

INVESTIGAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS EM PEIXES DA REGIÃO DE JIRAU - BACIA DO RIO MADEIRA - RONDÔNIA

Investigation of metallothioneins in fish from the Jirau region -
Madeira River Basin - Rondônia

JOSÉ CAVALCANTE SOUZA VIEIRA

Biólogo

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de concentração *Biomoléculas –
Estrutura e Função*.

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Botucatu-SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

**INVESTIGAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS EM PEIXES DA
REGIÃO DE JIRAU - BACIA DO RIO MADEIRA - RONDÔNIA**

JOSÉ CAVALCANTE SOUZA VIEIRA

Doutorando

Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

Orientador

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de concentração *Biomoléculas –
Estrutura e Função*.

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Botucatu-SP

2017

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

Vieira, José Cavalcante Souza.

Investigação de metalotioneínas em peixes da região de Jirau - bacia do rio Madeira - Rondônia / José Cavalcante Souza Vieira. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Capes: 20800002

1. Peixe de água doce. 2. Eletroforese bidimensional.
3. Metalotioneína. 4. Mercúrio. 5. Madeira, Rio (RO e AM).

Palavras-chave: ESI MS/MS; Eletroforese bidimensional - 2D-PAGE; GFAAS ; Metaloproteômica; Metalotioneína.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE JOSÉ CAVALCANTE SOUZA VIEIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 24 dias do mês de março do ano de 2017, às 14:30 horas, no(a) Sala de Pós-Graduação, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHAES PADILHA - Orientador(a) do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Profa. Dra. CAMILA PEREIRA BRAGA do(a) Departamento de Bioquímica / University of Nebraska-Lincoln (Por meio de parecer circunstanciado), Profa. Dra. PAULA MONTEIRO DE LIMA do(a) Departamento de Biotecnologia / Universidade de Mogi das Cruzes, Profa. Dra. MAELI DAL PAI do(a) Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Profa. Dra. MILENI DA SILVA FERNANDES do(a) Departamento de Bioquímica / Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de JOSÉ CAVALCANTE SOUZA VIEIRA, intitulada **INVESTIGAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS EM PEIXES DA REGIÃO DE JIRAU - BACIA DO RIO MADEIRA - RONDÔNIA**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHAES PADILHA

Profa. Dra. CAMILA PEREIRA BRAGA

Profa. Dra. PAULA MONTEIRO DE LIMA

Profa. Dra. MAELI DAL PAI

Profa. Dra. MILENI DA SILVA FERNANDES

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: () Mestrado – mínimo: 05 créditos; (x) 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	16 h	1	1-2
4. Aulas em pós-graduação (como convidado)	04 horas = 01 crédito	34h	8	3-4
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	4	40	5-8
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	1	02	9
4. Resumos em eventos científicos internacionais	02 créditos	10	20	10 - 19
5. Resumos em eventos científicos nacionais	01 crédito	16	16	20 - 36
6. Resumos em eventos científicos estaduais ou regionais	0,5 crédito	3	1.5	37 - 39
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	03	06	40 - 42
2. Participação em evento nacional	01 créditos	03	03	43 - 45
3. Participação em evento estadual ou regional	0,5 crédito	03	1.5	46-48
4. Palestra proferida em evento científico nacional	02 créditos	01	02	49
5. Palestra proferida em evento científico estadual ou regional	01 créditos	02	02	50-51
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	1 x 60h	02	Estágio em disciplina
V. CURSOS OU MINI-CURSOS ASSISTIDOS (Máximo 03 créditos - Mestrado e 06 - Doutorado)	15 horas = 01 crédito	02	0,5	52-53
VI. PALESTRAS ASSISTIDAS (Máximo 03 créditos - Mestrado e 06 - Doutorado)	5 palestras=01 crédito			
TOTAL DE CRÉDITOS			105,5 créditos	

Botucatu, 23 de setembro de 2016.

Nome e Assinatura do Orientador

Nome e Assinatura do Aluno

Dedico

A minha namorada (esposa), por todos os gestos de amor, carinho, paciência, todas as palavras de conforto e incentivo. Obrigado por você existir na minha vida e estar sempre ao meu lado!!

A minha família por todo apoio que sempre me deu (meus pais José e Maria: principais incentivadores da minha caminhada, meu tio Orozino: companheiro e amigo, minha namorada Grasieli: amor de minha vida e companheira de luta, minhas irmãs Marizete e Elizete que vencemos muitos desafios juntos). Obrigado família, por tudo!! Sem vocês minha vida não seria a mesma!!

A minha sogra (Maria Bela) e sua família por ter me acolhido tão bem e sempre acreditarem em mim! Obrigado!!

**Dedico também a meus saudosos avós Pedro e Joana,
Meus amigos, meus companheiros.
Que estejam em um bom lugar!!!!**

Agradecimento

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me dado saúde, força e coragem para ir em busca da realização dos meus sonhos e vencer as dificuldades. Deus sempre foi muito caridoso comigo, me mostrou luz em tudo que parecia impossível, me ajudou a vencer obstáculos que para muitos seriam impossíveis!!! Só tenho a agradecer a Ele e minha santa protetora, Nossa Senhora Aparecida!!

A meus pais, José e Maria, por serem meus principais incentivadores, me apoiarem e me ajudarem a seguir em frente! Vocês são os pilares das minhas conquistas! Obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim!!

A toda minha família por todos os ensinamentos, companheirismo e apoio (meus pais; José e Maria, meu tio Orozino, minha avó Joana, minhas irmãs Elizete e Marizete e minha amada companheira Grasieli). Obrigado!! Meus sinceros agradecimentos por todo apoio, carinho e companhia!

Aos meus professores que me incentivaram muito, me inspiraram e fizeram acreditar cada vez mais em mim: Elza, Mauro, José Libério, Helder, Giuseppina (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. Por onde passei durante minha caminhada. Obrigado pela companhia e respeito!!!

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!! Obrigado prof. Pedro, exemplo de orientador!

A meus colegas e amigos de laboratório: Cilene, Bruna, João, Vânia, Alis e Camila Braga pela companhia e ajuda. Obrigado pelas piadas bobas que nos fizeram sorrir nos dias mais difíceis!!

A minha namorada e grande companheira Grasieli de Oliveira que desde que conheci tem tornado meus dias mais felizes, me ajudado em tudo! Obrigado pelo respeito, carinho, apoio, compreensão, companhia... você é uma pessoa incomparável! Sem você meus dias não seriam tão alegres!! Te admiro muito!! Te amo! Obrigado Amor por fazer parte de minha vida!!!

A todos os amigos que fiz aqui: Vânia, Gaby, Lurdinha, Elaine, Luciana Manuel, Fabinho, Augusto, Adriana Fava, Flávia Hebler, prof Fernanda Mani, prof Angélica, Aline Lima, Mileni Fernandes... a todos. Obrigado!

A toda a ajuda que recebi nas correções dos meus trabalhos: Pedro Padilha, Camila Braga, Grasieli, Ana Angélica, Fernanda Mani, Maeli.... Obrigado!!

A FAPESP e CAPES pela concessão das bolsas e ESBR pelo auxílio para aquisição de materiais de consumo de laboratório. Sem essa ajuda financeira eu não seria capaz de realizar meus estudos.

Meus sinceros agradecimentos a todos!!! OBRIGADO!!!!!!

“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)

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”

(Geroge Bernard Shaw)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

AUXÍLIO FINANCEIRO

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

Processo: 2014/02668-1 (D) 2013/21297-1

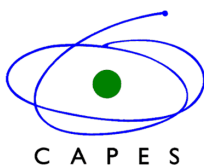


Projeto Regulamentado pela Agência Nacional de Energia Elétrica – ANEEL e Desenvolvido no Âmbito do Programa P&D da Energia Sustentável do Brasil S.A.

P&D: 6631-0001/2012. Contrato Jiral 004/13



CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



FUNDIBio – Fundação do Instituto de Biociências



Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Os reservatórios hidrelétricos	16
1.2	Toxicidade do mercúrio	17
1.3	Afinidade de metais por proteínas	19
1.4	Metalotioneínas: biomarcadores	20
1.5	Estresse Oxidativo	22
2	Revisão de literatura	23
2.1	Espectrometria de absorção atômica (AAS)	23
2.2	Estudo proteômico	24
2.2.1	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE)	24
2.2.2	Identificação por espectrometria de massas (MS).....	27
2.3	Espécies de peixes estudadas	28
2.3.1	Tucunaré (<i>Cichla spp.</i>)	28
2.3.2	Filhote ou Piraíba (<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>).....	29
2.3.3	Jaraqui (<i>Semaprochilodus sp.</i>)	30
2.3.4	Barba-chata (<i>Pinirampus pirinampu</i>).....	30
3	Hipótese	31
4	Objetivos Geral.....	31
4.1	Objetivos específicos	32
5	Materiais e métodos	32
5.1	Coletas das espécies de peixes estudadas	32
5.2	Obtenção e preparo das amostras hepáticas e muscular	35
5.2.1	Fracionamento específicos para metalotioneínas	35
5.3	Determinação da concentração de proteínas totais nos <i>pools</i> de amostras	36
5.4	Separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE).....	37
5.5	Tratamento das imagens	40
5.6	Determinação de mercúrio total	40
5.7	Preparo da curva analítica e procedimento analítico	41
5.8	Identificação das proteínas por espectrometria de massas ESI MS MS.....	42
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1	Quantificação do mercúrio total nos tecidos e <i>pellets</i> por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS)	44
6.2	Identificação das metalotioneínas no padrão certificado.....	46
6.1	Determinação da concentração de proteína nos <i>pools</i> de amostras.....	48

6.2	Corridas eletroforéticas	48
6.3	Determinação de mercúrio nos spots proteicos	57
6.4	Identificacao das proteínas dos <i>spots</i> proteicos por ESI MS/MS	59
6.5	Descrição das proteínas encontradas nos <i>spots</i> de tecido muscular e hepático de cada espécie.	68
6.6	Análises do Estresse Oxidativo	78
6.7	Análise das funções das proteínas usando o aplicativo de bioinformática <i>Blast2Go</i> . 85	
6.8	Descrição das funções das proteínas de acordo com <i>Blas2Go</i>	86
6.9	Anaise de bioinformática usando o aplicativo <i>String</i> para mostrar as interações entre as proteínas	90
7	Conclusões	92
8	Referências	94
9	Anexos.....	109
10	Súmula Curricular	132

RESUMO

Devido a sua grande concentração de nutrientes, tais como proteínas, vitaminas e minerais, o peixe é considerado um dos alimentos mais saudáveis que se pode encontrar na natureza. No entanto, a ingestão de peixes é considerada a forma predominante de via de exposição do ser humano ao mercúrio (Hg), principalmente para as populações que vivem às margens dos rios, onde o peixe constitui a principal fonte de proteína. Na tentativa de elucidar os mecanismos de toxicidade das espécies mercuriais, o teor desse metal tem sido estudado intensamente pela comunidade científica nas últimas décadas em amostras de solo, sedimentos, humanos e peixes na Amazônia brasileira. Sabe-se que as espécies mercuriais bioacumuladas nos tecidos dos seres vivos ligam-se a metaloproteínas, e quando há uma concentração alta de metal tóxico nos organismos, esses passam a expressar proteínas de defesa, denominadas metalotioneínas (MTs) responsáveis pelo transporte e eliminação de metais tóxicos. Apesar de estudos mostrarem o aumento das metalotioneínas em animais expostos a metais potencialmente tóxicos, essas proteínas não foram caracterizadas para confirmação de sua veracidade, são analisadas por métodos indiretos, esse fato leva a necessidade de técnicas mais precisas na identificação de metalotioneínas. Levando em consideração o exposto esse estudo teve como objetivo otimizar métodos de quantificação de mercúrio e técnica de eletroforese para identificação de possíveis metalotioneínas biomarcadoras de mercúrio em tecido muscular e hepático de peixes de interesse econômico, Tucunaré (*Cichla spp.*), Filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*), Jaraqui (*Semaprochilodus sp.*) e Barba chata (*Pirirampus pirinampu*). Através da Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) foi demonstrado que as quantificações dos níveis de mercúrio foram eficientes, mostrando boa recuperação do metal nos *pools* de tecidos, *pellets* e *spots* proteicos do músculo e fígado das espécies coletadas no reservatório da Usina Hidrelétrica de Jirau (UHE Jirau) - Bacia do rio Madeira. A separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) mostrou grande eficiência, com *spots* proteicos bem definidos, boa repetibilidade e reprodutibilidade nas corridas. Posteriormente a técnica de espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (ESI MS/MS) foi utilizada para identificação das proteínas obtidas por 2D-PAGE. Foi encontrado mercúrio em 27 *spots* proteicos e destes caracterizadas 23 proteínas ligadas ao mercúrio. No entanto, não foi identificada presença de metalotioneínas nas espécies estudadas, sugerindo que as concentrações de mercúrio não foram suficientes para provocar a produção destas proteínas de defesa contra intoxicação do organismo por este metal. Já nas análises comparando a atividade de indicadores de estresse oxidativo glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e hidróperóxido de lipídios (HP) com a concentração de mercúrio encontrada em cada espécie de peixes, foi verificado aumento do estresse oxidativo em relação ao aumento da concentração de mercúrio nos tecidos.

Palavras chave: metaloproteômica; Metalotioneína; 2D-PAGE; GFAAS; ESI MS/MS.

ABSTRACT

Due to its high concentration of nutrients, such as proteins, vitamins and minerals, fish is considered one of the healthiest foods that one can find in nature. However, fish intake is considered to be the predominant human exposure pathway to mercury (Hg), especially for populations living along riverbanks where fish are the main source of protein. In the attempt to elucidate the toxicity mechanisms of mercurial species, the content of this metal has been intensively studied by the scientific community in recent decades in soil, sediment, human and fish samples in the Brazilian Amazon. It is known that mercurial species bioaccumulated in the tissues of living beings bind to metalloproteins, and when there is a high concentration of toxic metal in organisms, they begin to express defense proteins, called metallothioneins (MTs) responsible for the transport and elimination of Toxic metals. Although studies have shown the increase of metallothioneins in animals exposed to potentially toxic metals, these proteins have not been characterized to confirm their veridicity, are analyzed by indirect methods, this fact leads to the need for more precise techniques in the identification of metallothioneins. Taking into account the above, this study aimed to optimize mercury quantification methods and electrophoresis technique for identification of possible mercury biomarkers metallothionein in muscular and hepatic tissue of fish of economic interest, Tucunaré (*Cichla spp.*), Filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*), Jaraqui (*Semaprochilodus sp.*) and Barba-chata (*Pirirampus pirirampu*). Through Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) it was demonstrated that the quantification of mercury levels were efficient, showing good recovery of the metal in the pools of tissue, pellets and protein spots of the muscle and liver of the species collected in the Plant's reservoir Jirau Hydroelectric Plant (UHE Jirau) - Madeira River Basin. Separation of proteins by two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) showed high efficiency, with well-defined protein spots, good repeatability and reproducibility in the runs. Subsequently the mass spectroscopy technique with electrospray ionization (ESI MS/MS) was used to identify the proteins obtained by 2D-PAGE. Mercury was found in 27 protein spots and of these 23 mercury - bound proteins were characterized. However, the presence of metallothioneins in the species studied was not identified, suggesting that the concentrations of mercury were not enough to provoke the production of these defense proteins against intoxication of the organism by this metal. In the analyzes comparing the activity of oxidative stress indicators glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and lipid hydroperoxide (HP) with the concentration of mercury found in each species of fish, Increased oxidative stress in relation to the increase in the concentration of mercury in the tissues.

Keywords: Metalloprotein; Metallothionein; 2D-PAGE; GFAAS; ESI MS/MS.

1 INTRODUÇÃO

O rio Madeira, recebe esse nome devido à grande quantidade de troncos de árvores que suas águas transportam durante o período de cheias, sendo o principal afluente do Rio Amazonas e banha os estados de Rondônia e do Amazonas. Considerado o 17º maior rio do mundo, com 3315 km de extensão, sua nascente encontra-se na Cordilheira dos Andes na Bolívia, onde é denominado Rio Beni que ao norte recebe como afluente o rio Mamoré-Guaporé formando o Rio Madeira, que divide Brasil e Bolívia. A bacia do Rio Madeira ocupa uma área de 1.380.000 km² distribuída entre os territórios do Brasil, Bolívia e Peru, possui ictiofauna exuberante e atividade pesqueira ativa [1–4].

Os peixes fazem uma verdadeira viagem ao longo da bacia na época de piracema enfrentando grandes correntezas para a desova. Ovos e larvas flutuam na superfície a partir do ponto de desova, geralmente nos Andes, por centenas de quilômetros até sua eclosão. Os cardumes que se formam migram rio a cima novamente para cumprir o ciclo reprodutivo desovando nas cabeceiras dos afluentes do Madeira, no Brasil, Bolívia e Peru. O rio Madeira abriga mais de 1 mil das 3 mil espécies de peixes conhecidas dos rios amazônicos, tamanha riqueza faz desse rio, entre os já estudados, com a maior biodiversidade de peixes do planeta. Com tanta riqueza e abundância muitas espécies de peixes são capturadas para consumo da população regional e para o mercado externo nos grandes centros comerciais. [5].

Em meados das décadas de 1970 e 1980 o governo militar incentivou um dos maiores fluxos migratórios vividos por Rondônia, a população, que na década de 1950 contava com cerca de 70 mil habitantes, passou a ter aproximadamente 490 mil no final de 1980. Foi nesse período que ocorreu a corrida do ouro e os grandes garimpos exploradores se instalaram nos leitos dos rios e lagos da região derramando mercúrio desordenadamente para separar o metal precioso do cascalho [5]. Como a região já conta com mercúrio natural oriundo do desgaste das rochas andinas, a concentração desse metal tóxico nas águas e biota aquática do Rio Madeira aumentou, motivo da preocupação pelos órgãos de pesquisa [6].

