sub-sarcolemal, pois se encontra nessa região das fibras musculares. São essas proteínas sub-sarcolemas que agregam mecanicamente a unidade contrátil do músculo à membrana plasmática, prevenindo danos ao sarcolema (TUSNÁDY & SIMON, 1998). A literatura não apresenta nenhum trabalho que discute a possibilidade da ligação de mercúrio à *Keratin. type II cytoskeletal 8*. No entanto, como essa proteína apresenta resíduos de leucina, arginina e isoleucina com grupos carboxílico e amino terminais que apresentam sítios de ligações para metais divalentes, podem formar ligações com íons como Hg^{2+} (GARCIA et al., 2006; TUSNÁDY & SIMON, 1998). Essas ligações, mesmo não sendo específicas, caracterizam uma proteína *metal-binding*, não configurando o mercúrio como um cofator metálico (GARCIA et al., 2006). O *spot* JH6 de tecido hepático de jaraqui foi caracterizado como sendo essa proteína com mercúrio incorporado em sua estrutura. Como esse *spot* não apresentou expressão significativa, mesmo considerando que os dados obtidos por GFAAS demonstraram que existe relação estequiométrica com o mercúrio, este *spot* não apresenta características de biomarcador de mercúrio.

4.9.1. - Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1

Metaloenzima de zinco envolvida na regulação do metabolismo da homocisteína, e apresenta mais de uma isoforma. Encontra-se exclusivamente no fígado e no rim de animais e humanos. Converte betaína e dimetilglicina homocisteína em metionina, e participa também da reação de oxidação irreversível da colina (GONZALEZ et al., 2004). A *Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1*, por apresentar zinco ligado aos sítios de coordenação formados por grupos tióis de cisteínas da sequência peptídica, pode ter a incorporação de íons Hg^{2+} (ácido mole, como

o Zn^{2+}) nesses sítios de coordenação (GARCIA et al., 2006; PEARSON et al., 1963; GONZALEZ et al., 2004). O *spot* FH6 de tecido hepático de filhote foi caracterizado como sendo essa metaloenzima com mercúrio incorporado em sua estrutura. Mesmo apresentando intensidade média, as características de base mole e a comprovação da existência de relação estequiométrica mercúrio/spot proteico, é possível inferir que o *spot* FH6 pode ser candidato a biomarcador de mercúrio.

4.9.2. - Zinc finger and BTB domain containing protein 24

Proteína localizada no núcleo das células e que apresenta um domínio *zinc finger* (dedo de zinco) como fator de transcrição, e apresenta mais de uma isoforma monomérica (URRUTIA, 2013). Como outras proteínas que apresentam esse fator de transcrição, a *Zinc finger and BTB domain containing protein 24* apresenta o domínio KRAB (caixa de Kruppel associated). As funções propostas para essa proteína, e outras da sua classe, incluem a repressão da transcrição da RNA polimerase I, II e III, além de promover ligação *splicing* do RNA e pode atuar também na manutenção da proliferação de diferenciação celular e transformação neoplásica (URRUTIA, 2013). O zinco encontra-se coordenado na *Zinc finger and BTB domain containing protein 24* por meio dos grupos tióis de dois resíduos de histidina e cisteína, possibilitando um dobramento no domínio *zinc finger* e tornando possível a interação dessa proteína com o DNA (URRUTIA, 2013). A presença de cisteína (base mole) em sua sequência peptídica pode favorecer a ligação de íons Hg^{2+} (ácido mole) (GARCIA et al., 2006; PEARSON et al., 1963]. O *spot* TH7 de tecido hepático de tucunará foi caracterizado como sendo essa proteína com mercúrio incorporado em sua estrutura. Esse *spot* apresenta intensidade significativa e os dados obtidos por GFAAS demonstraram que existe relação estequiométrica com o mercúrio, o que o qualifica como candidato à biomarcador de mercúrio.

4.9.3. - Dual specificity protein phosphatase 22-B

Enzima fosfatase que ativa a via de sinalização JNK, onde desfosforila e desativa a p38 e ativa o estresse da proteína quinase/c-Jun N-terminal quinase (SAPK/JNK). Apresenta isoforma monomérica, mas normalmente é um dímero (DENHARDT, 1996). Como todas as fosfatases, participa de mecanismos catalíticos por meio de resíduos de histidina e cisteína ligados covalentemente com o grupo fosfato (DENHARDT, 1996; GIVANT-HORWITZ et al., 2004). A presença de cisteína (base mole) na sequência peptídica da *Dual specificity protein phosphatase 22-B* pode coordenar íons com características de ácido mole, como o Hg^{2+} (GARCIA et al., 2006; PEARSON ET AL., 1963). O *spot* TH11 de tecido hepático de tucunará foi caracterizado

como sendo essa enzima com mercúrio incorporado em sua estrutura. Esse *spot* apresenta intensidade significativa e os dados obtidos por GFAAS demonstraram que existe relação estequiométrica com o mercúrio, o que o qualifica como candidato à biomarcador de mercúrio.

4.9.4. - N – Terminal Xaa – Pro – Lys N – Methyltransferase 1

Enzima que participa da metilação do N-terminal de proteínas alvo que contém a sequência (Ala/Pro/Ser)-Pro-Lys, quando o iniciador metil é clivado. Também chamada de *alfa-N-metiltransferase*, participa durante a mitose da formação do fuso bipolar normal e da segregação dos cromossomos agindo sobre os genes RCC1 (VLIEGHE et al., 2010). Sua estrutura é formada principalmente por sequências peptídicas de alanina, lisina, prolina e serina, mas apresenta um ligante S-adenosil-L-metionina (VLIEGHE et al., 2010). Essa enzima foi caracterizada no *spot* FH9 de tecido hepático de filhote, com intensidade significativa. A presença em sua estrutura de ligantes com metionina (base mole) pode favorecer a ligação de íons Hg^{2+} (ácido mole) (GARCIA et al., 2006; PEARSON ET AL., 1963). Além disso, também apresentou relação estequiométrica com mercúrio, apresenta assim características necessárias para atuar como uma possível candidata a biomarcador de mercúrio.

