

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 03/06/2026

At the author's request, the full text of this thesis/dissertation will not be available online until June 3, 2026

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

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

IZABELA DA CUNHA BATAGLIOLI

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

BOTUCATU – SP
Junho 2024

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

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

IZABELA DA CUNHA BATAGLIOLI
Zootecnista

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

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

BOTUCATU – SP
Junho 2024

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bataglioli, Izabela da Cunha.

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

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

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Coorientador: Fabiola Xochilt Valdez Domingos Moreira

Capes: 50403001

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

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

ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

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

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

Botucatu, 03 de junho de 2024

Claudia Cibria more

BIOGRAFIA DA AUTORA

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

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe,

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

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

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

Com todo o meu amor e admiração.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

VII

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

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

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

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

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

Arthur Schopenhauer

RESUMO GERAL

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

SUMÁRIO

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

CAPÍTULO III

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

Abstract 65

1. Introduction 66

2. Material and methods 67

2.1. Fish collection and sample processing 67

2.2. Mercury and selenium determinations 68

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

2.4. Parameters analysis related to oxidative stress 70

2.5. Statistical analysis 71

3. Results and Discussion 71

3.1. Hg and Se determinations 71

3.3. Analysis of parameters related to oxidative stress 80

4. Conclusions 83

References 84

CAPÍTULO IV

Implicações 88

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

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

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

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

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

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

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO IV

Implicações

1 IMPLICAÇÕES

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

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

13 Os resultados do estudo revelaram várias implicações importantes:

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

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

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

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

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

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