O mercúrio, além da deposição no meio ambiente pela atividade antropogênica é um metal naturalmente encontrado na crosta terrestre e em pequenas quantidades ocorre no ar, no solo e na água, onde assume diversas formas químicas como o mercúrio metálico ou elementar (Hg⁰), mercúrio inorgânico, principalmente na forma de sais mercúricos

(HgCl_2 , HgS) e mercuriosos (Hg_2Cl_2) e mercúrio orgânico ligado a radicais de carbono, por exemplo, metilmercúrio (MeHg) e etilmercúrio. Devido aos efeitos tóxicos ao meio ambiente e à saúde, países do mundo inteiro vem desenvolvendo ações a fim de minimizar os riscos oriundos da utilização de mercúrio, o que culminou na assinatura da Convenção de Minamata sobre mercúrio em 2013 [7]. Com extração e purificação simples, mas muito raro na natureza, o mercúrio ocorre na forma mineral, sendo o cinábrio o mineral mais abundante em mercúrio encontrado principalmente no leste europeu, na Espanha, Argélia e México. A figura 1 apresenta a localização das principais minas de cinábrio no mundo. O mercúrio não é extraído no Brasil, sendo desconhecida a existência de depósitos economicamente viáveis para a mineração [8], mas foi muito usado nos garimpos de ouro e na indústria. Hoje em dia, o uso desse metal nas atividades humanas foi minimizado, mas não extinto.

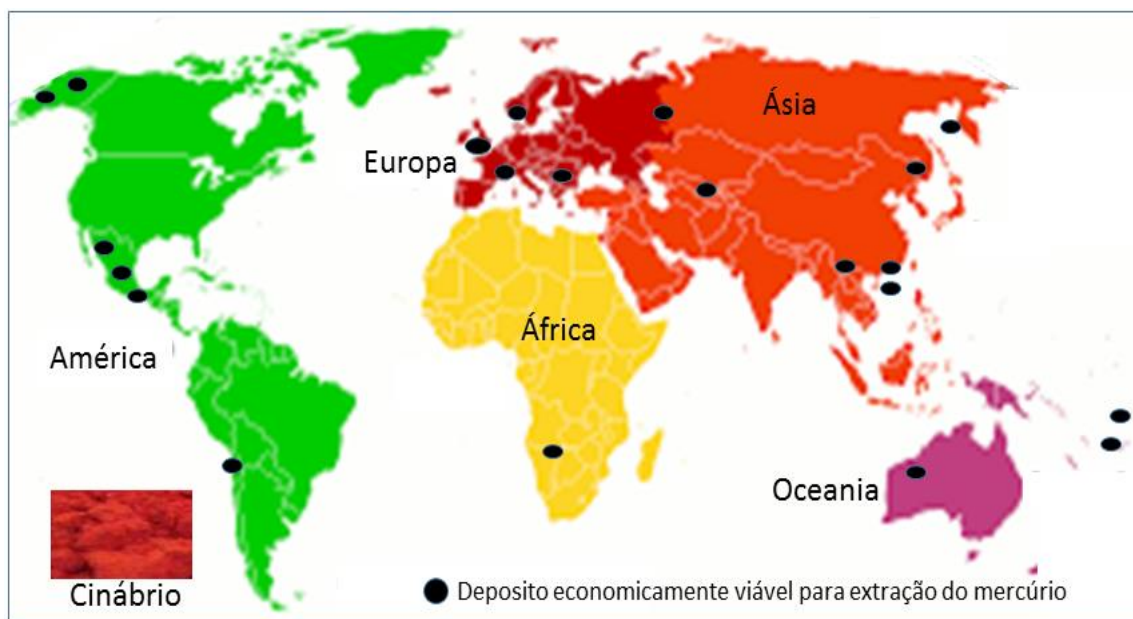


Figura 1. Principais minas produtoras de mercúrio no mundo. No canto inferior esquerdo um exemplo do mineral cinábrio. Imagem adaptada de Mailman et al, 2006 [8].

1.1 Os reservatórios hidrelétricos

O grande aumento da população humana e consequentemente maior demanda por energia elétrica está levando à criação de novos reservatórios hidrelétricos por toda parte do mundo, alagando grandes áreas e disponibilizando mercúrio antes indisponível para o meio aquático. Para minimizar os impactos dos grandes reservatórios hidrelétricos, as construtoras e agências governamentais de alguns países estão investindo em estratégias para reduzir a contaminação por mercúrio biodisponíveis. As possíveis estratégias

incluem a escolha do local para minimizar os impactos, acréscimo de selênio, adição de cal para sistemas ácidos, queima da vegetação morta antes da inundação, remoção da vegetação, acréscimo de fósforo, desmetilação do MeHg usando luz ultravioleta, gaseificação de sedimento anóxico do fundo das águas e gerenciamento de nível de água [9–12]. Essas tentativas estão sendo usadas por países desenvolvidos como Canadá, Japão e Espanha.

No meio aquático o mercúrio inorgânico, relativamente estável, pode estar naturalmente presente no substrato em pequenas quantidades, no entanto, esse mercúrio pode se transformar em metilmercúrio (MeHg) por ação de bactérias redutoras de ferro, ação da luz solar e entre outras, se tornando muito mais agressivo aos seres vivos. Quando ocorre inundação nas florestas, causadas pelos grandes reservatórios hidrelétricos por exemplo, quantidades significativas de mercúrio podem ser introduzidas nas cadeias alimentares aquáticas, sendo repassada a cadeia terrestre através dos predadores [13]. Quando um reservatório é criado, a vegetação inundada e o material orgânico já em processo de decomposição, decompõe lentamente provocando aumento na taxa de dissolução de carbono orgânico na água, aumento da liberação de mercúrio ligado a material orgânico e consequentemente, aumento das taxas de metilação do mercúrio no meio aquático. Nas águas mais profundas, com o aumento da decomposição cria-se condições anóxicas que são ideais para o aumento dos processos de metilação de mercúrio [13]. O estudo realizado por Hylander et al. (2006), sugeriu que pode levar de 20 a 30 anos para as concentrações de mercúrio nos reservatórios hidrelétricos voltarem a ser como antes de sua construção [14]. Por esses e outros motivos, toda estratégia que visa a neutralização dos efeitos nocivos do mercúrio na natureza e o aumento da sua disponibilidade durante a construção dos reservatórios são válidas, mesmo porque seu ciclo ainda causa controvérsias no mundo científico e lacunas de informações permanecem sobre seu comportamento em sistemas aquáticos e em seres vivos [12, 15, 16].

1.2 Toxicidade do mercúrio

As vias de toxicidade do mercúrio ainda seguem obscuras. Sabe-se que esse metal causa graves danos à saúde, mal formação fetal, danos a reprodução de pescados, se liga a várias proteínas de peixes e humanos, mas como isso tudo acontece exatamente, ainda deverá ser descoberto [17].

As concentrações de mercúrio em peixes de lagos e rios são elevadas devido ao aumento da ciclagem global do mercúrio (Figura 2). O aumento da taxa de conversão do mercúrio em metilmercúrio em novos reservatórios hidrelétricos faz aumentar ainda mais sua concentração na biota aquática, consequentemente pessoas e animais que se alimentam de peixes contaminados podem bioacumular maior quantidade de MeHg no organismo [9]. Os efeitos colaterais dessa intoxicação resultou na redução da reprodução de peixes e os principais efeitos observados em humano contaminados foram: perda da sensibilidade da pele, perda da coordenação dos músculos, distúrbios nas articulações, surdez, danos ao sistema nervoso central, visão de túnel, mal formação fetal, decréscimo dos níveis de células de defesa do organismo e até mesmo a morte em casos mais graves [9, 18]. Mesmo as exposições a curto prazo às formas metiladas do mercúrio podem causar graves danos à saúde [19].

Pessoas com dieta a base de proteínas de peixes como é o caso dos ribeirinhos de Porto Velho, têm uma grande exposição ao mercúrio, mesmo que suas concentrações no pescado estejam dentro dos níveis toleráveis estabelecidos pelas organizações de saúde para alimentos, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Organização Mundial de Saúde (OMS) (0.5 mg kg^{-1} até 1.0 mg kg^{-1}) [20].

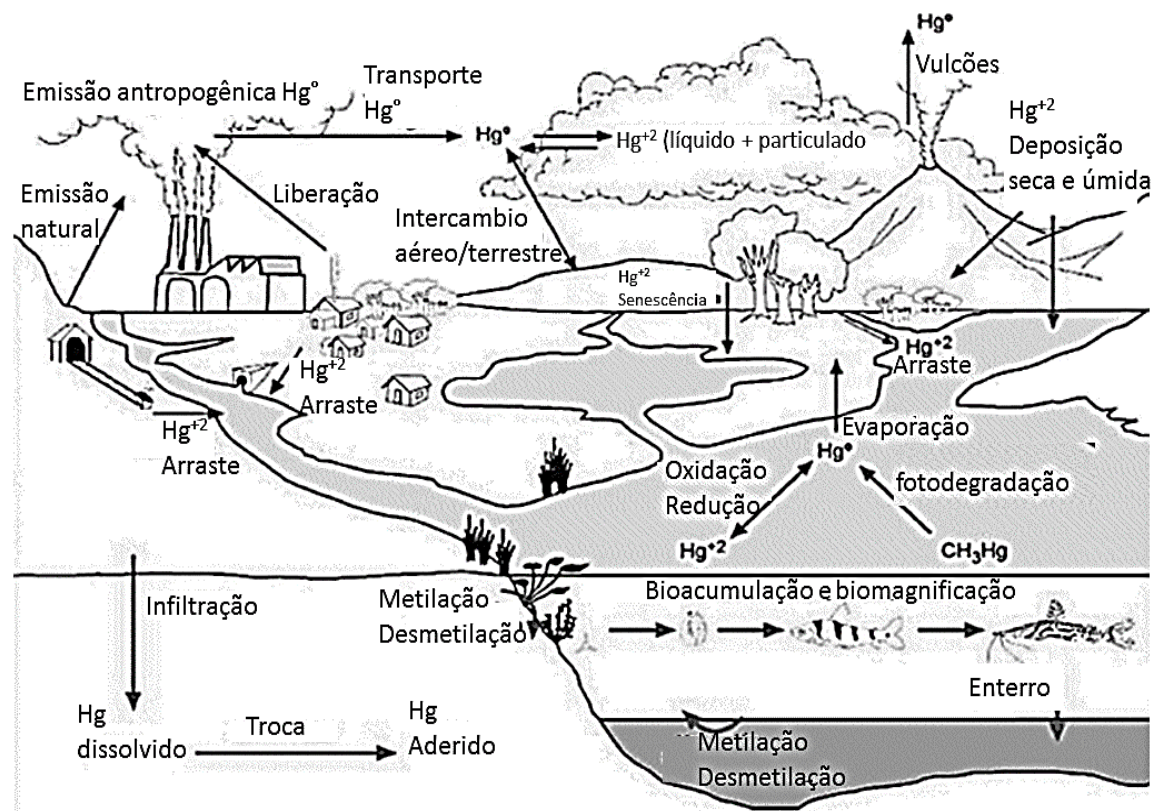


Figura 2. Ciclo biogeoquímico do mercúrio. Figura adaptada de Molina et al, 2010 [21].

1.3 Afinidade de metais por proteínas

Íons metálicos desempenham um papel funcional em numerosos processos bioquímicos e celulares. Aproximadamente, 41% de todas as proteínas/enzimas requerem um íon metálico para serem capazes de realizarem suas funções. A interação metal/proteína determina suas propriedades químicas e atividades biológicas. As interações relevantes envolvem tanto a esfera de coordenação do íon metálico quanto interações mais distantes, ou seja, interações entre a macromolécula e os resíduos de coordenação do metal (proteína *metal-binding*) [22]. As proteínas que requerem íons metálicos para desempenhar suas funções biológicas são chamados de metaloproteínas ou proteínas de ligação a metais (*metal-binding*) [22]. Muitos metais têm funções essenciais para a vida em organismos e exercem uma diversidade de papéis em muitos processos biológicos, um bom exemplo dessa interação é o grupo prostético que consiste de um átomo de ferro contido no centro de um largo anel orgânico heterocíclico chamado porfirina da hemoglobina. Em contrapartida, metais como antimônio, arsênio, cádmio, crômio (VI), chumbo ou mercúrio são tóxicos para os organismos vivos. A toxicidade de um dado elemento pode variar significativamente por causa da especiação, de modo que as espécies químicas diferentes que contêm o mesmo metal podem ter um impacto diferente em organismos vivos. Um bom exemplo disso é o metilmercúrio (MeHg), uma especiação do mercúrio que consegue ser muito mais tóxico que sua forma elementar (Hg^0) [22–25].

Entre os papéis mais relevantes das metaloproteínas estão, a participação em componentes estruturais, destacando o papel de integrantes de compostos do corpo, tais como ferro na hemoglobina (Figura 3), iodo na tiroxina, o cobalto na vitamina B₁₂ e o enxofre na tiamina e na biotina. Os íons metálicos 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) e 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 [26–29]. Os metais mais comuns que fazem parte das cadeias das metaloproteínas são o ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), magnésio (Mn), cobalto (Co), entre outros. Quando ligadas a metais tóxicos, as metaloproteínas/enzimas podem

perder totalmente ou parcialmente suas funções no organismo levando este a um desequilíbrio. O mercúrio, mesmo sendo um metal tóxico aos organismos, tem uma grande afinidade aos sítios de ligação dos metais essenciais a proteína, podendo até deslocar estes, ocupar o seu lugar e inviabilizar a proteína de realizar sua função [22, 26]. Um outro grupo de metaloproteínas muito importante para os seres vivos, são as metalotioneínas (MTs), consideradas proteínas desintoxicadoras dos organismos. Essas pequenas metaloproteínas (MTs) recebem essa classificação devido a sua pequena massa molecular, aproximadamente 6 a 7 kDa e 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. Sua presença abrange desde vertebrados, plantas, fungos, algas, até bactérias metal-resistentes [30–32].

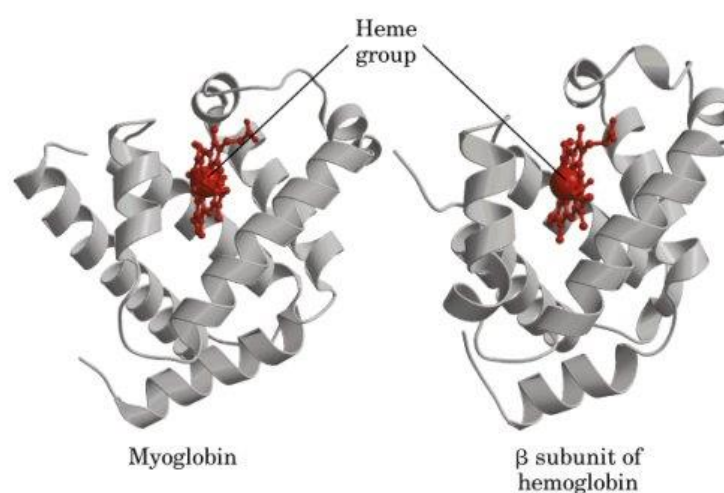


Figura 3. Estrutura da mioglobina e subunidade b da hemoglobina, exemplos clássicos de metaloproteínas. Fonte adaptada de [33].

1.4 Metalotioneínas: biomarcadores

As metalotioneínas (MTs) constituem uma classe de proteínas citosólicas de baixa massa molecular (entre 6 e 7 kDa), estruturalmente composta por uma única cadeia de aminoácidos (cerca de 60 aminoácidos) dos quais aproximadamente 30% são cisteínas (que contem grupos sulfidril - SH) que são sítios com grande afinidade para ligações com metais [30, 34]. O domínio de ligação a metais de MT compreende 20 resíduos de cisteína justapostos com aminoácidos básicos (lisina e arginina) dispostos em dois domínios ricos em tiol chamados α e β (Figura 4). Embora as MTs tenham Zn^{2+} naturalmente ligado a sua molécula, este elemento pode ser facilmente substituído por outros íons metálicos que tenham uma maior afinidade pelos seus sítios de ligações, como

Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{1+} , Ag^{2+} , e Au^{1+} [30, 35, 36]. Sendo assim, essa classe de metaloproteínas difere-se das demais tanto pela sua estrutura molecular, como pelos diferentes metais que podem se ligar, tanto *in vivo* quanto *in vitro* [30].

Devido à afinidade por metais, as MTs são proteínas de grande interesse do ponto de vista bioquímico e inorgânico, por estarem envolvidas no processo de desintoxicação do organismo por metais [37]. A presença de metais tóxicos ou mesmo essenciais em grandes quantidades faz com que aumente a taxa de síntese das MTs pelo fígado e rim, sendo capazes de proteger a estrutura celular de interações não específicas com os metais tóxicos ou promover a desintoxicação causada por metais essenciais em excesso no interior da célula [35]. O tecido hepático acumula os níveis mais elevados de metalotioneína no corpo, uma vez que é o principal órgão desintoxicante do organismo [37].

Essas pequenas proteínas são importantes no metabolismo intracelular de Cu, Zn e na proteção contra danos oxidativos resultantes da exposição excessiva a metais ou outros agentes agressivos ao organismo [38]. Por apresentar superexpressão quando expostas a metais ou condições estressantes, as MTs são consideradas importantes e biomarcadores específicos, sendo resultado de uma resposta do organismo frente a poluentes inorgânicos presentes no ambiente ou a doenças. Sabendo dessa característica das MTs, elas podem ser usadas como biomarcadoras de toxicidade do mercúrio nos organismos aquáticos, monitorando o surgimento das MTs e a quantidade de mercúrio ligado a elas [30, 34, 39, 40]. Sendo assim, a inspeção de metalotioneínas em organismos aquáticos dos rios amazônicos é de fundamental importância para o monitoramento do mercúrio nos peixes de maior consumo pela população, principalmente ribeirinha. Além do monitoramento das MTs, se faz necessário avaliar a taxa de estresse oxidativo já que este também pode alterar com a intoxicação por metais.

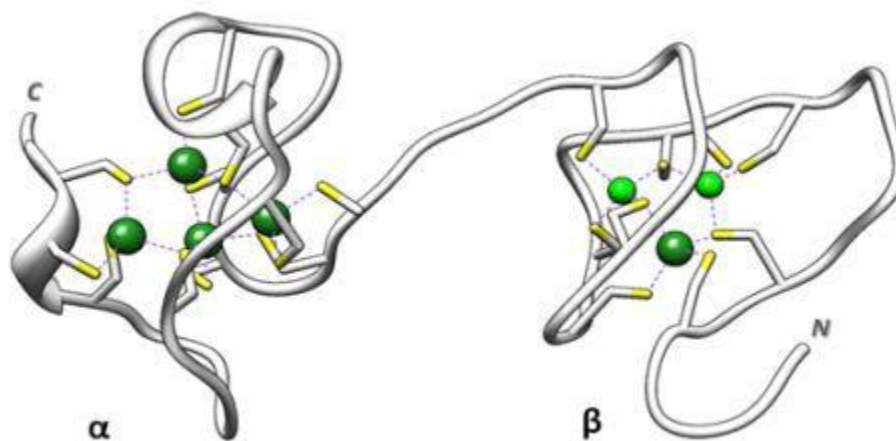


Figura 4. Sítios para ligação com metais presentes na metalotioneína. As esferas verdes denotam íons metálicos divalentes (ex: Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}). Fonte VILLAR, 2006.