4.9.5. - Macoilin-2

Com mais de uma isoforma, essas proteínas são caracterizadas por diversos domínios transmembranas específicos do sistema nervoso e altamente conservados em relação ao N-terminal e por regiões de espiral enrolada no C-terminal. A *Macoilin-2* ainda foi pouco estudada e os trabalhos da literatura apresentam o seu proteoma em relação a vermes presentes no tecido hepático (IMIELINSK et al., 2012). Alguns estudos mostram que essa proteína pode atuar na troca transiente de íons Ca^{2+} em alguns neurônios (IMIELINSK et al., 2012). A sequência peptídica dessa proteína apresenta principalmente resíduos de alanina, glutamina, arginina e lisina em sua estrutura (IMIELINSK et al., 2012). A incorporação de íons metálicos com características de ácidos moles pela *Macoilin-2* até o momento não foi discutida na literatura e a sequência peptídica dessa proteína não apresenta resíduos de aminoácidos com sítios de base mole, como a metionina e a cisteína. O *spot* FH7 de tecido hepático de filhote foi caracterizado como sendo uma isoforma dessa proteína e com intensidade significativa, no entanto, conforme relata a literatura, essa proteína é encontrada em vermes que podem estar presentes no fígado de organismos, o que dificulta a atuação dessa proteína como biomarcador no presente estudo, já que estes vermes podem ou não estar presentes no fígado dos peixes em estudo.

5. CONCLUSÕES

O uso da 2D-PAGE como componente de seletividade no fracionamento de proteínas mostrou bastante eficiente neste trabalho, separando com eficácia uma vasta quantidade de *spots* proteicos por gel das espécies de peixes estudada. A espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, como ferramenta componente de sensibilidade demonstrou ser uma técnica robusta e permitiu quantificações do mercúrio presente nas amostras de extratos proteicos, *pellets* e *spots* proteicos.

A análise das imagens dos géis de eletroforese 2D-PAGE e a quantificação do mercúrio nos extratos proteicos de massas >50 e <50 kDa, permitiu concluir que o mercúrio encontra-se ligado em proteínas de baixo massa molar, já que nos extratos de massa molar maior que 50 kDa não foi detectado a presença de mercúrio.

As relações de átomos de mercúrio por moléculas de proteínas, considerando a intensidade dos *spots* no gel e, caracterização destes por espectrometria de massas (ESI-MS) permite inferir que há uma grande possibilidade do uso destas proteínas e/ou enzimas como biomarcadoras de mercúrio em peixes.

As proteínas encontradas nos *spots* proteicos de jaraqui, tucunaré e filhote possuem grandes possibilidades de serem candidatas a biomarcadoras de mercúrio em peixes foram: 39S Ribosomal protein L36 mitochondrial, (*spot* 07 jaraqui); Parvalbumin, (*spots* 1 e 2 jaraqui e 1 e 2 tucunaré); Ubiquitin - 40S ribosomal protein S27a, (*spots* 5 jaraqui, 9 e 10 tucunaré e 5 filhote); Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1, (*spot* 6 filhote); Zinc finger and BTB domain containing protein 24, (*spot* 7 tucunaré); Dual specificity protein phosphatase 22-B, (*spot* 11 tucunaré). Estes *spots* proteicos além de apresentarem relação estequiométrica entre os átomos de mercúrio por moléculas de proteína, apresentaram intensidade significativa nos géis, reforçando ainda mais a possibilidade do uso dessas proteínas como possíveis biomarcadoras de mercúrio em peixes da região da AHE-JIRAU/Porto Velho - Rondônia.

De forma geral, os resultados obtidos podem ser considerados inéditos, considerando os peixes amazônicos estudados, constituindo o *start* inicial de estudos metalaproteômicos relacionados com a toxicidade de mercúrio em peixes. Os *spots* proteicos caracterizados e que apresentaram características de biomarcador poderão ser utilizados no acompanhamento, em nível proteômico, das concentrações de mercúrio nas espécies de peixes estudadas após a total inundação do complexo hidrelétrico da Usina de Jirau, que até o momento ainda não aconteceu.

Entretanto, um acompanhamento onde possa dispor de um período de monitoramento mais prolongado dessas proteínas, deve ser levado em consideração.

6. BIBLIOGRAFIA

- AFONSO, C.; LOURENÇO, H. M.; PEREIRA, C.; MARTINS, M. F.; CARVALHO, M. L.; CASTRO, M.; NUNES, M. L. Total and organic mercury, selenium and α -tocopherol in some deep-water fish species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 2543-2550, 2008.
- AMORIM, I. A.; COSTA, M. M.; ANDRADE, R. T. G.; LINHARES, J. M. S.; BASTOS, W. R. Concentração de mercúrio em tecido musculares de peixes com diferentes hábitos alimentares no reservatório da UHE-Samuel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL, 3., 2012, Goiânia. **Anais...** Bauru: IBEAS - Instituto Brasileiro de Estudos Ambientais, 2012.
- APPLIED BIOSYSTEMS (Org.). **Espectrometria de massas e suas aplicações**. São Paulo: Abi Expert Training Center, 2005. p. 40.
- ASCHNER, M. The neuro-toxic mechanisms of fish-borne methylmercury. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 2, p. 101-104, 2002.
- BANCO de dados de proteínas. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/>>. Acesso em: 14 fev. 2012.
- BAATRUP, E. The structural and functional effects of heavy metals on the nervous system including sensory organs of fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 100, p. 253-257, 1991.
- BAKIR, F.; DAMBUJI, S. F.; AMIN-ZAKI, L.; MURTHADA, M.; KHALIDI, A.; AL-RAWI, N. Y.; TIKRITE, S.; DHAHIR, H. I.; CLARKSON, T. W.; SMITH, J. C.; DOHERTY, P. A. Methylmercury poisoning. **Science**, v. 181, n. 4096, p. 230-236, 1973.
- BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ZARZ, L. F.; ROCHA, J. C.; SANTOS, A. Programa de monitoramento hidrobiogeoquímico do AHE JIRAU – Bacia do Rio Madeira. **TectebelEnergia**, 2009.
- BASTOS, W. R.; REBELO, M. F.; FONSECA, M. F.; ALMEIDA, R.; MALM, O. A Description of mercury in fishes from the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 38, p. 431-438, 2008.
- BAYNES J. W.; DOMINICZAK, M. H. Bioquímica Médica. Rio de Janeiro, **Elsevier Editora**, 2011.
- BEBIANNO, M. J.; SANTOS, C.; CANÁRIO, J.; GOUVEIA, N.; SENA-CARVALHO, D.; VALE, C. Hg and metallotionein-like proteins in the black scabbardfish *Aphanopus carbo*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1443-1452, 2007.

- BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 273-281, 2003.
- BERBEL, P.; MARCO, P.; CEREZO, J. R.; FELIPE, J. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the neocortex of hypothyroid adult rats. **Neuroscience Letters**, v. 204, p. 65-68, 1996.
- BERKLMAN, T.; STENSTEDT, T. **2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods**. Uppsala: **Amersham Biosciences**, 1998.
- BLINDAUER, C. A.; Harvey, I.; Bunyan, K.E.; STEWART, A.J.; SLEEP, D.; HARRISON, D.J.; BEREZENKO, S.; SADLER, P.J. Structure, properties and engineering of the major zinc binding site on human albumin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 34, p. 23116-23124, 2009.
- BRABO, E. S.; SANTOS, E. O.; JESUS, I. M.; MASCARENHAS, A. F.; FAIAL, K. F. Mercury levels in fish consumed by the Sai Cinza indigenous community, Munduruku Reservation, Jacareacanga County, State of Para, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, n. 15, p. 325-331, 1999.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/aquiculturampa/informacoes/potencial-brasileiro>>. Acesso em: Ago. 2013.
- BRANDEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. New York: Garland, p. 410, 1999.
- CHANG, C. C.; LEE, S. F.; SUN, K. W.; HO, C. C.; CHEN, Y. T.; CHANG, C. H.; KAN, L. S. Mn,Cd-metallothionein-2: a room temperature magnetic protein. **Biochem. Biophys. Res.**, v. 340, p. 1134-1138, 2006.
- CHEVALIER, C.; QUERREC, F. L.; CHEVALIER, P. R. C.; QUERREC, F. L.; RAYMON, P. Sugar levels regulate encoding protein S28 the expression of ribosomal protein genes and ubiquitin-fused protein S27a in maize primary root tips. **Plant Science**, v. 117, p. 95-105, 1996.
- CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, p. 609-662, 2006.
- COUTO, R. C. S. **Hidrelétricas e Saúde na Amazônia: um estudo sobre a tendência da malária na área do lago da Hidrelétrica de Tucuruí, Pará**. 1996. 208 f. Tese (Doutorado) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1996.

CREIGHTON, T. E. (Ed.). Protein: structure and molecular properties. 2a. ed. New York: W. H. **Freeman and Company**, 1993.

CREIGHTON, T. E. Protein structure: a practical approach. **Oxford: IRL Press**, 1989.

CRESPO-LÓPEZ, M. E.; MACÊDO, G. L.; PEREIRA, S. I. D.; ARRIFANO, G. F. A.; HERCULANO, A. M.; D. PICANÇO-DINIZ, D. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacology Research**, v. 60, p. 212-220, 2009.

DENHARDT, D.T. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. **Biochemical Journal**, v. 318, p. 47-53, 1996.

DEVLIN, T. M. **Textbook of biochemistry with clinical correlations**. 4. ed. New York: Wiley-Liss, 1997.

Disponível em: <<http://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2012/VIII-016.pdf>>. Acesso em: 2013.

DOOLITTLE, R. F. The multiplicity of domains in proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 287-314, 1995.

DUVE, C. Blueprint for cell: the nature and origin of life. North Caroline: Caroline **Biological Supply Co.**, 1991.

ESCOBAR, H.; MIRANDA, L. Depois do genoma, a corrida pelo proteoma. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 13 fev. 2001.

FADINI, P. S.; JARDIM, W. F. Is the Negro river basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury. **Science and Total Environmental**, v. 275, p. 71-82, 2001.

FARO, F. R. L. **Efeitos do mercúrio sobre a liberação de dopamina no núcleo estriado de ratos**: possíveis mecanismos de ação e proteção. 2000. p. 164 Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2000.

Filhote. Disponível em: < www.pescaeolution.com>. Acessado em: 15 de dez. 2013.

FINDLAY, J. B.; GEISOW, M. J. (Eds.). **Protein sequencing**: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1989.

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

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

GIVANT-HORWITZ, V.; DAVIDSON, B.; GODERSTAD, J. M.; JAHN, M.; NESLAND, J. M.; TROPÉ, C. G.; REICH, R. The PAC-1 dual specificity phosphatase predicts poor outcome in serous ovarian carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 93, p. 517-523, 2004.

GÓMEZ-ARIZ, J. L. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, n.1-2, p. 15-22, 2004.

GONZALEZ, B.; PAJARES, M. A.; RIPOLL, M.; BLUNDELL, T. L.; SANZ-APARICIO, J. Crystal structure of rat liver betaine homocysteine s-methyltransferase reveals new oligomerization features and conformational changes upon substrate binding. **Journal of Molecular Biology**, v. 338, p. 771-782, 2004.

GORG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH. **Electrophoresis**, v. 21, n.6, p. 1037-1056, 2000.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, 2004.

GROSS, J. Electrospray ionization. In: GROSS, J. Mass spectrometry: a textbook. 2. ed. Philadelphia: **Springer**, 2011. p. 560-620.

GUERRERA, I. C.; KLEINER, O. Application of mass spectrometry in proteomics. **Bioscience Reports**, v. 25, n. 1-2, p. 71-93, 2005.

GUO, T. L.; MILLER, M.; SHAPIRO, I. M.; SHENKER, B. J. Mercuric chloride induces apoptosis in human T Lymphocytes: evidence of mitochondrial dysfunction. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 153, p. 250-257, 1998.

HAMER, D. H. Metallothionein. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 55, p. 913-951, 1986.

HAMMERSCHMIDT, C. R.; FITZGERALD, W. F. Photodecomposition of methylmercury in an arctic Alaskan lake. **Environ. Sci. Technol.**, v. 40, p. 1212-1216, 2006.

HAMMERSCHMIDT, C. R.; FITZGERALD, W. F. Iron mediated photochemical decomposition of methylmercury in an arctic Alaskan lake. **Environ. Sci. Technol.**, v. 44, p. 6138- 6143, 2010.

HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, p. 5-14, 2004.

HARRISON, J. A. A importância regional e global de remoção de nitrogênio em lagos e reservatórios. **Biogeoquímica**, v. 93, p. 143-157, 2009.

HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. Mass spectrometry: principles and applications. 3. ed. West Sussex, England: **Wiley-Interscience**, 2007. p. 502.

HOLM, L.; SANDER, C. Mapping the protein universe. **Science**, v. 273, p. 595-602, 1996.

HOLMES, J., LEAN, D. Factors that influence methyl mercury flux rates from wetland sediments. **Sci. Total Environ.**, v. 368, p. 306-319, 2006.

HSU-KIM, H.; KUCHARZYK, K. H.; ZHANG, T.; DESHUSSES, M. A. Mechanisms Regulating Mercury Bioavailability for Methylating Microorganisms in the Aquatic Environment: A Critical Review. **Environ. Sci. Technol.**, n. 47, p. 2441-2456, 2013.

HYLANDER, L. D.; MEILI, M.; OLIVEIRA, L. J.; CASTRO E SILVA, E.; GUIMARÃES, J. R. D.; ARAUJO, D. M. Relationship of mercury with aluminum, iron and manganese oxy-hydroxides in sediments from the Alto Pantanal, Brazil. **Sci. Total Environ.**, v. 260, p. 97-107, 2000.

IMIELINSK, M.; BERGER, A. H.; HAMMERMAN, P. S.; HERNANDS, B.; PUGH, T. J.; HODIS, J. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. **Cell**, v. 150, p. 1107-1120, 2012.

IPOLY, I.; MASSANISSO, P.; SPOSATO, S.; FODOR, P.; MORABITO, R. Concentrations of total mercury and methyl in mussel samples collected along the coasts of the island of Sardinia (Italy). **Anal. Chim. Acta**, v. 505, p. 145-151, 2004.

IVANOVA, E. H. Atomic Absorption Spectrometry. In: TOWNSEND, A.; POOLE, C. F.; WORSFOLD, P. J. **Encyclopedia of analytical science**. 2a. ed. New York: Academic Press, 2005. p. 149-156.

JAMES, H. W. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury (II) in the aquatic environment. **Chemosphere**, v. 26, p. 2063-2077, 1993.

Jaraqui. Disponível em: <www.rondonoticias.com.br>. Acessado em: dez de 2014.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecol. Bras.**, v. 12, p. 680-693, 2008.

- KAGI, J. H. R.; SCHAFFER, A. Biochemistry of metallothionein. **Biochemistry**, v. 27, p. 8509-8515, 1988.
- KAGI, W. M.; KAGI, J. H. R.; HUNZIKER, P. E. Resolution and quantification of four metallothionein isoforms from rabbit kidney cells. Protein expression and purification. **Braz. Mar. Biol.**, v. 4, p. 38-44, 1993.
- KARPLUS, M.; PETSKE, G. A. Molecular dynamics simulations in biology. **Nature**, v. 347, p. 631-639, 1990.
- KAZMI, S.; KRULL, I. S. Proteomics and the current state of protein separations science, part one. **Pharma Genomics**, p. 14-29, 2001.
- KLITZKE, C. F. **Técnicas de ionização**. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=4&codassunto=19&numero=2>>. Acesso em: 5 jun. 2012.
- KNOWLES, T. G.; FARRINGTON, D.; KESTIN, S. C. Mercury in UK imported fish and shellfish and UK-farmed fish and their products. **Food Addit. Contam.**, v. 20, p. 813-818, 2003.
- KÜTTER, B. V. T.; MONTES-BAYÓN, M.; SELLA, S. M.; SILVA-FILHO, E. V. Determinação de metalotioneínas e fitoquelatinas utilizando a técnica de HPLC-ICP-MS. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 612-622, 2012.
- LANÇAS, F. M.; SILVA, J. C. R.; BICUDO, R. C.; NETO, B. M. A química analítica do proteoma. **Analytica**, v. 6, p. 60-66, 2003.
- LEBEL, J.; MERGLER, D.; RAMOS, F.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M.; LARRIBE, F.; DOLBEC, J. Neurotoxic effects of methylmercury contamination in the Amazonian Basin low level. **Environ. Res.**, v. 79, p. 20-32, 1998.
- LEMOES, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M.; CORREIA, A. C.; ESTEVES, A. C. Proteins in ecotoxicology - how, why and why not? **Proteomics**, v. 10, p. 873-887, 2010.
- LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; SANTOS, F. A.; PEREZ, C. A.; DA SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA P. M. Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SR XRF and FAAS after 2D PAGE separation: Preliminary results. **Talanta**, v. 82, p. 1052-1056, 2010.
- LIN, C. C.; YEE, N.; BARKAY, T. Microbial transformations in the mercury cycle. In: _____. **Química ambiental e toxicologia de mercúrio**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, p. 155-191, 2012.