1.5 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é gerado devido à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) decorrente do aumento das enzimas oxidantes e uma diminuição da eficiência das defesas antioxidantes [41]. Sendo altamente reativa e não específica na natureza, as EROs geralmente oxidam biomoléculas tais como lipídeos, hidratos de carbono, proteínas e DNA, e assim, prejudica as funções celulares normais [42]. Estão implicados na etiologia de alterações degenerativas, incluindo doenças cardiovasculares, câncer, envelhecimento, diabetes mellitus, aterosclerose, doença de Parkinson e de Alzheimer, sarcopenia, entre outras [43]. As EROs podem ser formadas no meio intracelular durante os processos oxidativos envolvidos com a produção de energia na cadeia transportadora de elétrons. Existem três formas principais de EROs: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, que são formados em etapas de redução univalente a partir do oxigênio molecular (Figura 5).

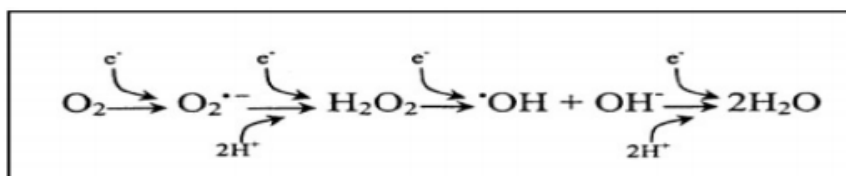


Figura 5. Etapas de redução univalente do O_2 [44].

O sistema de defesa antioxidante compreende tanto componentes enzimáticos quanto não enzimáticos. O enzimático compreende uma cascata de enzimas, que são

conhecidas como enzimas antioxidantes. Enzimas antioxidantes são ubíquas e altamente conservadas em sua natureza catalítica, algumas delas estão presentes em várias formas. O primeiro membro desta cascata é a superóxido dismutase (SOD), que catalisa O_2^- a H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio é neutralizado por duas enzimas, catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) [42]. A catalase decompõe H_2O_2 a oxigênio e água, enquanto que a GPx reduz H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos acoplando-os com a oxidação da glutathiona reduzida (GSH). A glutathiona redutase (GR) tem um papel importante na conversão de glutathiona oxidada a reduzida através da oxidação de NADPH. Subsequentemente, NADP é gerado a partir de NADPH pela enzima desidrogenase da glicose-6-fosfato (G6PDH). A SOD, dependendo do seu grupo prostético, pode ser de três tipos; SOD-Fe (geralmente encontrada em bactérias), SOD-Mn (exclusivamente mitocondrial), e SOD Cu-Zn (encontrada no citoplasma celular) [42]. A GPx tem várias isoenzimas, sendo sua principal função a eliminação do H_2O_2 nas células, enquanto que CAT tem mais importância na proteção contra o estresse oxidativo grave [42]. O sistema de defesa não enzimático, compreende pequenas moléculas orgânicas como, polifenóis, ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides e glutathiona reduzida que eliminam várias EROs [42].

2 Revisão de literatura

2.1 Espectrometria de absorção atômica (AAS)

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica em que átomos gasosos livres absorvem radiação eletromagnética em um comprimento de onda específico, produzindo um sinal correspondente mensurável que é proporcional à concentração dos átomos livres presentes no caminho óptico [45–47].

Um espectrômetro de absorção atômica consiste de: uma fonte de radiação (lâmpada de cátodo oco), que emite o espectro do elemento a ser analisado; um sistema de atomização, no qual os átomos livres do analito são formados; um monocromador, que é usado para dispersar os vários comprimentos de onda emitidos pela fonte de radiação e selecionar o feixe de interesse; e um detector que mede a intensidade da radiação e amplifica o sinal resultante (Figura 6) [48].

Os dois tipos de atomizadores mais usados em AAS são a chama e o forno de grafite [49]. A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) é utilizada para análises elementares em níveis de $mg\ L^{-1}$, é um sistema onde maior parte da amostra é

descartada pelo dreno do nebulizador (95%) e a parte da amostra que alcança a chama é diluída pelos gases desta, diminuindo sua sensibilidade [50, 51], enquanto que a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS) é utilizada para determinações de baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$), já que todo o analito é aproveitado na análise [45, 49–52]

A AAS é utilizada para determinações quantitativas tanto para metais, metalóides e alguns elementos não metálicos. Além disso, pode ser aplicada a uma grande variedade de amostras, tais como, materiais biológicos (tecidos e fluídos), ambientais (águas, solos e sedimentos), alimentares, entre outras [53]. Antes das amostras serem submetidas a AAS, o procedimento comumente realizado é a digestão/mineralização ácida da porção orgânica da amostra com ácidos fortes, que visa minimizar interferências na análise [53, 54].



Figura 6. Exemplo de aparelho de Absorção atômica com chama (FAAS) e com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS).

2.2 Estudo proteômico

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

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), foi introduzida na pesquisa com o objetivo de separar proteínas celulares sob condições desnaturantes e permitir boa resolução dessas proteínas para vários tipos de estudos [55]. A técnica por 2D-PAGE resulta da combinação da focalização isoeletrica e da

eletroforese em gel de poliacrilamida. Na primeira etapa as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) (Figura 7A), e na segunda etapa, de acordo com suas massas moleculares (Figura 7B) [56].

Esta técnica possui uma ótima resolução, podendo ser utilizada na caracterização de sistemas biológicos e em seleção específica de *spots* proteicos para posterior sequenciamento ou identificação. Baseia-se na migração de partículas carregadas em um determinado meio na presença de um campo elétrico contínuo, sendo que a carga recebida por estas partículas pode resultar da ionização, dissociação ou pela associação com outras moléculas carregadas [57].

Para conseguir uma boa separação das proteínas, é importante seguir rigorosamente as 5 etapas principais da 2D-PAGE: preparo da amostra (extração e purificação das proteínas do extrato), primeira dimensão (focalização isoelétrica), segunda dimensão (2D-PAGE), detecção das proteínas (revelação das proteínas no gel), digitalização e tratamento das imagens [58].

O preparo da amostra é uma etapa essencial no processo de separação das proteínas, e este deve ser o mais simples possível para evitar modificações na proteína ou perda desta [59]. Raramente um protocolo usado para extração das proteínas de uma determinada amostra, servirá para outra sem que este mesmo passe por ajustes, pois cada amostra tem propriedades físicas e químicas diferentes e devem ser levadas em consideração na hora da extração de suas proteínas [58]. Apesar disso, as proteínas da amostra precisam ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas para que atinjam um completo rompimento das interações moleculares e garantam que cada *spot* presente no gel represente uma proteína individual [60].

Na análise das amostras biológicas como tecidos (tecido hepático, por exemplo), devemos romper as células do material biológico através de processos mecânicos (maceração) ou químico (enzimático ou na presença de detergentes), processos importantes para a extração de proteínas [61]. O rompimento deve ser feito rapidamente e em baixas temperaturas, visto que as proteínas ficam expostas a muitos agentes que podem danificá-las de maneira irreversível e causar sua perda durante o processo [62]. Além disso, alguns compostos interferentes como proteases, sais, lipídeos, polissacarídeos ou proteínas muito abundantes, podem interferir no processo eletroforético e consequentemente na obtenção de um bom gel, portanto devem ser

removidos ou inativados durante ou após o rompimento celular, e separados seletivamente por meio do processo de precipitação das proteínas [59]. A precipitação pode ser feita com solução de acetato de amônio em metanol, acetona, solução de ácido tricloroacético (TCA) em acetona, etanol/clorofórmio e etanol/ácido clorídrico. [26, 59, 63]

A focalização isoeétrica (IEF), é a corrida em primeira dimensão. Nela, as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoeletrico (pI) em fitas contendo géis com um gradiente de pH que pode variar de 4-7, 6-11 ou 3-10 (usado de acordo com cada amostra) [64, 65]. Uma vez submetidas a um campo elétrico, as proteínas migrarão até encontrar uma faixa de pH referente ao seu ponto isoeletrico (pI) onde estas ficarão com carga total neutra, assim, a migração pelo gel da fita é interrompida [56, 66, 67].

Na segunda dimensão, a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (2D-PAGE), as proteínas são separadas com base na sua massa molecular (MM) [64, 65]. A mobilidade das proteínas no gel é dependente do tamanho dos poros do gel (o poro do gel é determinado pela porcentagem de acrilamida; 10%, 12,5%, 15%, 18%... contida neste) e da massa molecular (MM) da proteína do interesse do estudo [68]. Cada *spot* (ponto ou mancha) visualizado no gel pode ser considerado como uma proteína que migrou especificamente em função do seu pI e sua MM. Essas proteínas são coradas geralmente com azul brilhante de Coomassie por este permitir melhor quantificação da abundância relativa de cada proteína. [69, 70]. Após a coloração e subsequente descoloração, os géis são digitalizados com o auxílio de um *scanner* específico e as imagens são analisadas por um *software* que permite determinar o número de *spots* presentes no gel, valores de pI e MM, e é fundamental para a comparação das diferenças nas expressões das proteínas geradas por múltiplas corridas eletroforéticas [58, 67].



Figura 7. Exemplo de Focalização Isoéletrica - IEF (A) e corrida de um gel de eletroforese 2D-PAGE (B).

2.2.2 Identificação por espectrometria de massas (MS)

As proteínas a serem analisadas nos estudos proteômicos e/ou metaloproteômicos após serem devidamente extraídas e fracionadas, devem passar pelo processo de “digestão” trípica com enzimas proteolíticas, sendo a mais utilizada a enzima tripsina para clivar a proteína e liberar peptídeos [71]. No caso de estudos que utilizam o fracionamento de proteínas por 2D-PAGE, a digestão em gel é aplicada, ou seja a proteína é processada e digerida enquanto está contida em um *spot* de gel de poliacrilamida [72]. A tripsina cliva as ligações peptídicas das proteínas após os grupos carboxilas dos resíduos de lisinas (Lis) e argininas (Arg), exceto quando estas ligações são com resíduos de prolina (Pro), ou seja, ligações Lis-Pro ou Arg-Pro [73]. Os peptídeos obtidos na etapa de digestão trípica podem então serem caracterizados utilizando-se a espectrometria de massas (MS) [73].

A espectrometria de massa com ionização por *eletrospray* (ESI MS/MS) é uma técnica analítica que consiste de uma fonte de ionização, um analisador de massas -razão massa/carga (m/z)- e um detector [74]. Através da técnica de ESI MS/MS pode ser avaliada a massa molecular dos compostos e quantifica-los, identificar compostos desconhecidos, revelar a estrutura de moléculas e determinar as modificações pós-traducionais [74, 75]. As moléculas de interesse são em primeiro lugar, introduzidas na fonte de ionização do espectrômetro de massa, onde são ionizadas para adquirir cargas positivas ou negativas. A produção de íons pelo processo *eletrospray* requer, essencialmente, dois passos: dispersão de gotas altamente carregadas, quase à pressão atmosférica, seguida por condições que permitam a evaporação da gota; envolve a formação de um *spray* eletrolítico, que gera pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons. Quando um potencial positivo é aplicado na solução, os íons positivos tendem a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletródo. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o eletrodo aumenta, provocando uma deformação na gota que está presa na ponta do capilar; a gota ganha forma de cone e permanece presa ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial, ocorrendo liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. Como resultado final, os íons tornam-se completamente dessolvatados [76]. Os íons, em

seguida, viajam através do analisador de massa até chegar em diferentes partes do detector de acordo com a proporção massa/carga (m/z). Após o contato dos íons com o detector, são gerados sinais, e estes, gravados por um sistema de computador. O computador mostra os sinais graficamente como um espectro de massa, mostrando a abundância relativa dos sinais de acordo com a sua proporção de m/z [77]. Os resultados podem ser analisados usando bancos de dados do interesse do estudo.

A ESI tem emergido como uma importante técnica em laboratórios, por fornecer um método sensível, robusto e confiável para os estudos, detectar quantidades molares de biomoléculas não voláteis e termicamente instáveis que não são passíveis de análise por outras técnicas convencionais. Juntamente com um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (HPLC) para fracionamento molecular antes da análise por espectrometria de massa, HPLC/ESI/MS tornou-se uma técnica poderosa capaz de analisar pequenas e grandes moléculas de diferentes polaridades, em uma amostra biológica complexa. Compostos neutros também pode ser convertido para a forma iônica, e, portanto, ser analisadas por ESI MS MS [77].

2.3 Espécies de peixes estudadas

2.3.1 Tucunaré (*Cichla spp.*)

O Tucunaré é um peixe de água doce com distribuição na Amazônia e nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil. Esse peixe habita açudes, represas e rios. É um peixe carnívoro (topo de cadeia), alimentando-se principalmente de outros peixes e camarões. É um peixe voraz, persegue sua presa até conseguir capturá-la. Formam casais e se reproduzem em ambientes lânticos, onde constroem ninhos e cuidam da prole. O Tucunaré é um peixe de escamas, com corpo alongado e um pouco comprimido. Sua coloração é amarelada, com manchas pretas e verticais distribuídas regularmente pelo corpo. Todos os Tucunarés apresentam uma mancha redonda (ocelo) no pedúnculo caudal (Figura 8). É bastante rápido, agressivo, forte e muito sedentário (não realizando migrações). Com hábitos diurnos, pode chegar até 65 cm de comprimento total [5].



Figura 8: *Cichla spp.* (peixe popularmente conhecido pelo nome de “Tucunaré”). Fonte: Adaptado de Queiroz 2014 [78].

2.3.2 Filhote ou Piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*)

O Filhote ou piraíba, como é conhecido pela população amazonense o *Brachyplatystoma filamentosum* é um peixe de água doce da região amazônica, um dos peixes topo da cadeia alimentar. Seus habitats são as bacias do Araguaia e do Amazonas. Com comprimento que pode atingir até 2.50 m, sua massa corpórea pode chegar a 300 kg. Tem grande importância comercial na região e em diversas cidades onde são vendidos, possui carne muito apreciada na culinária brasileira, principalmente na região de origem. Sendo da família dos grandes bagres, é considerado o maior peixe de água doce brasileiro depois do pirarucu. Seu habitat preferido é o fundo dos canais dos rios, por esse motivo é de difícil captura em redes de pesca. É comum capturar esses peixes com um tipo de anzol grande preso em uma linha grossa, chamado de espinhel. O Filhote é um peixe carnívoro e voraz se alimentando de peixes inteiros, como peixes de couro, pacu, traíra, matrinhã, cascudo, cachorra, piranha, 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 (Figura 9) [79].



Figura 9. *Brachyplatystoma filamentosum* (peixe popularmente conhecido pelo nome de “Filhote ou piraíba”). Ordem: *Siluriformes*, Família: *Pimelodidae* [78].

2.3.3 Jaraqui (*Semaprochilodus sp.*)

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, micro-organismos associados ao sedimento e algas (Figura 10). 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 [5]. Por ser um peixe que se alimenta de detritos, ocupa a base da cadeia alimentar.



Figura 10: *Semaprochilodus sp.* (peixe popularmente conhecido pelo nome de “Jaraqui”).

2.3.4 Barba-chata (*Pinirampus pirinampu*)

A família *Pimelodidae* é composta atualmente por 83 espécies de bagres, onde a maioria das espécies conhecidas ocorrem nas bacias dos rios Amazonas, Paraná, Orinoco e nos grandes rios das Guianas. Algumas espécies de *pimelodídeos* podem atingir tamanhos muito grandes, entre essas, as espécies de *Brachyplatystoma* e *Pseudoplatystoma* [79]. Esses bagres apresentam o corpo nu (sem placas ósseas externas),

com uma nadadeira adiposa relativamente grande e três pares de barbilhões longos (um par maxilar e dois mentonianos) e corpo nas cores variando de cinza uniforme até padrões bastante elaborados de listras, pintas e manchas escuras e claras. A maior parte dos *pimelodídeos* é composta por peixes de hábitos carnívoros, e algumas espécies de grandes bagres representam predadores de topo de cadeia alimentar. Algumas espécies consomem frutos, enquanto outras tendem à onivoria. A bacia do rio Madeira é uma importante rota migratória para a reprodução desses bagres [79].

O barba-chata alcança cerca de 80 cm de comprimento total e pode chegar a 12 kg, mas o peso médio varia de 3 a 5 kg (Figura 11). A espécie é comum ao longo da beira dos rios, na frente de vilas e cidades, e, por esse motivo, é importante para a pesca de subsistência. Inclui vários itens alimentares em sua dieta, mas costuma ser um piscívoro bastante voraz quando ataca peixes presos nas redes. No Rio Madeira, o barba chata costuma aparecer em grande quantidade na pesca em novembro e dezembro, mas pode ser capturado em qualquer época do ano [79].

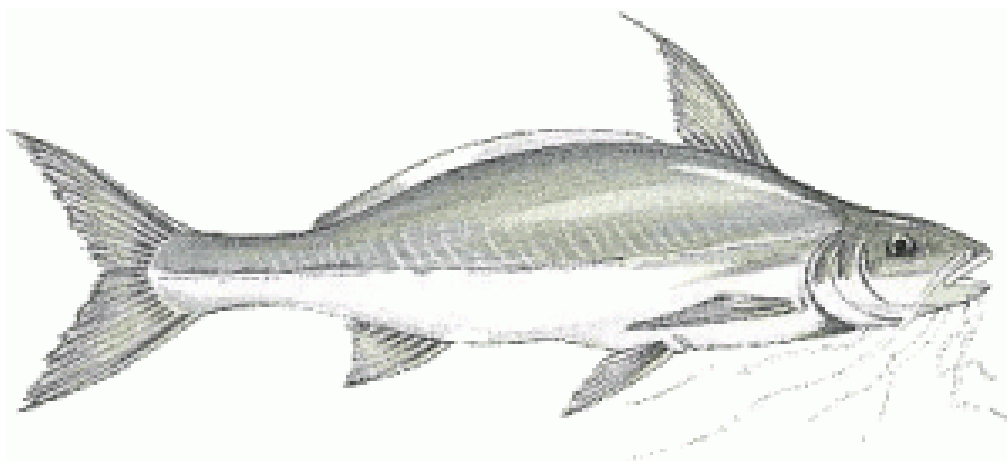


Figura 12. *Pimelodus pirinampu*, (peixe conhecido pelos nomes populares de Barba-chata, Barbado e Piranambu). Ordem: *Siluriformes*, Família: *Pimelodidae* [79].

3 Hipótese

Os peixes do Rio Madeira/RO contêm em seus tecidos muscular e hepático níveis considerados tóxicos de mercúrio capaz de induzir a produção de metalotioneínas.

4 Objetivos Geral

Identificação de metalotioneínas biomarcadoras de toxicidade do mercúrio e de espécies mercuriais aplicáveis à vigilância ambiental e saúde humana.

4.1 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar métodos analíticos visando o fracionamento/separação e identificação de metalotioneínas por 2D-PAGE em amostras de tecido hepático e muscular de peixes.
- Otimizar procedimentos de extração de mercúrio dos *spots* proteicos para posterior mapeamento por GFAAS;
- Identificar por MS as possíveis metalotioneínas presentes nos *spots* proteicos, após confirmação da presença de mercúrio por GFAAS.
- Dosar o estresse oxidativo nas espécies estudadas através da análise da atividade das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase e do hidroperoxido de lipídeo.

5 Materiais e métodos

A escolha das espécies foi feita levando em consideração o consumo destas pela população local. O tamanho e peso dos indivíduos variou dependendo da espécie capturada: Jaraqui apresentou média de 28 cm de comprimento total e média de 0.5 kg cada; Tucunaré, 30 cm de comprimento total e média de 0.8 kg; Barba chata 50 cm de comprimento total e média de 2 kg e o Filhote, o maior animal do estudo apresentou média de 1.10 metro de comprimento total e aproximadamente 30 kg.

5.1 Coletas das espécies de peixes estudadas

As coletas das espécies foram realizadas de fevereiro a março contando com o auxílio de transporte aquático da empresa de monitoramento ambiental *NATURAE*, que faz o monitoramento das espécies de peixes na região da Usina Hidrelétrica de Jirau. A pesquisa faz parte do Programa “Biomarcadores de Toxicidade do Mercúrio Aplicados ao Setor Hidrelétrico na Região Amazônica”, financiado pela Agência Nacional de Energia Elétrica – ANEEL. O protocolo de coleta das amostras foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade de Brasília UnB: N° de registro CEP-FM 038/2010 e faz parte do projeto universal “Aproveitamento hidrelétrico Jirau (AHE Jirau, estado de Rondônia): programa de monitoramento hidrobiogeoquímico do mercúrio e de riscos à saúde humana.

As espécies de peixes estudadas foram capturadas em seis pontos do Rio Madeira (Figura 13), denominados; Abunã (S 09°47'18,3''; W 065°31'12,4''), Cotia (S 09°40'43.8''; WE 064° 58'51.01''), Mutum (S 09° 41'0,06''; WE 064° 58'43.9''), São

Lourenço (S 09°23'26,5''; W 064°53'05,7'') e Rau (S 09°16'12,8''; W 064°41'14,1''), localizados a montante da usina de Jirau e Karipunas (S 09° 11'16.98''; W 064° 36'44.53'') localizado a jusante da Usina. As coletas dos sete indivíduos de cada espécie (Figura 14 e 15) foram feitas num raio de 500 metros, tendo como referência central os pontos marcados por GPS citados acima. Para coleta das espécies estudadas, foram fixadas no rio 39 redes de aproximadamente 6 metros cada, divididas em 3 baterias. As malhas das redes usadas foram, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 (cada bateria foi composta por uma rede de cada malha). Alguns indivíduos também foram capturados com tarrafas (uma espécie de rede muito usada na pesca do rio madeira) (Figura 16A) e os exemplares de peixe Filhote, foram capturados com espinhéis (Figura 16B). As demais espécies capturadas nas redes, que não eram do interesse desse estudo, foram usadas pela *NATURAE* em seus estudos de monitoramento.



Figura 13: Mapa dos pontos de coletas das amostras das espécies de peixes estudadas (Usina Hidrelétrica de Jirau, Rio Madeira, Rondônia/Brasil).

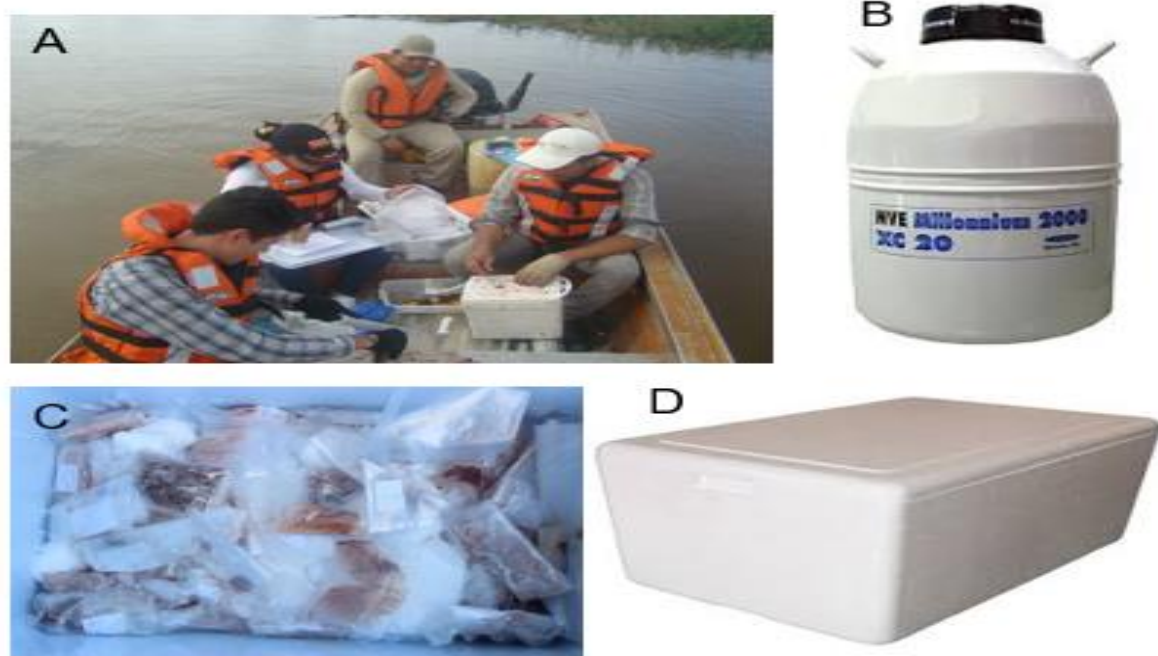


Figura 14: Coleta do tecido muscular e hepático (A), cilindro de N_2 para armazenamento das amostras durante a coleta (B), amostras sendo preparadas em gelo seco para o transporte aéreo (C) e amostras embaladas em caixa térmica de isopor para transporte.



Figura 15: Coleta das espécies de peixes nas proximidades da Usina Hidrelétrica de Jirau, Rio Madeira, Estado de Rondônia e retirada das amostras para análises de proteínas e do mercúrio.

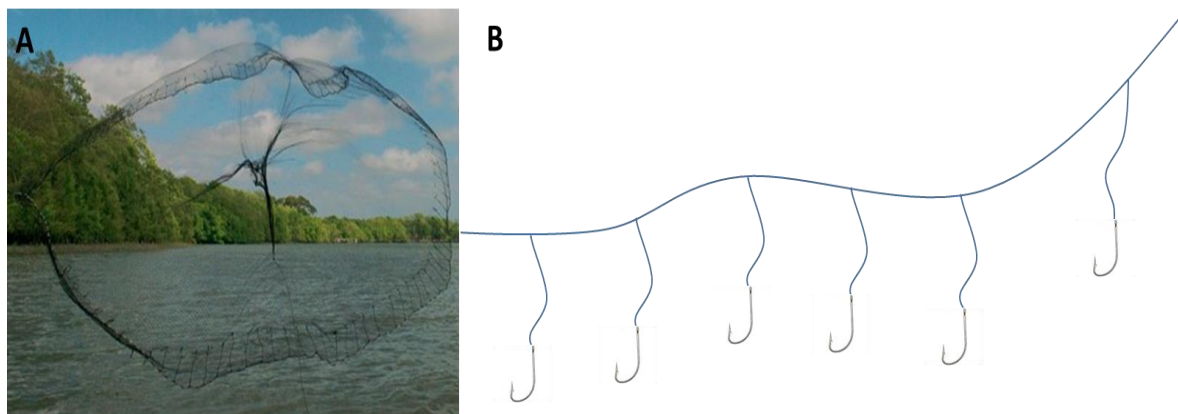


Figura 16. Tarrafa usada para pesca (A)[80], espinhel usado para pesca de peixes grandes como o Filhote (B).

5.2 Obtenção e preparo das amostras hepáticas e muscular

As espécies coletadas foram sacrificadas por secção da coluna cervical, e as amostras de tecido hepático e tecido muscular (região dorsal do animal) foram coletadas e congeladas em N₂ líquido (nitrogênio líquido) (Figura 14 e 15). Em seguida foram transportados em caixas de isopor com gelo seco para o laboratório de estudos metaloproteômicos (Laboratório de Bioanalítica Aplicada e Eletroforese) do Instituto de Biociências – Departamento de Química e Bioquímica UNESP Botucatu-SP, onde foram feitos *pools* de sete indivíduos de cada espécie através de maceração manual com N₂ e armazenados em tubos de polipropilenos de 50 mL até a realização das análises. Para o tecido muscular foi feito processo semelhante usando mixer para obtenção dos *pools* e armazenados como já descrito para o tecido hepático.

5.2.1 Fracionamento específicos para metalotioneínas

Cerca de 500 mg de *pool* de tecido muscular e/ou 100 mg de *pool* (*pools* de sete indivíduos) de tecido hepático das espécies estudadas foram homogeneizados com auxílio de almofariz e pistilo na proporção de 1:3 (m/v) em tampão de extração (solução Tris-HCl 20 mmol L⁻¹ pH 8.5, sacarose 0.5 mol L⁻¹, agente redutor ditioneitol (DTT) e inibidor de protease cOmplete Mini, EDTA-free e/ou Protease Inhibitor Mix). Após a homogeneização, o material ficou em repouso durante 5 minutos e foi centrifugado duas vezes a 13000 rpm por 60 minutos a 4 °C, recolhido o sobrenadante (fração citosólica) e

separado em três alíquotas para fracionamento das proteínas. Para o fracionamento, adicionou-se 1850 µL de solução gelada etanol/clorofórmio (1.3:1) a 1 mL de sobrenadante (amostra), que constituiu a primeira etapa de precipitação. Essa mistura repousou 4 °C/30', após esse tempo centrifugou novamente a 13000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Dos *pellets* formados com as proteínas de maior massa molecular (>90 kDa), foram analisados o mercúrio e como não apresentou, os mesmos foram descartados. As proteínas restantes, onde possivelmente teriam as MTs, foram obtidos novos *pellets* (<90 kDa) utilizando 500 µL de sobrenadante adicionados a 50 µL de solução gelada HCl 37% (m/m) etanol 99% gelado na proporção de 1:3 (v/v). Esta etapa de precipitação visou a obtenção das proteínas de baixa massa molecular do sobrenadante, incluindo as possíveis metalotioneínas. Esta mistura permaneceu *overnight* em repouso a -20 °C e no dia seguinte, foi centrifugada novamente com a programação já descrita anteriormente. Nesta etapa o sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido, submetido a uma lavagem em solução contendo 1500 µL de etanol absoluto gelado, 17 µL de clorofórmio e 207 µL de tampão de extração sem o agente redutor para a remoção dos traços ácidos [31, 81, 82]. A fração (*pellet*) destinada a quantificação de proteínas totais foi submetida ao método de Biureto, como descrito a seguir (Item 5.3).

5.3 Determinação da concentração de proteínas totais nos *pools* de amostras

A concentração de proteínas totais das amostras de tecido hepático e muscular das espécies de peixes estudadas foi determinada pelo método do Biureto usando albumina de soro bovino como padrão. Curvas analíticas de calibração (Figura 17) foram construídas com concentrações de 10 a 100 g/L a partir de uma solução estoque de albumina (100 g L⁻¹). Para quantificação das proteínas, o *pellet* foi solubilizado em 100 µL de NaOH, 0.50 mol L⁻¹ e deste, usado 50 µL misturado a 2.5 mL do reativo de Biureto, os quais foram levados a banho-maria a 32 °C por 15 minutos. Após 5 minutos em temperatura ambiente, as leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro UV/Visível em comprimento de onda 545 nm.

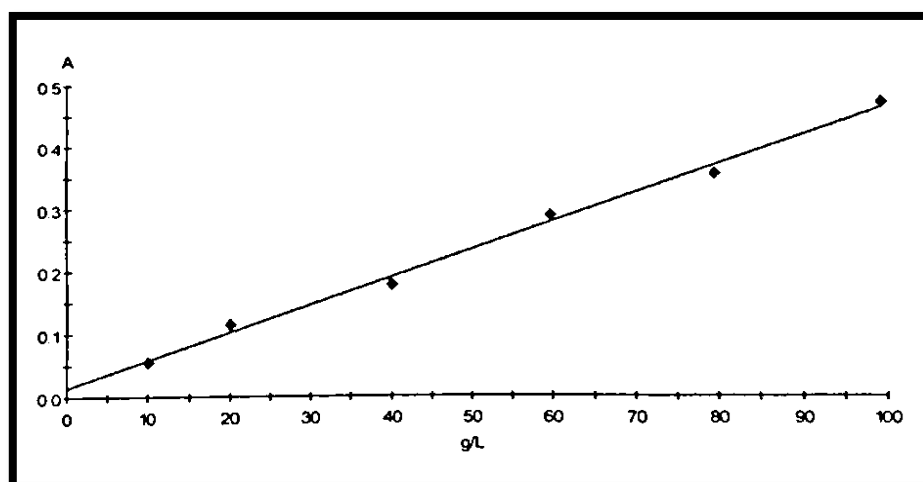


Figura 17. Curvas analíticas de calibração construídas com concentrações de 10 a 100 g L⁻¹ a partir de solução estoque de albumina (100 g L⁻¹).

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

O *pellet* de massa molar inferior a 90 kDa obtido foi diluído em uma solução contendo 7 mol L⁻¹ de ureia; 2 mol L⁻¹ de toureia; 2% (m/v) de CHAPS (3-[(3-colaminopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato); 0.5% (v/v) anfólitos pH variando de 3 a 10; 0,002% (m/v) de azul de bromofenol. A concentração de proteínas foi de 1.5 µg/µL. Um volume de 250 µL dessa solução foi adicionado a cada uma das tiras de 13 cm contendo gel de poliacrilamida com gradiente de pH de 3 a 10 e cobertas com aproximadamente 1.5 mL de óleo mineral para que fossem hidratadas com solução contendo a amostra por um período de 12 horas em caixa IPGBox a 20 °C. Após a hidratação, as tiras foram levadas para o sistema de focalização isoeletrica (IEF) Ettan™ IPGphor™ 3 (Figura 18). As corridas IEF das tiras foram realizadas como indicado na tabela 1. O tempo de separação em primeira dimensão durou em média 4:30 h. Nesta etapa foi possível separar as proteínas levando em consideração o seu ponto isoeletrico (corrida em primeira dimensão, 1D).

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

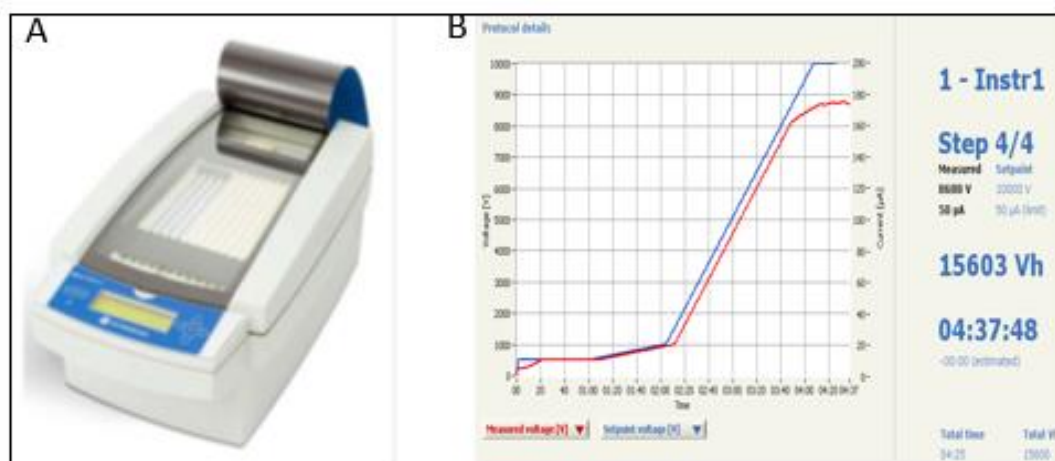


Figura 18. Focalização Isoelétrica no *Ettan™ IPGphor™* (A). Curva obtida durante a corrida IEF (B).

Após o término da focalização isoeétrica, as tiras com as proteínas separadas em função do pI foram reidratadas e equilibradas em duas etapas. Na primeira etapa foram usados 10 mL de solução contendo 6 mol L⁻¹ de ureia, 2% (m/v) de SDS, 30% (v/v) de glicerol, 50 mol L⁻¹ de Tris-HCl, 0.002% (m/v) de azul de bromofenol e 2% (m/v) de DTT. Esta etapa, denominada “redução”, tem a finalidade de manter as proteínas em suas formas reduzidas. Na segunda etapa, foi utilizada uma solução de composição similar, porém, substituindo-se o DTT por iodoacetamida (IAA) 2.5% (m/v). Esta etapa é denominada “alquilação” e sua finalidade é alquilar os grupos tióis das proteínas, prevenindo que elas sejam reoxidadas durante o processo eletroforético [26, 63, 83]. Cada uma destas etapas durou 15 min. Após as etapas de equilíbrio, foi realizada a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS-PAGE). As tiras foram aplicadas em géis de poliacrilamida 15% previamente preparados em placa de vidro de 180 x 160 x 1.5 mm. Os géis de poliacrilamida foram preparados a partir das seguintes soluções: Acrilamida, N, N'-metilenobisacrilamida, Tris-hidroximetil amino metano, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Persulfato de Amônio, N,N',N,N'-tetrametilenodiamina (TEMED) e água ultrapura. Ao lado de cada tira, foi colocado um pedaço de papel de filtro contendo 8 µL de padrão de massa molecular conhecido, com as proteínas β-fosforilase (97.0 kDa), albumina (66.0 kDa), ovoalbumina (45.0 kDa), anidrase carbônica (30.0 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α-lactoalbumina (14.4 kDa). As tiras e o papel de filtro foram vedados com solução de agarose 0.5% (m/v), de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida e permitir a passagem de corrente elétrica. Em seguida, a corrida

eletroforética em segunda dimensão foi feita em sistema para eletroforese 2D PAGE (*GE Healthcare, Uppsala, Suécia*) utilizando a programação a seguir (Tabela 2).