- LINDBERG, S.; BULLOCK, R.; EBINGHAUS, R.; ENGSTROM, D.; FENG, XB; FITZGERALD, W.; PIRNONE, N.; PRESTBO, E.; SEIGNEUR, C. The synthesis of progress and uncertainties attributing the sources of mercury in deposition. **Ambio**, v. 36, p. 19-32, 2007.
- LOBINSKI, R.; MOULIN, C.; ORTEGA, R. Imaging and speciation of trace elements in biological environment. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1591-1604, 2006.
- MAILMAN, M.; STEPNUK, L.; CICEK, N.; BODALY, R. A. Strategies to lower concentrations of methyl mercury in hydroelectric reservoirs and lakes: a review. **Sci. Total Environ.**, v. 368, p. 224-235, 2005.
- MAILMAN, M.; STEPNUK, L.; CICEK, N.; BODALY, R. A. Strategies to lower methyl mercury concentrations in hydroelectric reservoirs and lakes: A review. **Sci. Total Environ.**, v. 368, p. 224-235, 2006.
- MANJULI, R.; SHARMA, M. R.; KOC, E. C.; DATTA, P. P.; BOOTH, T. M.; SPREMULLI, L. L.; AGRAWAL, R. K. Structure of the Mammalian Mitochondrial Ribosome Reveals an Expanded Functional Role for Its Component Proteins. **Cell**, v. 115, p. 97-108, 2008.
- MANSO, M. A. Application of proteomics to the characterization of milk and dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6-9, p. 845, 2005.
- MARQUES, R. C.; BERNARDI, J. V. E.; DÓREA, J. G.; BRANDÃO, K. G.; BUENO, L.; LEÃO, R. S.; MALM, O. Fish consumption during pregnancy, mercury transfer, and birth weight along the Madeira River basin in Amazonia. **Int. J. Environ.**, n. 10, p. 2150-2163, 2013.
- MARSHAL, W. D. Atomic absorption, emission and fluorescence spectrometry: principles and applications. In: PARÉ, J. R. J.; BÉLANGER, J. M. R. **Instrumental methods in food analysis**. Amsterdam: Elsevier Science, 1997. p. 141-178.
- MELLENDEZ, B.; KÜTTER, V. T.; MONTES-BAYÓN, M.; SELLA, S. M.; SILVA-FILHO, E. V. Determinação de Metalotioneínas e Fitoquelatinas utilizando a técnica de HPLC-ICP-MS. **Revista Virtual de Química**, v. 4, p. 612-622, 2012.
- MELA, M.; RANDI, M. A.; VENTURA, D. F.; CARVALHO, C. E.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Efeitos do metilmercúrio na dieta sobre histologia hepática e renal no peixe neotropical Hoplias malabaricus. **Ecotoxicol. Ambiente Saf.**, v. 68, p. 426-435, 2007.
- MELA, M.; CAMBIER, S.; MESMER-DUDONS, N.; LEGEAY, A.; GRÖTZNER, S. R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Location methylmercury in Danio rerio retina after trophic and subchronic exposure: the basis for neurotoxicology. **Neurotoxicology**, v. 31, p. 448-453, 2010.
- MELA, M.; NETO, F. F.; YAMAMOTO, F. Y.; ALMEIDA, R.; GRÖTZNER, S. R.; VENTURA, D. F.; RIBEIRO, C. A. O. Distribution of mercury in target organs and

biochemical responses after trophic and subchronic exposure of Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Springer Sci.**, v. 13, p. 250-262, 2013.

MELLENDEZ, B.; KÜTTER, V. T.; MONTES-BAYÓN, M.; SELLA, S. M.; SILVA-FILHO, E. V. Determinação de metalotioneínas e fitoquelatinas utilizando a técnica de HPLC-ICP-MS. **Rev. Virtual Quím.**, v. 4, p. 612-622, 2012.

MINIERO, A. R.; BECCALONI, E.; CAREREA, M.; UBALDI, A.; MANCINI, L.; MARCHEGIANI, S.; CICEROA, M. R.; SCENATI, R.; LUCCHETTI, D.; ZIEMACKI, G.; DE FELIPA, E. Mercury (Hg) and methyl mercury (MeHg) concentrations in fish from the coastal lagoon of Orbetello, central Italy. **Mar. Poll. Bull.**, v. 76, p. 365-369, 2013.

Ministério da Pesca e Aquicultura, Disponível em: <
<http://www.mpa.gov.br/aquiculturampa/informacoes/potencial-brasileiro>>. Acesso em:
agosto de 2013.

MOORE, J. W.; RAMAMOORTHY, S. Heavy metals in natural waters. New York: **Springer-Verlag**, 1984. p. 125-160.

MORAES, P. M.; SANTOS, F. A.; CAVECCI, B.; PADILHA, C. C. F.; VIEIRA, J. C. S.; ROLDAN, P. S.; PADILHA, P. M. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2614-2617, 2013.

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n.4, p.1119-1138, 2009.

NEVADO, J. J. B.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R. C. R.; BERNARDO, F. J. G.; MORENO, M. J.; HERCULANO, A. M.; NASCIMENTO, J. L. M.; CRESPO-LÓPEZ, M. E. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: a review. **Environ. Int.**, v. 36, p. 593-608, 2010.

NEVES, R. C. F.; LIMA, P. M.; BALDASSINI, W. A.; SANTOS, F. A.; MORAES, P. M.; CASTRO, G. R.; PADILHA P. M. Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo. **Química Nova**, v. 35, p. 493-498, 2012.