Tabela 2: Programação da corrida 2D-PAGE para obtenção das proteínas separadas por massa molecular.

Etapa	Corrente	V	Tempo
1	290	100	30 minutos
2	290	160	350 minutos

Após a corrida, as proteínas foram fixadas no gel utilizando uma solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v), durante 1h. Após essa etapa, foram coradas empregando-se uma solução corante de Coomassie Blue, composta por sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1.6% (v/v), Coomassie Brilhante Blue G-250 0.08% (m/v) e metanol 25% (v/v). Os géis ficaram em contato com essa solução por 72 horas e após esse período, o corante foi removido e realizadas sucessivas lavagens com água ultrapura. Os géis obtidos foram, por fim, digitalizados em Scanner (*GE Healthcare, Uppsala, Suécia*) [26]. 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*.

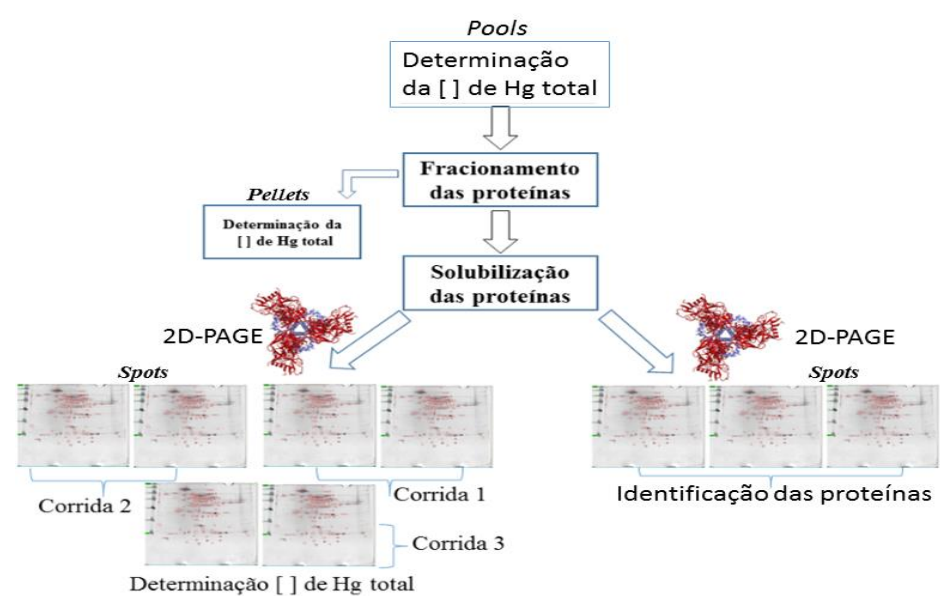


Figura 19. Esquema geral do trabalho. Três corridas com duplicatas de géis para cada *pool* de tecido para determinação de Hg e uma corrida com triplicata de gel para identificação das proteínas.

5.5 Tratamento das imagens

Após a digitalização dos géis, as imagens foram escaneadas e as imagens analisadas pelo programa *ImageMaster Platinum*, versão 7.0 (GE Healthcare, 2007). As imagens passaram por um processo de edição automática e manual para a retirada de falsos *spots* e obter dados como o número de *spots* por gel, pI, massa molecular, volume e massa de proteína.

O tratamento das imagens foi realizado para cada duplicata de géis por amostra obtidos de um mesmo processo de separação eletroforéticas.

No tratamento das imagens foi ajustando o contraste da imagem do gel de forma a melhorar a visualização dos *spots* pelo analista. Depois, realizou-se a seleção de uma pequena região do gel, a qual continha *spots* de intensidade 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* (curvatura do *spot*, filtra *spots* reais) – 20; e *min área* (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 molecular (MM).

5.6 Determinação de mercúrio total

A determinação de mercúrio total nos *pools* de tecido hepático e muscular das espécies estudadas, *pellets* e *spots* proteicos foi feita por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) conforme procedimento descrito por Moraes et al., 2013 e Vieira et al., 2015 [26, 45].

Os *pools* dos tecidos e os *pellets* e *spots* proteicos foram mineralizados usando mistura ácida. Aproximadamente 50 mg (pesadas em triplicata em balança analítica com precisão de centésimo de miligrama) de *pool* de tecido hepático e muscular, e/ou 6 *spots* proteicos (obtidos das três duplicatas de corridas), e/ou a massa total dos *pellets* proteicos obtidos nas etapas de 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 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0.25 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de frascos foi colocado em bloco digestor com aquecimento brando (aproximadamente 70°), 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 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 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 [26].

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 20 µL de solução modificador tungstato de sódio 1000 mg L⁻¹ foram injetadas dentro do atomizador, o qual foi em seguida submetida ao programa de aquecimento descrito por Moraes et al., (2013) [45]. Íons de tungstênio foram depositados sobre a plataforma do tubo de grafite onde o aquecimento alcançou 500 °C, formando assim, uma camada de carboneto de tungstênio, que funciona como modificador químico. Após esse tratamento, obteve-se um aumento da vida útil do tubo de 300 queimas para aproximadamente 483 [26, 45].

5.7 Preparo da curva analítica e procedimento analítico

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 µg 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 variaram entre 0.25 e 2.00 µg L⁻¹. Estas

soluções foram, em seguida, injetadas no tubo de grafite do espectrômetro recoberto com carboneto de tungstênio usando a micropipeta do amostrador automático. As medidas de absorbâncias foram feitas em triplicatas, o programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para a análise de mercúrio é mostrado na Tabela 3 [26].

Para leitura das amostras, foram colocadas no vial do amostrador 0.5 mL de amostras (extratos ácidos) e 0.25 mL de modificador químico (solução de nitrato de paládio e zircônio), desta mistura, foram injetados 20 µL dentro do tubo de grafite usando a micropipeta do amostrador automático. Para validação do método foi utilizado padrão certificado *Fish Protein* DORM 4–NRC contendo $410 \pm 55 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio total [26, 45, 63].

Tabela 3. Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de mercúrio em extratos ácidos obtidos a partir de amostras mineralizadas de *pools* de tecido hepático, muscular, *pellets* e *spots* proteicos obtidos do fracionamento das proteínas destes *pools*.

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

5.8 Identificação das proteínas por espectrometria de massas ESI MS MS

Os *spots* foram excisados dos géis e foram cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm³, transferidas para tubos de 2.0 mL contendo 200 µL de ácido acético 5% e armazenados a 4 °C. Posteriormente, os segmentos de gel foram lavados por três vezes, em uma solução contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AmBic) 25 mM por 30 min, pois os géis deveriam estar totalmente descorados. Em seguida, os mesmos foram desidratados duas vezes em ACN 100% por 10 min. Ao final da segunda desidratação, a ACN foi removida e o resíduo remanescente deixado evaporar em temperatura ambiente.

Depois de desidratados, os *spots* foram submetidos à redução com DTT 20 mM em AmBic 50 mM incubados por 40 min a 56 °C. O excesso de líquido foi removido e

substituído por IAA a 55 mM em AmBic 50 mM. Após 30 min no escuro, em temperatura ambiente, o líquido foi removido, os fragmentos foram lavados em AmBic 25 mM e em seguida desidratados em ACN 100%. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar em temperatura ambiente.

Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados em 15 μ L de solução contendo 150 ng de tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega, Madison, WI, EUA) em AmBic 25 mM por 15 min para que a tripsina pudesse penetrar no gel. Em seguida, adicionaram-se 50 μ L de AmBic 25 mM para total cobertura dos *spots* e incubou-se a 37 °C por 14 h. Ao fim de 14 h, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 μ L de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 15 min com solução de eluição A (ACN 50% v/v e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 min com solução de eluição B (metanol 60% v/v e ácido fórmico 1% v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%, a 45 °C sob sonicação em banho (Ultracleaner 1600A, Unique, Brasil) com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida a secagem em concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) em temperatura ambiente, por 2-3 h e armazenada a -20 °C (SHEVCHENKO et al., 2006). Antes de ser realizado o sequenciamento dos peptídeos, a amostra ainda passou por um processo de limpeza utilizando colunas C18 ZipTip (Millipore) com resina. Estas foram recondicionadas com solução TFA 0.1% em ACN 100%, TFA 0.1% em ACN 50% e TFA 0.1% em H₂O. Os peptídeos foram suspensos com 10 μ L de solução TFA 0.1% em H₂O, passada pela coluna para retenção dos peptídeos e possíveis sujeiras e lavada com solução TFA 0.1% preparada em MeOH 5% por 3 vezes. Os peptídeos foram recuperados passando na coluna 10 μ L de TFA 0.1% preparado em ACN 50%, colocado em novo microtubo e concentrado até o volume final de aproximadamente 1 μ L. A análise dos peptídeos tripticos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). Para tanto, o sistema UPLC nanoACQUITY foi equipado com uma coluna do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 75 mm x 150 mm; 1.8 μ m, Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel B (100% ACN + 0.1% ácido fórmico). Os peptídeos foram separados através de um gradiente linear de 7-85% de fase móvel B durante 20 min com fluxo de 0.35 μ L/min e a temperatura da coluna mantida a 45°C. O MS foi operado em modo íon positivo, com resolução de pelo menos 20000 FWHM (full-width halfmaximum) e em modo de aquisição independente de dados (LC-MSE), com o tempo

de aquisição de dados de 20 min por *spot*. Os dados foram coletados a uma energia de colisão constante de 15 eV no modo MS de baixa energia e 45 eV modo de alta energia. A correção das massas foi realizada utilizando o calibrante externo (Glu-1-fibrinopeptide B, 1 pmol/mL) infundido através do lock mass a um fluxo de 300 nL/min e amostrado a cada 30s.

Os espectros de massa obtidos do nanoUPLC-MSE foram processados utilizando o *software Protein Lynx Global Server (PLGS)* versão 3.0. A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao *software*. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados do grupo taxonômico (*Otophysi*) baixado do catálogo do *UniProt* (Universal Protein Resource). Para a busca foram utilizados os seguintes parâmetros: *Carbamidomethyl-C* (modificação fixa), *oxidation M* e *phosphoryl STY* (modificações variáveis); precisão de massa igual a 10 ppm, com tolerância do fragmento igual a 0.1 Da contra a massa teórica de peptídeos, com pelo menos um peptídeo por proteína, dois íons fragmentos por peptídeo e cinco íons fragmentos por proteína; clivagens perdidas: 1; *False discovery rate*: 4.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Quantificação do mercúrio total nos tecidos e *pellets* por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS)

A determinação de mercúrio nessa etapa do trabalho, além de ter sido feita nos *pools* de tecido muscular e hepático, também foram feitas nos *pellets* proteicos obtidos no processo de precipitação fracionada das proteínas (*pellets* com massa molecular >90 e <90 kDa). O objetivo desse procedimento foi fazer um balanço de massa de mercúrio em relação à concentração desse elemento nos *pools* de tecidos e nos *pellets* proteicos e também selecionar quais proteínas seriam caracterizadas ligadas ao mercúrio. Na tabela 4 e gráfico 19 são apresentadas as concentrações de mercúrio no *pool* de tecido hepático, muscular e nos *pellets* proteicos das espécies estudadas. Para validar o método de determinação de mercúrio, foi usado o padrão certificado de proteína de músculo e fígado de peixe respectivamente (*DORM 4 – NRC* e *DOLT 4-NRC*) [26, 45].

Tabela 4. Resultados obtidos para concentração de mercúrio nos *pools* de tecido muscular (TM), hepático (TH) e *pellets* proteicos das espécies estudadas ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Amostras	Jaraqui	Tucunaré	Filhote	Barba chata	Padrão certificado
Pool Muscular	71.40±0.93	101.30±1.30	87.40±0.90	60.20±0.20	-
Pool Hepático	852.40±11.10	1219±15	1044±13.60	550.10±0.30	-
Pellet TM	59.70±0.77	81.20±1.05	72.20±0.94	30.30±0.10	-
Pellet TH	724.20±9.40	999.60±13.1	867.60±11.1	600.40±1.20	-
		0	0		
Pellet TM >90 kDa	-	-	-	-	-
Pellet TH >90 kDa	-	-	-	-	-
DORM 4 –NRC	-	-	-	-	4 0 3±12
DOLT 4 - NRC					2.580±220

*Padrão certificado de proteína de músculo de peixe contendo 410±55 µg kg⁻¹. *Pellet TM*= *Pellet* proteico do tecido muscular; *Pellet TH*= *Pellet* proteico do tecido hepático. [Hg] = concentração de mercúrio total (µg kg⁻¹).

Com base nos dados apresentados na tabela 4, observa-se que o tecido hepático apresenta maior concentração de Hg do que o tecido muscular, tanto no *pool* de tecido quanto no *pellet*, isso pode ser justificado pela maior quantidade e diversidade de proteínas encontradas no fígado e por esse órgão ser considerado destoxificador do organismo, exercendo a função de eliminar os metabólitos endógenos ou exógenos, que possivelmente não serão benéficos [84]. Observando os números apresentados na tabela 4, pode ser visto que houve uma pequena perda do mercúrio durante o processo de fracionamento tanto no tecido muscular quanto hepático (exceto no *pellet* de tecido hepático de Barba-chata), o que não deixa de ser normal, pois houve manuseio da amostra e o mercúrio é um metal muito volátil, perde com facilidade quando a amostra é exposta a manuseios. Os resultados mostram uma perda de: 16.39% nos *pellets* de tecido muscular e 15.04% nos *pellets* de tecido hepático de Jaraqui; 19.85% e 18% de perda do mercúrio em *pellets* tecidos muscular e hepático do Tucunaré, respectivamente; 17.4% e 16.90% nos *pellets* tecido muscular e hepático de Filhote respectivamente e 50.33% de perda em tecido muscular de Barba chata, enquanto no tecido hepático esse valor teve uma inversão, houve uma concentração de mercúrio no *pellet*, indicando que não houve perda desse durante o fracionamento. Pode ser observado também nesses resultados, a maior concentração de mercúrio nos animais de topo de cadeia (Tucunaré e Filhote), sendo o *pool* de tecido hepático de Tucunaré o que mais apresentou mercúrio. Quando comparado concentração de mercúrio nos tecidos muscular e hepático de Tucunaré com esses mesmos tecidos de outro predador como é o caso do Filhote, os valores não ultrapassam

a 14.35%, já quando comparados com um animal base da cadeia alimentar pesqueira como o Jaraqui, os valores de concentração do mercúrio no tecidos do Tucunaré ultrapassa aos 30%. Essas concentrações mais elevadas nesses animais já eram esperadas devido seu nível trófico [26].

Estudos anteriores realizados em peixes do rio Madeira já haviam encontrado níveis consideráveis de mercúrio nos tecidos muscular, hepático e ligado a proteínas do musculo e fígado dos peixes dourada, Filhote, Tucunaré, Jaraqui, pacu e curimatã [26]. Braga et al., (2015) estudou peixe dourada da região amazônica e encontrou $331 \pm 7 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio no tecido muscular, $215 \pm 3 \mu\text{g kg}^{-1}$ nos *pellets* desse mesmo tecido e 582 ± 9 no tecido hepático e $379 \pm 6 \mu\text{g kg}^{-1}$ nos *pellets* hepáticos, usando água ultrapura para extração das proteínas [63]. Assim como o Filhote e Tucunaré, a dourada é um peixe topo de cadeia alimentar[78]. Comparando os resultados do estudo de Braga com os obtidos no presente estudo, pode ser observado, que tanto no tecido quanto nos *pellets* muscular do Filhote, (Tabela 4) foi detectado maior quantidade de mercúrio do que na dourada (*pool* de tecido 331 ± 7 e *pellet* $315 \pm 3 \mu\text{gHgkg}^{-1}$) que ocupa praticamente o mesmo nível trófico (predador). O relativo aumento da concentração de mercúrio no Filhote observado nesse estudo pode ter ocorrido por diversos fatores, sendo o mais provável, o aumento do nível da água do reservatório da Usina Hidrelétrica de Jirau e consequentemente disponibilização de espécies mercuriais para o ambiente aquático e estas bioacumuladas nos pescados [85].

Queiros et al., (2015) [3] já havia encontrado mercúrio tanto nos tecidos muscular e hepático, quanto ligados a algumas proteínas de baixa massa molecular ($<20 \text{ kDa}$) de peixes Filhote do Rio Madeira. A quantidade de mercúrio ($617 \pm 11 \mu\text{g kg}^{-1}$) encontrado no fígado do Filhote no estudo de Queiros, foi inferior ao determinado no presente estudo ($1044 \pm 13.60 \mu\text{g kg}^{-1}$), isso vem a confirmar o processo bioacumulativo desse elemento no pescado. As espécies de peixes Jaraqui e Tucunaré ($852.40 \pm 11.10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1219 \pm 15 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente), também apresentaram aumento nas concentrações de mercúrio no tecido hepático comparados a estudos anteriores de Vieira et al., (2014) (Jaraqui, $426 \pm 6 \mu\text{g kg}^{-1}$ e Tucunaré, $674 \pm 13 \mu\text{g kg}^{-1}$) [86].

6.2 Identificação das metalotioneínas no padrão certificado

Para nortear os procedimentos de fracionamento das metalotioneínas nas amostras, inicialmente foram feitas corridas 2D-PAGE com o padrão certificado de MT

(*Metallothionein-1 Rabbit Liver* do fabricante *Enzo Life Sciences*) (Figura 20). Os *spots* obtidos nas corridas do padrão *Metallothionein-1 Rabbit Liver* foram caracterizados por ESI MS MS e, apesar das especificações do fabricante informar que este seria composto por 75% de MTs, essa foi encontrada em um único *spot* com massa molecular teórica de 6.11 kDa, pI 8.24 segundo o banco de dados UniProt e 25.27 kDa, pI 5.64 experimental (gel 2D-PAGE). Os demais *spots* apresentaram apenas fragmentos de proteínas não identificados no banco de dados UniProt [87] (Tabela 1 dos anexos). A figura 19 exemplifica um dos géis obtidos nas corridas 2D PAGE do padrão *Metallothionein-1 Rabbit Liver* e na tabela 5 são apresentadas as proteínas caracterizadas por ESI MS MS.