NEWMAN, T. A. The role of mass spectrometry in proteome studies. **Biomolecular Engineering**, v. 18, p. 221-227, 2001.

NORDBERG, M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. **Talanta**, v. 46, p. 243-254, 1998.

O'DONNELLA, R. Milk proteomics. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 12, p. 1013-1023, 2004.

OFFER, G.; MOOS, C.; OFFER, R. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils: extraction, purification and characterization. **Journal of Molecular Biology**, v. 74, p. 653-676, 1993.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; BELGER, L.; PELLETIER, É.; ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environ. Res.**, v. 90, p. 217-225, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FILIPACK NETO, F.; MELA, M.; SILVA, P. H.; RANDI M. A. F.; COSTA, J. R. A. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environ. Res.**, v. 101, p. 74-80, 2006.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ROULEAU, C.; PELLETIER, É.; AUDET, C.; TJALVE, H. Kinetics of distribution of methylmercury in the diet of arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Ambiente Sci.**, v. 33, p. 902-907, 1999.

ONG, S. E.; PANDEY, A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. **Biomolecular Engineering**, v. 18, n. 5, p. 195-205, 2001.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 3533-3539, 1963.

PFEIFFER, W. C.; LACERDA, L. D.; SALOMONS, W.; MALM, O. Environment fate of mercury from gold mining in the Brazilian Amazon. **Environmental Reviews**, v. 1, p. 26-37, 1993.

PIRRONE, N.; CINNIRELLA, S.; FENG, X.; FINKELMAN, R. B.; FRIEDLI, H. R.; MAIS MAGRO, J.; MASON, R.; MUKHERJEE, A. B.; STRACHER, G. B.; RUAS, D. G.; TELMER, K. Global mercury emissions to the atmosphere from natural and anthropogenic sources Atmos. **Chem. Phys.**, v. 10, p. 5951-5964, 2010.

POLLARD, K. M.; HULTMAN, P. Effects of mercury on the immune system. **Metal Ions Biol. Syst.**, v. 34, p. 421-440, 1997.

POZZI, C. M. C. **Análise metaloproteômica de cálcio, ferro e zinco em colostro, leite de transição e leite maduro humanos**. 2012. 8-16 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP, São Paulo, 2012.

PROTEÍNAS. **Classificação estrutural**. Disponível em: <<http://www.proweb.org/>>. Acesso em: 23 fev. 2012.

PROTEÍNAS. **Informações gerais.** Disponível em: <<http://www.expasy.ch/>>. Acesso em: 27 fev. 2012.

QIU, G.; FENG, X.; WANG, S.; FU, X.; SHANG, L. Mercury distribution and speciation in water and abandoned fish Wanshan Hg mine in Guizhou Province, China. **Sci. Total Environ.**, v. 407, p. 5162-5168, 2009.

QUEIROZ, M. L.; BINCOLETO, C.; QUADROS, M. R.; De CAPITANI, E. M. Presence of Micronuclei in Lymphocytes of Mercury Exposed Workers. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 21, p. 141-150, 1999.

RABITTO, I. S.; BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ANJOS, A.; BARBOSA DE HOLANDA, I. B.; GALVÃO, R. C. F. Mercúrio e risco de exposição ao DDT peixes comedores de populações humanas na Amazônia. **Ambiente Int.**, v. 7, p. 56-65, 2011.

RHODES, G. **Crystallography made clear.** London: Ademic Press, 1993.

RISON, S. C. G.; HODGMAN, T. C.; THORNTON, J. M. Comparison of functional annotation schemes for genomes. **Functional & Integrative Genomics**, v. 1, p. 56-69, 2000.

ROESIJADI, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. **Aquat. Toxicol.**, v. 22, p. 81-114, 1992.

ROMANOWSKI, S. M. M.; MANGRICH, A. S.; NEVES, A. Síntese e caracterização de novos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes não-simétricos N,O-doadores: contribuições para o sítio ativo da galactose oxidase. **Quím. Nova**, v. 24, p. 592-598, 2001.

ROST, B.; SANDER, C. Bridging the protein-sequence-structure gap by structure predictions. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 25, p. 113-136, 1996.

ROTHENBERG, S. E.; AMBROSE, R. F.; JAY, J. A. Mercury cycling in surface water, pour water and sediments of Mugu Lagoon, CA, USA. **Environmental Pollution**, v. 154, p. 32-45, 2008.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; SAINT-AUBIN, A.; TRAN, S.; RHÉAULT, I.; FARELLA, N. The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chão formation of the lower Tapajós River Valley, Pará state, Brazil. **Sci. Total Environ.**, v. 223, p.1-24, 1998.

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

- SCHETAGNE, R.; DOYON, J. F.; FOURNIER, J. J. Export of mercury downstream from reservoirs. **Sci. Total Environ.**, v. 260, p. 135-145, 2000.
- SCUDDER, B. C.; CHASER, L. C.; WENTZ, D. A.; BAUCH, N. J.; BRIGHAM, M. E.; MORAN, P. W. Mercury in fish, bed sediment, and water streams in the United States. **Reston**, v. 74, p. 1998-2005, 2009.
- SHENKER, B. J.; GUO, T. L.; SHAPIRO, I. M. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. **Environ. Res.**, v. 84, p. 89-99, 2000.
- SICILIANO, S. D.; O'DRISCOLL, N. J.; TORDON, R.; COLINA, J.; BEAUCHAMP, S.; MAGRA, D. R. S. Abiotic production of methylmercury by solar radiation. **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, p. 1071-1077, 2005.
- SILVA JUNIOR, J.G. Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático. **Interciência**, p. 256-126, 2001.
- SILVA, F. A.; NEVES, R. C. F.; QUINTERO-PINTO, L. G.; PADILHA, C. C. F.; JORGE, S. M.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; PADILHA, P. M. Determination of selenium by GFAAS in feces slurries of fish to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used for fish. **Chemosphere**, v. 68, p.1542-1547, 2007.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, S. R. **Principles of instrumental analysis**. 5. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1998.
- SOUZA, J. R.; BARBOSA, A. C. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. **Quím. Nova**, n. 12, p. 420-422, 2000.
- STANLEY, E. H.; DOYLE, M. W. Trading off: the ecological effects of dam removal removing front. **Ecol. Environ.**, v. 1, p. 15-22, 2003.
- SYKES, E.; GRZYCH, C.; EPSTEIN, E.; KIECHLE, F. L. **Dextran interference in biuret-based assays for serum proteins**. **Clinical Chemistry**, v. 33, p. 1073, 1987.
- SZATHMÁRY, E.; SMITH, J. M. The major evolutionary transitions. **Nature**, v. 374, p. 227-232, 1995.
- SZPUNAR, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. **Analyst**, v. 130, n. 4, p. 442-465, 2005.

SZPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 1, p. 54-56, 2008.

TAKASE I.; PEREIRA H. B.; LUNA A. S.; GRINBERG P.; CAMPOS R. C. A geração química de vapor em espectrometria atômica. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1132-1144, 2002.

TESSIER, C.; BLAIS, J. S. Determination of cadmium-metallothioneins in zebra mussels exposed to subchronic Concentrations of Cd^{2+} . **Ecotox. Environ. Saf.**, v. 33, p. 246-252, 1996.

TUBAKI, R. M.; MENEZES, R. M. T.; CARDOSO JUNIOR, R. P. Estudos em monitoramento entomológico: mudanças na frequência de mosquitos em habitats ripários da usina hidroelétrica de Igarapava, Sudeste do Brasil. **Rev. Inst. Med.**, v. 46, p. 223-229, 2004.

Tucunaré. Disponível em: <www.cpt.com.br>. Acesso em: 10 nov. 2013.

TUOMOLA, L.; NIKLASSON, T.; SILVA, E. C.; HYLANDER, L. D. Fish mercury development in relation to abiotic characteristics and carbon sources in a six-year-old, Brazilian reservoir. **Sci. Environ.**, v. 390, p. 177-187, 2008.

TUSNÁDY, G. E.; SIMON, I. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. **Journal of Molecular Biology**, v. 283, p. 489-506, 1998.

UNIFESP. Laboratório de Proteômica. **Gel bidimensional**. Disponível em: <<http://www.unifesp.br/centros/proteomica/servicos-e-equipamentos>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Centro de Biotecnologia. Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS). Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/uniproteins/Content/02PrincipiosDeAnalise/espectrometria.html>>. Acesso em: jun. 2013.

URRUTIA, R. KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. **Genome Biology**, v. 231, n. 4, p. 1-8, 2013.

VALLEE, B. L. Metallothionein historical review and perspectives. In: KAGI, J. H. R.; NORDBERG, M. (Eds.). **Metallothionein**. Switzerland: Birkhauser, 1979. p. 19-40.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; DONDERO, F.; MARRO, A.; FABBRI, R. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. **Biomarkers**, v. 4, p. 455-466, 1999.

VIARENGO, A.; CANESI, L. Mussels as biological indicators of pollution. **Aquaculture**, v. 94, p. 225-243, 1991.

- VIARENGO, A.; NOTT, J. A. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 104, p. 355-372, 1993.
- VIARENGO, A.; PONZANO E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for methallothionein evaluations in marine organisms: an application to mediterranean and antartic molluscs. **Marine Environmental Research**, v. 44, p. 69-84, 1997.
- VIEIRA, L. M.; NUNES, S. V.; CAMPOS, C. R. Níveis de mercúrio total na carne de peixes como indicadores de contaminação em sistema aquáticos do Pantanal. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SOCIOECONÔMICOS DO PANTANAL. 4., 2004, Corumbá. **Anais...** Corumbá, 2004.
- VIEIRA, S. M.; ALMEIDA, R.; HOLANDA, I. B. B.; MUSSY, M. H.; GALVÃO, R. C. F.; CRISPIM, P. T. B.; DÓREA, J. G.; BASTOS, W. P. Total and methyl-mercury in hair and milk of mothers living in the city of Porto Velho and in villages along the Rio Madeira, Amazon, Brazil. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 6, p. 216, 2013.
- VILLAR, L. S. **Otimização de metodologia para extração e determinação de metalotioneínas por eletroforese em gel de poliacrilamida de ostras *crassostrea rhizophorae* (goulding, 1828) para aplicação em estudos ambientais**. 2006. 6-8 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2006.
- VLIEGHE, P.; LISOWSKI, V.; MARTINEZ, J.; KHRESTCHATISKY, M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 40-56, 2010.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: ArteMed, 2002.
- VOLKENSTEIN, M. V. **Physical approaches to biological evolution**. New York: Springer-Verlag, 1994.
- WAGNER, G.; HYBERTS, S. G.; HAVEL, T. F. NMR structure determination on solution: a critique and comparison with X-ray crystallography. **Annual Review of Biomolecular Structure**, v. 21, p. 167-198, 1992.
- WINE, W. L.; SMITH, B. W.; WINEFORDER, J. D. Trace determination of mercury: a review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, n. 27, p. 1-26, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health Criteria 118: Inorganic mercury. Genebra, 1991.

YONEYAMA, T.; WILSON, L. M.; HATAKEYAMA, K. GTP Cyclohydrolase I feedback regulatory protein-dependent and independent inhibitors of GTP Cyclohydrolase I. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 388, n. 1, p. 67-73, 2001.

7. APÊNDICES

Apêndice I

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA

CONTAGEM DE CRÉDITOS EM ATIVIDADES COMPLEMENTARES

(De acordo com Portaria 12/09-SPG/IBB/UNESP)

Aluno: José Cavalcante Souza Vieira

Nível: (x) Mestrado – mínimo: 05 créditos; () Doutorado – mínimo: 10 créditos

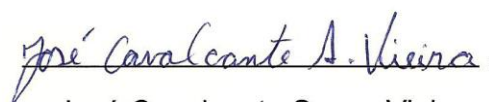
Atividade	Equivalência em créditos	Quantidade	Total de créditos	Número do Anexo
I. ATIVIDADES DE ENSINO (Máximo 03 créditos para o Mestrado e 06 créditos para o Doutorado)				
1. Aulas em curso fundamental ou médio	30 horas = 01 crédito			
2. Aulas em curso de extensão	15 horas = 01 crédito			
3. Aulas em curso superior	15 horas = 01 crédito			
4. Aulas em pós-graduação (como convidado)	04 horas = 01 crédito			
5. Monitoria voluntária	30 horas = 01 crédito			
II. PUBLICAÇÕES (Exigência de cumprimento de no mínimo 02 créditos para o Mestrado e 04 para o Doutorado)				
1. Em periódico científico com índice de impacto igual ou superior à mediana da área de CB-I, subárea GBG (CAPES)	10 créditos	2	20	2
2. Em periódico científico com índice de impacto igual ou superior à 50% da mediana da área de CB-I, subárea GBG (CAPES)	05 créditos			
3. Em periódico científico com índice de impacto menor à 50% da mediana da área de CB-I, subárea GBG (CAPES)	02 créditos			
4. Resumos em eventos científicos internacionais	02 créditos	11	22	14
5. Resumos em eventos científicos nacionais	01 crédito			
6. Resumos em eventos científicos estaduais ou regionais	0,5 crédito	1	0,5	1
7. Resumos em periódico científico com índice de impacto igual ou superior à mediana da área de CB-I, subárea GBG (CAPES)	02 créditos			
8. Resumos em periódico científico com índice de impacto igual ou superior à 50% da mediana da área de CB-I, subárea GBG (CAPES)	02 créditos			

9. Resumos em periódico científico com índice de impacto menor à 50% da mediana da área de CB-I, subárea GBG (CAPES)	01 crédito			
10. Livro (autoria ou co-autoria)	10 créditos			
11. Capítulo de livro (autoria ou co-autoria)	5 créditos			
III. PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS				
(Exigência de cumprimento de no mínimo 02 créditos para o Mestrado e 04 para o Doutorado)				
1. Participação em evento internacional	02 créditos	1	2	1
2. Participação em evento nacional	01 créditos			
3. Participação em evento estadual ou regional	0,5 crédito	1	0.5	1
4. Palestra proferida em evento científico nacional	02 créditos			
5. Palestra proferida em evento científico estadual ou regional	01 créditos			
IV. ESTÁGIOS (Máximo 03 créditos para o Mestrado e 06 créditos para o Doutorado)				
1. No exterior	15 horas = 01 crédito			
2. No país	30 horas = 01 crédito			
V. CURSOS OU MINI-CURSOS ASSISTIDOS (Máximo 03 créditos - Mestrado e 06 - Doutorado)	15 horas = 01 crédito	3	1	3
VI. PALESTRAS ASSISTIDAS (Máximo 03 créditos - Mestrado e 06 - Doutorado)	5 palestras=01 crédito	5	1	5
TOTAL DE CRÉDITOS			47 Créditos	

Botucatu, 11 de novembro de 2013.


Pedro de Magalhães Padilha

(Nome e Assinatura do Orientador)


José Cavalcante Souza Vieira

(Nome e Assinatura do Aluno)

Apêndice II

Exemplo de cálculo para o spot JH1

Dados do Spot JH1:

$$MM = 13,00 \text{ kDa} = 13000 \text{ Da}$$

$$M \text{ proteína} = 0,90 \text{ } \mu\text{g} = 0,9 \times 10^{-6} \text{ g}$$

$$[\text{Hg}]_{\text{spot JH1}} = 25,80 \text{ mg g}^{-1}$$

$$MM_{\text{Hg}} = 200,59 \text{ g mol}^{-1}$$

$$n^{\circ} \text{ Avogadro} = 6,02 \times 10^{23}$$

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

Calculo do número de moléculas de proteínas no spot

$$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ D} \text{ ----- } 1,661 \times 10^{-24} \text{ g} \\ 13000 \text{ Da} \text{ ----- } x \text{ (g)} \end{array} \right\} x = 2,159 \times 10^{-20} \text{ g}$$

$$\left. \begin{array}{l} 2,159 \times 10^{-20} \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ mol} \\ 0,9 \times 10^{-6} \text{ g} \text{ ----- } y \text{ (moléculas)} \end{array} \right\} y = 4,20 \times 10^{13} \text{ moléculas de proteína}$$

Cálculo do número de átomos de mercúrio

$$\left. \begin{array}{l} 25,80 \text{ mg de Hg} \text{ ----- } 1 \text{ g de proteína} \\ Z \text{ (mg)} \text{ ----- } 0,9 \times 10^{-6} \text{ g (m proteína)} \end{array} \right\} z = 2,322 \times 10^{-5} \text{ mg} = 2,322 \times 10^{-8} \text{ g}$$

$$\left. \begin{array}{l} 200,59 \text{ g (MM Hg)} \text{ ----- } 6,02 \times 10^{23} \\ 2,322 \times 10^{-8} \text{ g} \text{ ----- } w \text{ (átomos)} \end{array} \right\} w = 6,971 \times 10^{13} \cong 7,00 \times 10^{13} \text{ átomos de Hg}$$

Relação de átomos de mercúrio por molécula de proteína

$$\frac{n^{\circ} \text{ de átomos de mercúrio}}{n^{\circ} \text{ de moléculas de proteínas}} = \frac{7,00 \times 10^{13}}{4,20 \times 10^{13}} = \boxed{1,70 \cong 2,00 \text{ átomos de Hg por molécula de proteína}}$$