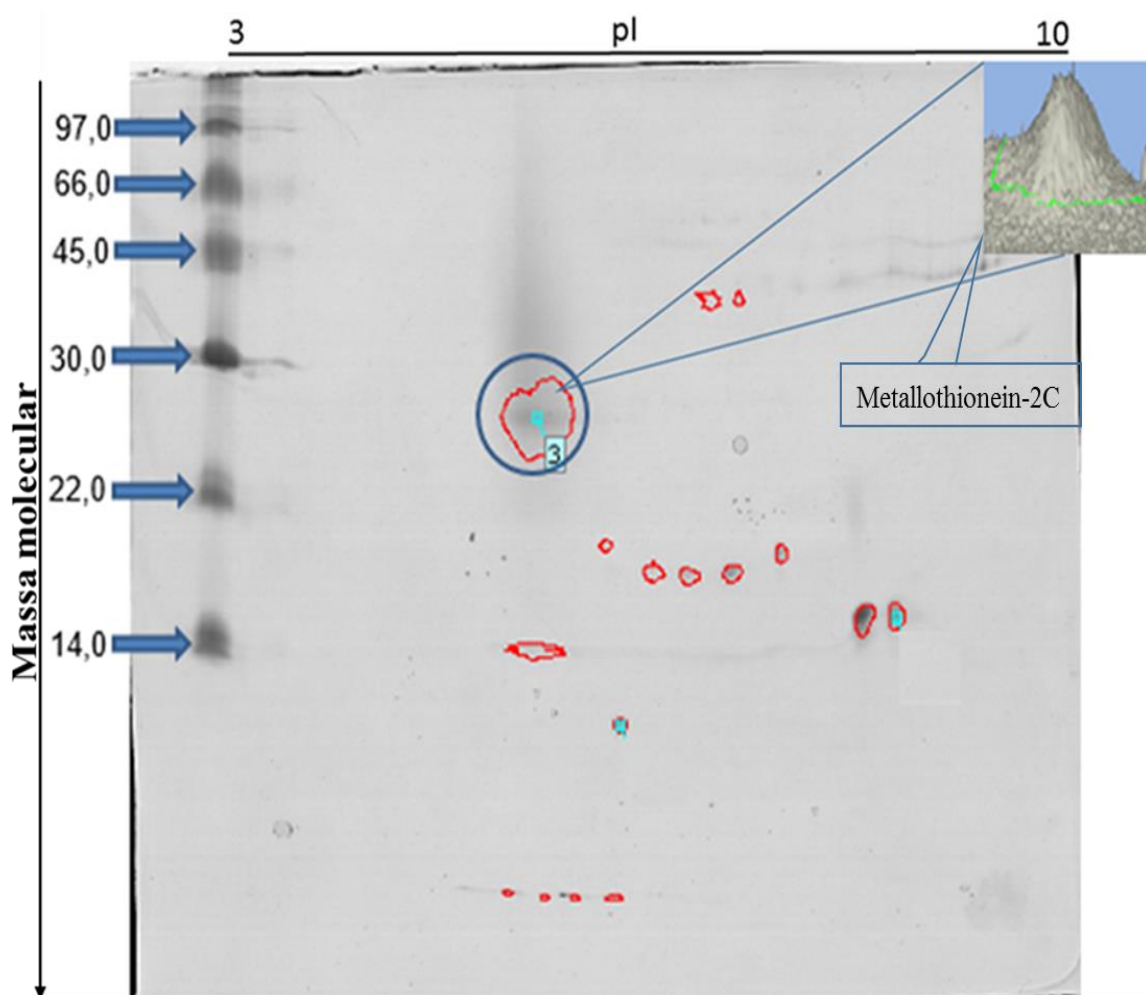


Figura 20. Gel obtido na corrida eletroforética do padrão certificado de *Metallothionein-1 Rabbit Liver* do fabricante *Enzo Life Sciences*. Condições experimentais: concentração do gel de 15% (m/v), tiras com gradiente de pH 3-10, marcador de massa molecular de 14-97 kDa (para certificar a massa molecular dos *spots* de MT). Etapa 1: 100V, 290 mA,

30 min. Etapa 2: 160 V, 290 mA, 5 horas e 50 minutos. Imagem em 3D representando o *spot* que foi identificada a metalotioneína por MS.

6.1 Determinação da concentração de proteína nos *pools* de amostras

Tabela 5. Concentração de proteínas totais, determinado pelo método de Biureto, dos *pellets* de amostras obtidos pela precipitação fracionada.

Amostras	Espécies estudadas	Concentrações de proteína (mg L ⁻¹)
<i>Pellet</i> de tecido hepático	Jaraqui	11.12
	Filhote	11.86
	Tucunaré	7.67
	Barba chata	10.00
<i>Pellet</i> de tecido muscular	Jaraqui	23.34
	Filhote	14.14
	Tucunaré	26.71
	Barba chata	9.60

Com base nos resultados da concentração de proteína total presente nas amostras de tecido muscular e hepático dos peixes (Tabela 5) foi possível calcular o volume a ser adicionado nas tiras na etapa de hidratação a fim de se obter uma massa de proteína de 375 µg, que, com base no manual do sistema de focalização isoeletrica, favorece uma melhor separação das proteínas no gradiente de pH 3-10 [88, 89].

6.2 Corridas eletroforéticas

Para obtenção de géis com possibilidades de encontrar MTs, foram feitas extrações em condições específicas como já descritas no item 5.2.1, e os *spots* encontrados na região onde identificou a metalotioneína do padrão certificado (24 a 30 kDa), foram tratados para identificação de suas proteínas. As imagens dos géis tratados, correspondentes aos *pools* das espécies podem ser observadas nas figuras 21 a 28.

Os resultados das análises de correlação entre as repetições dos géis, bem como a contagem de *spots* proteicos dos mesmos são apresentados na tabela 7, para os géis de uma mesma corrida eletroforética.

Os géis obtidos nas corridas eletroforéticas (Figuras 21 a 28) apresentaram ótima resolução (*matching* $\geq 93\%$), o que demonstra que a separação de proteínas foi eficiente. Observa-se que em todas as espécies, os géis expressam uma grande quantidade de *spots* proteicos, e que o tecido hepático apresenta maior quantidade destes comparado ao tecido muscular, resultados já esperados devido à grande quantidade de proteínas que são encontradas no tecido hepático.

As imagens foram comparadas entre duplicata de géis por meio do processo de *matching* feito pelo programa *ImageMaster Platinum v. 7.0*, que consiste em identificar quais *spots* são equivalentes entre estes. O resultado do processo de tratamento das imagens permitiu obter a correlação entre as triplicatas de géis (Tabela 6). O tratamento de imagem das corridas eletroforéticas; revelou, por exemplo, para as repetições dos géis dos tecidos muscular e hepático do peixe Jaraqui uma correlação de 94 e 99%, Tucunaré 93 e 98%, Filhote 93 e 97% e barba-chata, 100 e 96% respectivamente; isso de modo simplificado significa que os *spots* proteicos estavam presentes nas três repetições desses géis. Indicam ainda uma boa repetibilidade e reprodutibilidade dos mesmos nas repetições de corridas.

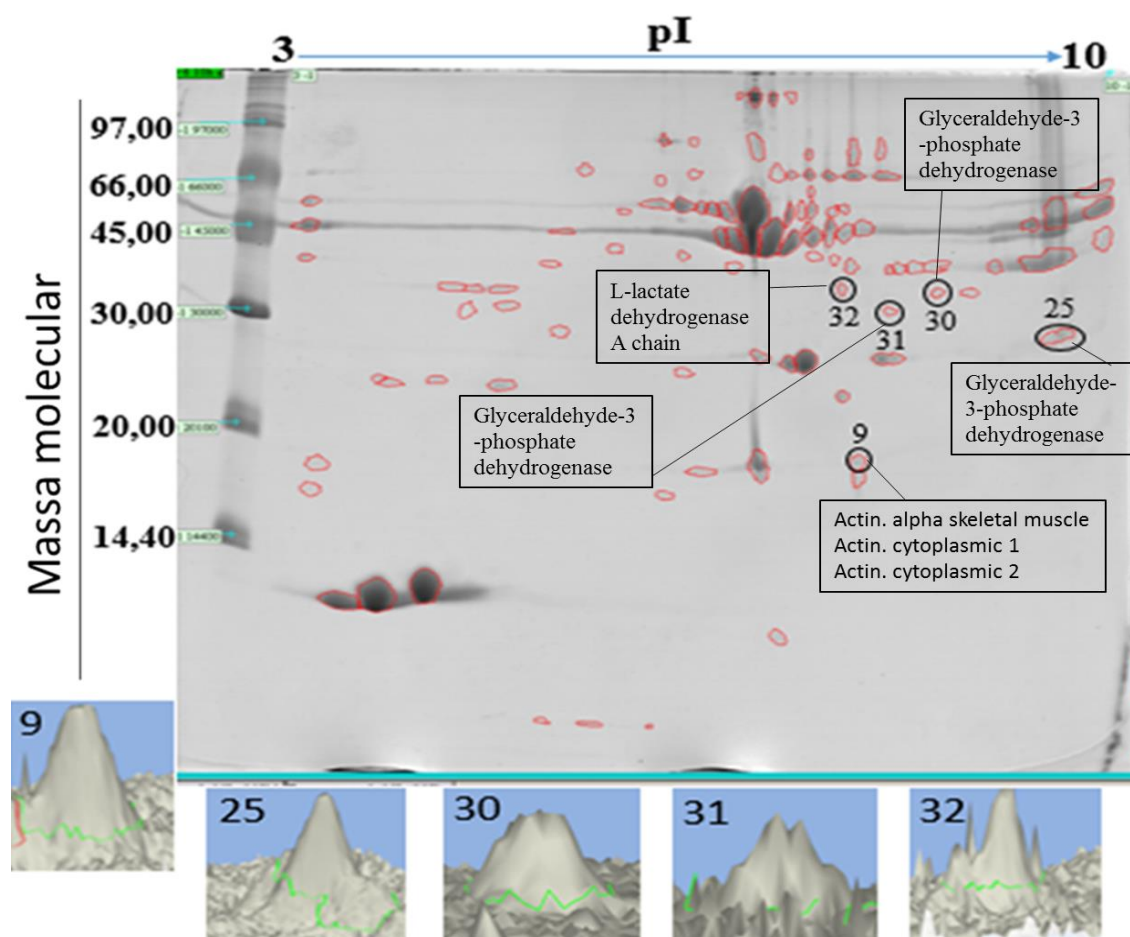


Figura 21. Gel bidimensional obtido na corrida eletroforética do *pool* de tecido muscular do Tucunaré. Em 3D estão apresentados os *spots* onde foram possíveis identificarem as proteínas por ESI MS/MS. Em destaque na imagem, o nome de cada proteína identificada e seu *spot* correspondente. Algumas proteínas foram identificadas em mais de um *spot* no mesmo gel. Todas as proteínas identificadas no gel apresentavam mercúrio no seu *spot* correspondente.

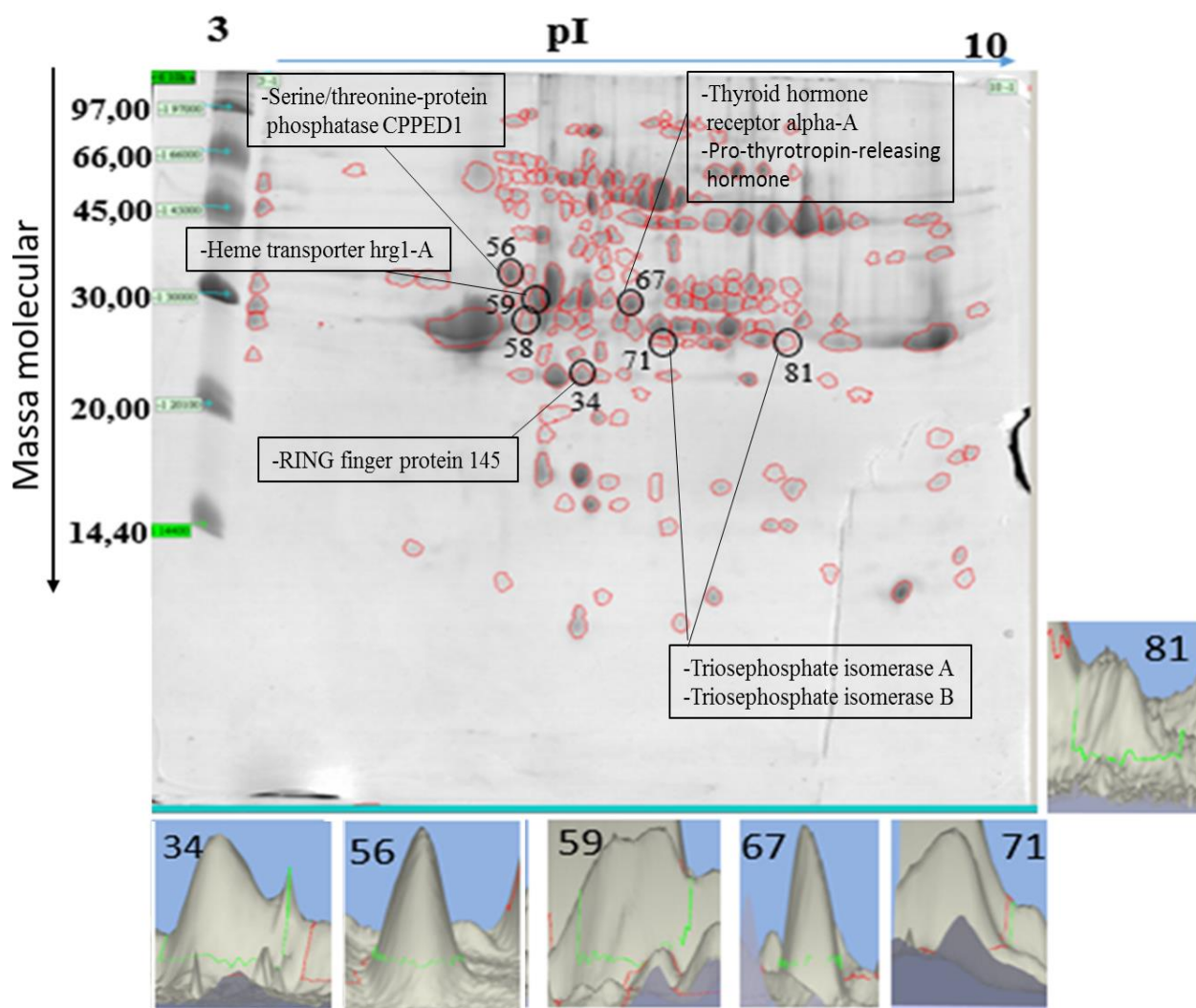


Figura 22. Gel obtido na corrida eletroforética do *pool* de tecido hepático do Tucunaré. Em 3D estão apresentados os *spots* onde foram possíveis identificarem as proteínas por ESI MS/MS. Destacados nos retângulos na imagem, o nome de cada proteína identificada e seu *spot* correspondente. Algumas proteínas foram identificadas em mais de um *spot* ou um mesmo *spot* apresentou mais de uma proteína. Todas as proteínas identificadas no gel apresentavam mercúrio no seu *spot* correspondente.

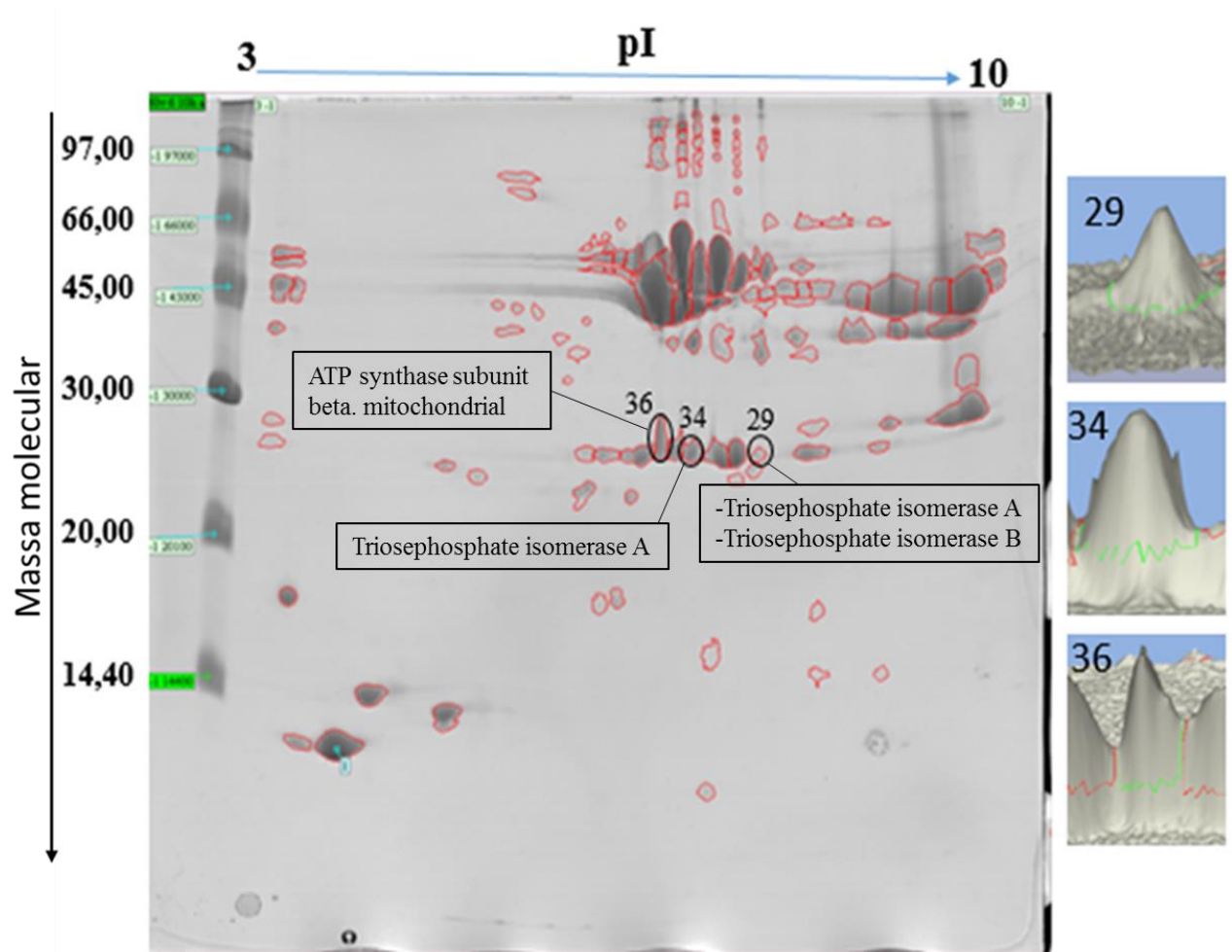


Figura 23. Gel obtido na corrida eletroforética do *pool* de tecido muscular do Filhote. Em 3D estão apresentados os *spots* onde foram possíveis identificarem as proteínas por ESI MS/MS. Destacados nos retângulos na imagem, o nome de cada proteína identificada e seu *spot* correspondente. Algumas proteínas foram identificadas em mais de um *spot* ou um mesmo *spot* apresentou mais de uma proteína. Todas as proteínas identificadas no gel apresentavam mercúrio no seu *spot* correspondente.

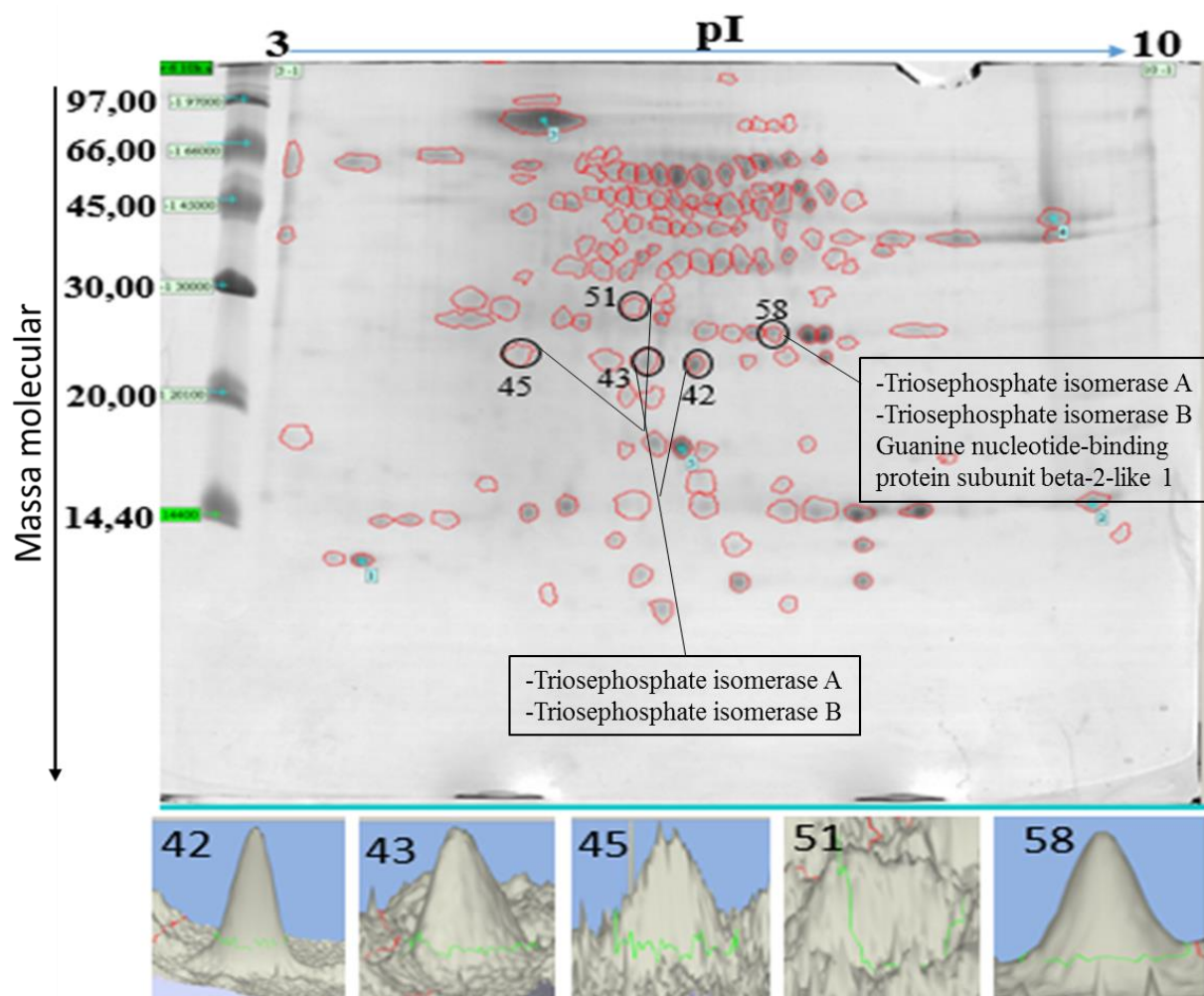


Figura 24. Gel obtido na corrida eletroforética do *pool* de tecido hepático do Filhote. Em 3D estão apresentados os *spots* onde foram possíveis identificarem as proteínas por ESI MS/MS. Destacados nos retângulos na imagem, o nome de cada proteína identificada e seu *spot* correspondente. Algumas proteínas foram identificadas em mais de um *spot* ou um mesmo *spot* apresentou mais de uma proteína. Todas as proteínas identificadas no gel apresentavam mercúrio no seu *spot* correspondente.

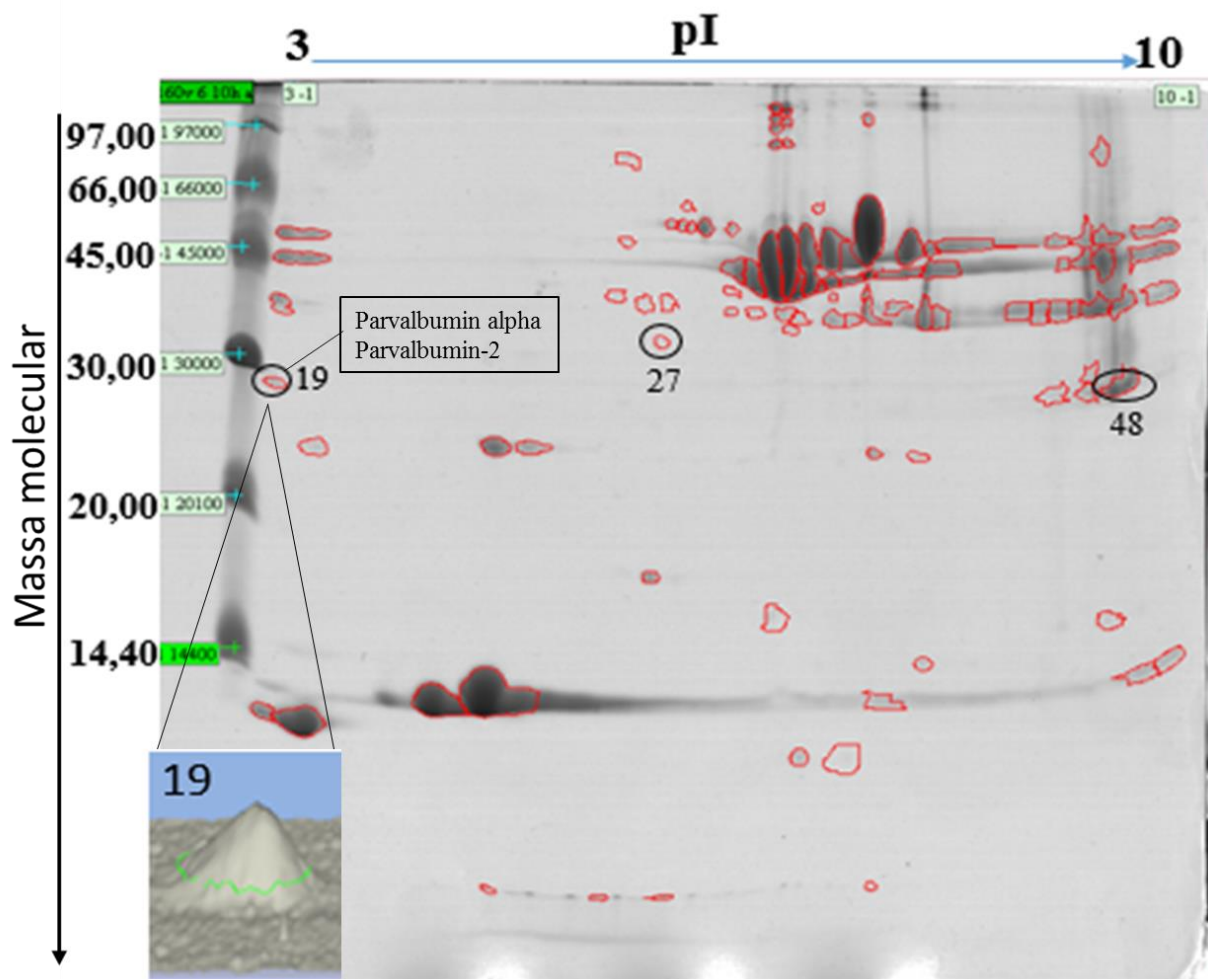


Figura 25. Gel obtido na corrida eletroforética do *pool* do tecido muscular do Jaraqui. Em 3D está apresentado o *spot* onde foi possível identificar as isoformas da proteína parvalbumina alfa e parvalbumina 2 por ESI MS/MS. Destacado no retângulo na imagem, o nome da proteína identificada e seu *spot* correspondente. Todas as proteínas identificadas no gel apresentavam mercúrio no seu *spot* correspondente.

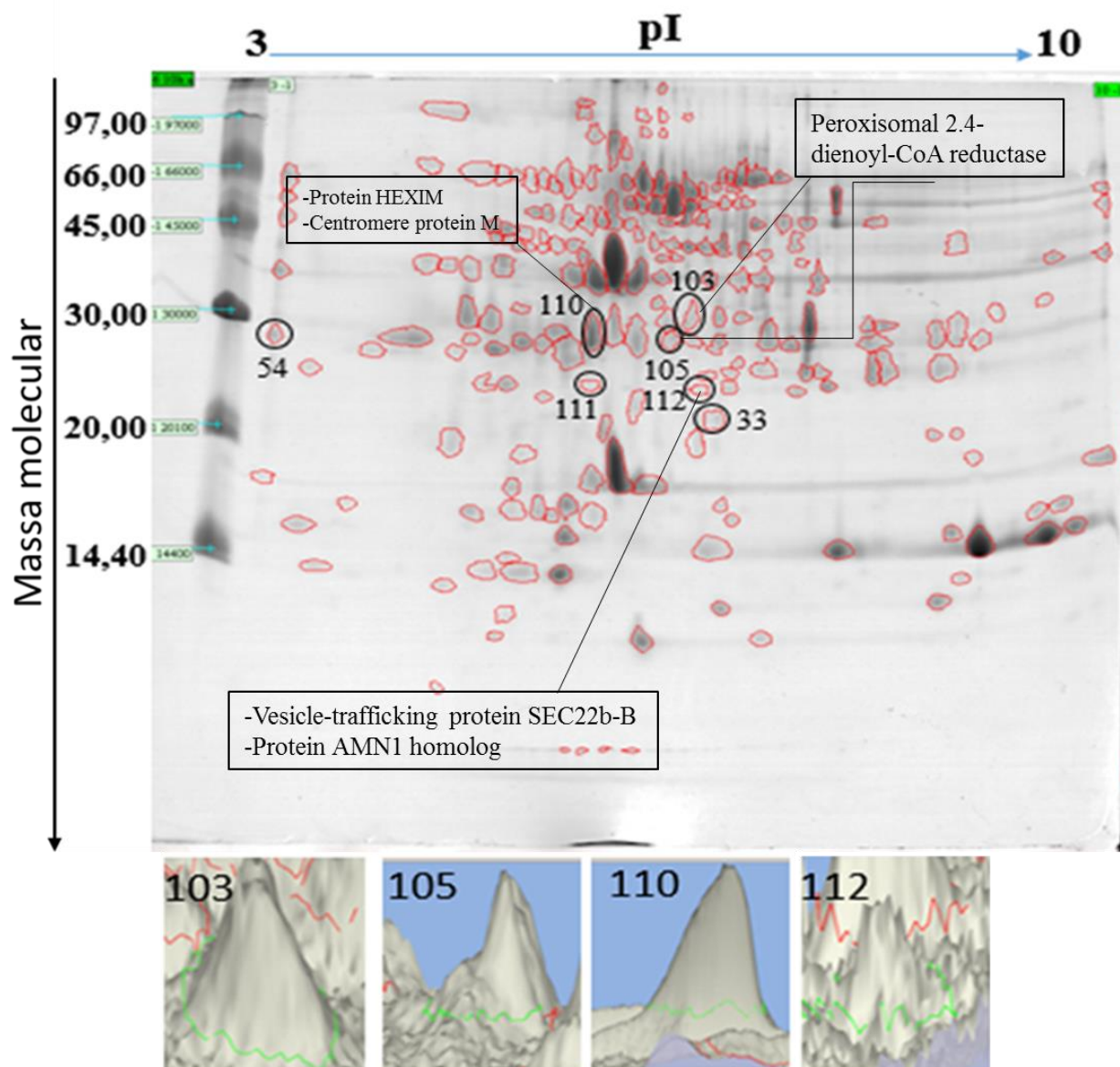


Figura 26. Gel obtido na corrida eletroforética do *pool* do tecido hepático do Jaraqui. Em 3D estão apresentados os *spots* onde foram possíveis identificarem as proteínas por ESI MS/MS. Destacados nos retângulos na imagem, o nome de cada proteína identificada e seu *spot* correspondente. Algumas proteínas foram identificadas em mais de um *spot* ou um mesmo *spot* apresentou mais de uma proteína. Todas as proteínas identificadas no gel apresentavam mercúrio no seu *spot* correspondente.

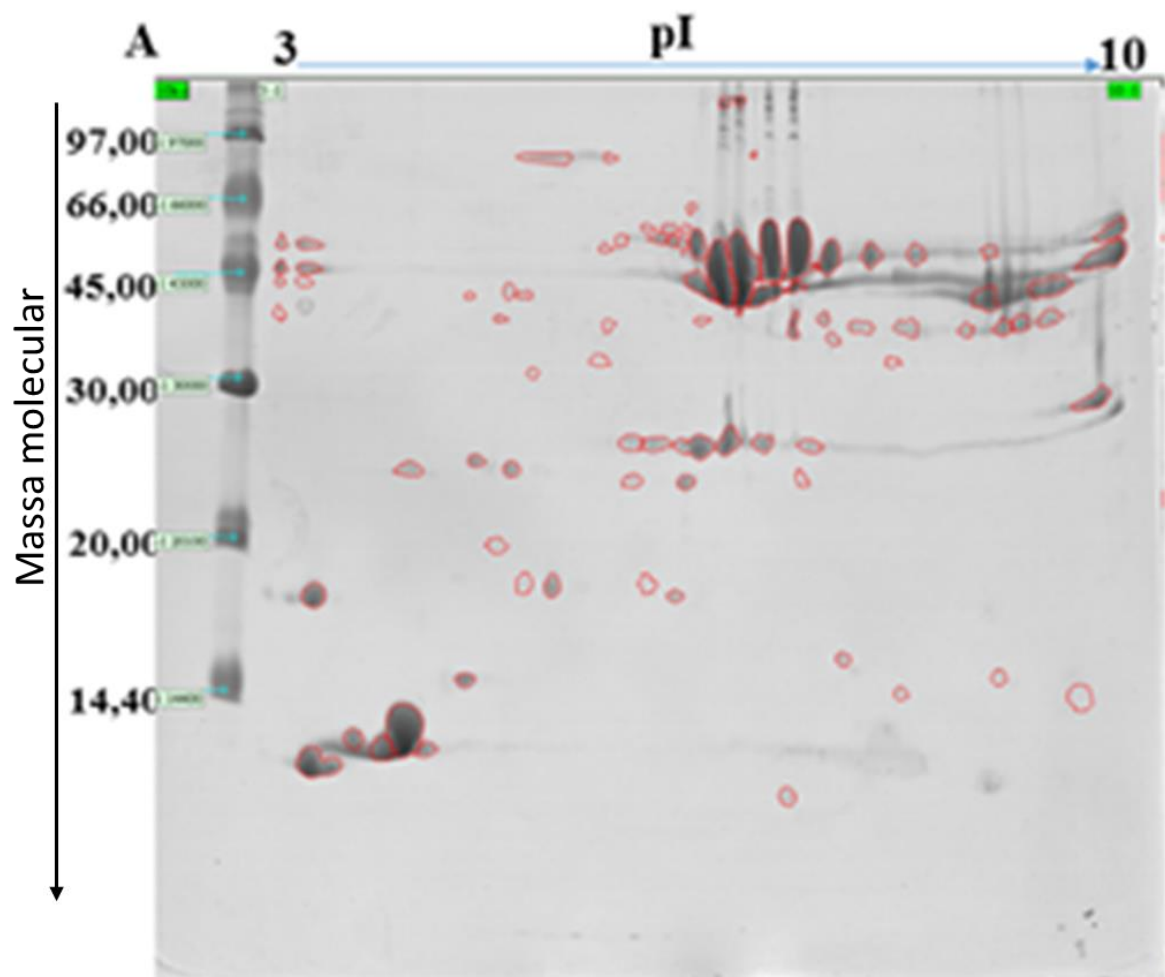


Figura 27. Gel obtido na corrida eletroforética do *pool* do tecido muscular do barba-chata. Nesse tecido, na faixa de proteínas analisadas não foi detectado mercúrio em nenhum *spot* proteico e por isso não houve interesse na identificação das proteínas.

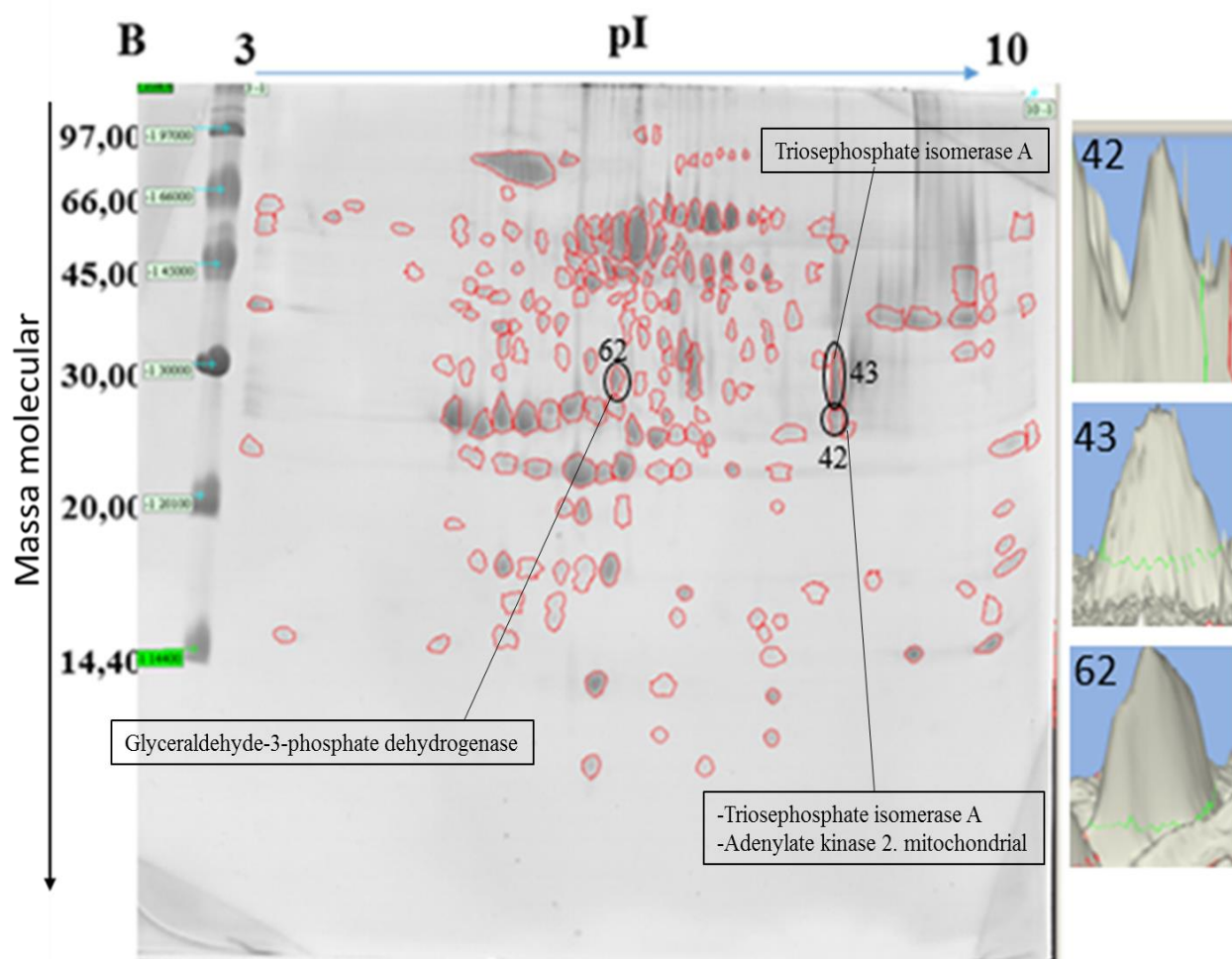


Figura 28. Gel obtido na corrida eletroforética do *pool* do tecido hepático do barba-chata. Em 3D estão apresentados os *spots* onde foram possíveis identificarem as proteínas por ESI MS/MS. Destacados nos retângulos na imagem, o nome de cada proteína identificada e seu *spot* correspondente. Algumas proteínas foram identificadas em mais de um *spot* ou um mesmo *spot* apresentou mais de uma proteína. Todas as proteínas identificadas no gel apresentavam mercúrio no seu *spot* correspondente.

Tabela 6. Análise de correlação dos géis com número médio de *spots* entre as corridas e correlação entre as repetições (n=3) dos géis das amostras (*pool*) das espécies de peixes estudadas.

Espécies de peixes estudadas	Tipo de tecidos	Número de Spots	Correlação Média Entre os Géis – (%)
Jaraqui	Muscular	97	94
	Hepático	207	99
Tucunaré	Muscular	97	93
	Hepático	185	98

Filhote	Muscular	125	93
	Hepático	145	97
Barba Chata	Muscular	88	100
	Hepático	190	96

6.3 Determinação de mercúrio nos spots proteicos

As concentrações de mercúrio nos *spots* proteicos obtidos nas corridas por 2D-PAGE com os *pellets* de menor massa molecular também foram determinadas utilizando-se o método por absorção atômica já citado anteriormente (MORAES et al., 2013). Essas determinações indicaram a presença de mercúrio nos *spots* proteicos destacados nas figuras 21-28. A tabela 6 mostra os valores de concentração de mercúrio determinados em cada *spot* proteico, com suas respectivas massas moleculares (Mm) e pontos isoelétricos (pI).

Analisando os resultados apresentados na tabela 7, pode-se observar que as concentrações de mercúrio nos *spots* proteicos apresentam valores na faixa de 5.50 a 1874.50 *ppb* (Tabela 7). No entanto, os resultados apresentados nessas tabelas não fornecem muitas informações sem que tenham sido identificadas as proteínas desses *spots* proteicos, por esse motivo, essas foram identificadas (Tabelas 8 a 14).

Tabela 7. Valores obtidos para concentração de mercúrio por GFAAS nos *spots* proteicos das amostras de tecido hepático e muscular de Jaraqui, Tucunaré, Filhote e barba chata.

Spots Proteicos	Massa Molar (kDa)	pI	Concentração de Hg (ppb)
JM 19	22.97	3.16	11.60
JH 103	29.17	6.52	24.00
JH 105	27.06	6.32	60.50
JH 110	27.44	5.62	54.50
JH 112	22.97	6.57	109.50
TM 9	17.61	7.8	127.50
TM 25	27.42	9.56	256.00
TM 30	32.30	8.49	30.00
TM 31	29.54	8.11	66.50
TM 32	33.11	7.68	109.50

TH 34	22.21	6.02	250.00
TH 56	32.26	5.31	787.50
TH 59	29.58	5.56	97.00
TH 67	29.17	6.52	11.50
TH 71	25.17	6.78	188.50
TH 81	25.38	8.00	115.50
FM 29	25.17	8.19	36.00
FM 34	25.17	7.06	11.50
FM 36	25.94	6.76	36.00
FH 42	22.29	6.28	24.00
FH 43	22.42	5.88	11.50
FH 45	23.08	4.86	42.00
FH 51	27.59	5.80	133.50
FH 58	25.02	6.92	30.00
BCH 42	25.84	8.23	1874.50
BCH 43	28.23	8.20	818.00
BCH 62	28.78	6.23	5.50

JM=Jaraqui musculo; JH= Jaraqui hepático; TM= Tucunaré musculo; TH =Tucunaré hepático; FM= Filhote musculo; FH=Filhote hepático e BCH=barba chata hepático.

Pode ser observado que em alguns dos *spots* foram encontrados maior quantidade de mercúrio (Tabela 7), isso deve a algumas das propriedades das proteínas que podem complexar maior quantidade de átomos de mercúrio [26]. Entre esses *spots* com maior quantidade de mercúrio (Tabela 7) estão: *spot* 25 de tecido muscular de Tucunaré (TM25) identificada a proteína *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (Tabela 8), o *spot* 34 de tecido hepático de Tucunaré (TH34) identificadas as proteínas *RING finger protein 145*, *Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 17*, *Protein Hook homolog 1* e *Coiled-coil domain-containing protein 40* e o *spot* 56 de tecido hepático de Tucunaré (TH56) identificada a proteína *Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1* (Tabela 9), no *spot* 42 do tecido hepático de Barba-chata (BCH42) identificadas as proteínas *Adenylate kinase 2, mitochondrial* e *Triosephosphate isomerase A* no *spot* 43 de tecido hepático de Barba-chata (BCH43), identificado a proteína *Triosephosphate isomerase A* (Tabela 14). A concentração de mercúrio mais elevada nessas proteínas pode ser atribuída

a estrutura de aminoácidos com atração para grupos metálicos (cisteína e metionina) que eles têm [86].

6.4 Identificacao das proteínas dos *spots* proteicos por ESI MS/MS

Os resultados obtidos na identificação das proteínas são mostrados nas tabelas 8 a 14. Foi possível identificar com sucesso 23 proteínas (Tabelas 8 a 14) em *spots* que apresentaram mercúrio e 24 proteínas livres de mercúrio (Tabelas 2 a 8 dos anexos) de um total de 290 *spots* proteicos analisados.

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 [26]. A veracidade da proteína caracterizada por ESI MS/MS foi feita considerando *score* e/ou cobertura maior que 50, também foram levados em conta os dados de massa molecular e pI obtidos por 2D-PAGE (experimental) em relação à massa molecular teórica obtida no banco de dados *Uniprot* [87]. As tabelas 8-14 apresentam os dados de caracterização obtidos na análise por ESI MS MS com a proteína identificada com base nas condições descritas acima. Em relação aos *spots* que não foram identificadas proteínas, pode ser explicado em função da concentração de proteína contida nesses *spots*.

Tabela 8. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de Tecido Muscular de Tucunaré (*Cichla spp*) (TM).

<i>Spot</i> <i>Gel</i>	<i>Proteína</i>	<i>Acesso</i>	<i>Score</i>	<i>pI/MM do</i> <i>spot</i>	<i>pI/MM</i> <i>teórica (Da)</i>	<i>Cobertura</i> <i>(%)</i>	<i>Peptídeos Sequenciados</i>
TM9	Actin. alpha skeletal muscle	ACTS_CARAU	142.792	7.8/17.61	5.23/41.971	9.81	SYELPDGQVITIGNER AVFPSIVGRPR
							GYSFVTTAER GYSFVTTAEREIVR
							KYSVWIGGSILASLSTFQQMWITK
TM9	Actin. cytoplasmic 1	ACTB_CYPCA	125.3451	7.8/17.61	5.30/ 41.753	7.2	SYELPDGQVITIGNER AVFPSIVGRPR
							GYSFVTTAER KYSVWIGGSILASLSTFQQMWITK
	Actin. cytoplasmic 2	ACTB2_DANRE	125.3451	7.8/17.61	5.30/41.753	7.2	SYELPDGQVITIGNER AVFPSIVGRPR
TM25	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	141.5905	9.56/27.42	8.19/35.784	8.41	VPTPNVSVVDLTVR LVTWYDNEFGYSNR GASQNIIPASTGAAK
TM30	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	495.3817	8.49/32.30	8.19/35.784	8.41	VPTPNVSVVDLTVR LVTWYDNEFGYSNR
TM31	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	1150.354	8.11/29/54	8.19/35.784	8.41	VPTPNVSVVDLTVR LVTWYDNEFGYSNR
TM32	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_DANRE	103.2472	7.68/33.11	6.83/36.246	6.31	VIGSGTNLDSAR VVVVTAGAR

Tabela 9. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de Tecido Hepático de Tucunaré (*Cichla spp.*) (TH).

<i>Spot</i> Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do <i>spot</i>	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
TH34	RING finger protein 145	RN145_DANRE	51.7401	6.02/22.21	5.94/77.649	2.48	SAVITPCSHFFHAACLK
TH56	Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1	CPPED_DANRE	197.5134	5.31/32.26	5.19/35.050	7.44	AVFSGHYHR NAGGCHDGLDMVVSSAVGCQLGDDTHGVR QAVQAINKLQPKPR FSGHYHR
TH59	Heme transporter hrg1-A	HRG1A_DANRE	142.8523	5.56/29.58	9.41/ 16.627	31.25	QQSLTDPTSLYLSCVWSFMSLK VGYS CMGMLVGFS AFLVWNIAYK
TH67	Thyroid hormone receptor alpha-A	THAA_DANRE	61.0977	6.52/29.17	6.68/ 48.728	20.14	VECPTELPPLFLEVFE DQEGSTGVAAQEDGSCLR FLPEDIGQSPAPTS DNDK CQEMYLLAFEHYINHR SLSQFNLD DSEVALLQAVLLMSSDRSGLTCVEK
	Pro-thyrotropin-releasing hormone	TRH_CARAU	61.0095	6.52/29.17	5.87/ 26.597	25.11	LCEDWDVTGCDQASILLELLDNVNK LSLEHMMLEEPTAQSELAK ELHEAAGDFSDLAK
TH 71	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	386.119	6.78/25.17	6.45/26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	386.119	6.78/25.17	4.90/ 26.853	5.24	GAFTGEISPAMIK
TH 81	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	883.5941	8.00/25.38	6.45/26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	883.5941	8.00/25.38	4.90/ 26.853	5.24	GAFTGEISPAMIK

Tabela 10. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido Muscular de Jaraqui (*Semaprochilodus sp.*) (JM).

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
JM 19	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPCA	252.6334	3.16/22.97	4.43/11.451	10.09	LFLQNFSAGAR
	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	252.6334	3.16/22.97	4.46/11.622	10.09	LFLQNFSAGAR

Tabela 11. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido Hepático de Jaraqui (*Semaprochilodus sp.*) (JF).

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
JH103	Peroxisomal 2.4-dienoyl-CoA reductase	DECR2_DANRE	1197.206	6.52/2917	7.73/ 31.999	13	VNTVAPGPISGTEGYRR VNTVAPGPISGTEGYR HLAVEWGPGSGVR HGCDTVIASR VNTVAPGPISGTEGYRR
JH105	Peroxisomal 2.4-dienoyl-CoA reductase	DECR2_DANRE	1083.771	6.30/26.91	7.73/ 31.999	13	VNTVAPGPISGTEGYRR VNTVAPGPISGTEGYR HLAVEWGPGSGVR HGCDTVIASR
JH110	Protein HEXIM	HEXIM_DANRE	91.7695	5.65/27.06	5.04/ 36.219	9.09	VRELEVEVEK AENNELLK RDSECAAVNTDGVSDGR GLPVAPYNTTQFLMEEHDR
	Centromere protein M	CENPM_DANRE	76.1071	5.65/27.06	6.37/ 20.493	16.67	TADGVSAAALR SLQSAESSLSHLHSDCFLGK

JH112	Vesicle-trafficking protein SEC22b-B	S22BB_DANRE	109.369	6.57/22.65	9.02/ 24.689	34.42	CTLEAGSMSFHYVIEK LAFAYLEDLQAEFHEQHGK GEALSALDSK LADGLPLAASMQEDEQMGRDLQQYQSQAK LAFAYLEDLQAEFHEQHGKK
	Protein AMN1 homolog	AMN1_DANRE	84.2134	6.57/22.65	7.48/ 27.112	12.05	MLHSIYFSGTEVTDQGVIGLATGVCSCSLK MLPASVK

Tabela 12. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido Muscular de Filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*) (FM).

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM Teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
FM29	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	858.7246	8.19/25.17	6.45/ 26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	858.7246	8.19/25.17	4.90/ 26.853	5.24	GAFTGEISPAMIK
FM34	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	143.3486	7.06/25.17	4.90/ 26.853	10.89	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK
FM36	ATP synthase subunit beta. mitochondrial	ATPB_CYPKA	53.5448	6.76/25.94	5.05/ 55.247	5.98	VLDTGAPIR IPVGPETLGR LGAVGR TIAMDGTEGLVR VALVYQGMNEPPGAR

Tabela 13. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido Hepático de Filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*) (FH).

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
FH42	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	2942.138	6.28/22.29	4.90/ 26.853	35.08	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK VIADNVKDWTR LEEREAGTTEDVVFEQTK GWLRANVSDAVADSVR TASPEQAQEVHEKLR
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	1327.544	6.28/22.29	6.45/ 26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
FH43	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	2751.538	5.88/22.42	4.90/26.853	16.94	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	1101.647	5.88/22.42	6.45/26.828	11.29	GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK
FH45	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1621.209	4.86/23.08	4.90/26.853	10.89	GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSER
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	1044.443	4.86/23.08	6.45/ 26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
FH51	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	664.4615	5.80/27.59	4.90/ 26.853	10.89	GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSER
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	637.1514	5.80/27.59	6.45/ 26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK

	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	2474.652	6.92/25.02	4.90/ 26.853	29.03	GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSER ELAAQADVDGFLVGGASLKPEFVDIINAR GWLRANVSDAVADSVR
FH58	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	2420.9	6.92/25.02	6.45/ 26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GBLP_DANRE	95.7524	6.92/25.02	7.60/35.123	10.09	QIVSGSRDK DGQAMLWDLNEGK YWLCAATGPSIK VWNLANCKLK

Tabela 14. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido Hepático de Barba-Chata (*Pinirampus pinirampu*) (BCH).

<i>Spot</i> Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do <i>spot</i>	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
BCH42	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	564.9169	8.23/25.84	4.90/ 26.853	9.68	DCGIDWVILGHSER IGVAAQNCYK
	Adenylate kinase 2. mitochondrial	KAD2_DANRE	57.975	8.23/25.84	5.53/ 26.616	11.2	QAEMLDDLMEKR MAPSTQEDDTVSGIR MAPSTQEDDTVSGIRK QAEMLDDLMEKR SYHEEFHPPKEHMKDDVTGEPLIR
BCH43	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	167.025	8.20/28.23	4.90/ 26.853	5.65	DCGIDWVILGHSER
BCH62	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	164.7796	6.23/28.78	8.19/ 35.784	8.41	VPTPNVSVVDLTVR LVTWYDNEFGYSNR

Como pode ser visto nas tabelas 8-14, mesmo usando condições específicas para extração de MTs, estas não foram encontradas em nenhum dos *spots* analisados das quatro espécies de peixes estudadas, no entanto, foram encontradas outras proteínas que também são capazes de se ligar a esse metal e que provavelmente esteja fazendo a função de proteção do organismo contra a ação tóxica dos metais. Essa incidência de mercúrio ligado a proteínas de peixes amazônicos já havia sido encontrada em estudo anterior de Vieira et al, (2015) com algumas proteínas de massa molecular inferior a 20 kDa de três espécies de peixes (Jaraqui, Tucunaré e Filhote) [26]. Estudo de Braga et al., (2015) com tecido hepático de peixes Dourada proveniente do Rio Madeira também foi encontrado mercúrio ligado a proteínas, usando para extração destas, água ultrapura. No presente estudo, usando a metodologia para extração de MTs, a *Parvalbumin alpha* e *Parvalbumin 2* foram encontradas novamente no tecido muscular de Jaraqui ligada ao mercúrio em outra faixa de massa molecular (22 kDa). Independente da massa molecular ou das isoformas de parvalbumina, ela continua sendo encontrada em peixes amazônicos ligada ao mercúrio, podendo ao longo das investigações, se tornar um possível biomarcador desse metal tóxico em peixes e facilitar o monitoramento deste em seres que tem o peixe como sua fonte principal de alimentação. Como pode ser visto, comparando a estudos anteriores, independentemente do método de extração usado, o mercúrio se encontra associado a diversas proteínas das espécies de peixes amazônicos, tanto em algumas proteínas na faixa de 24 a 30 kDa, quanto em proteínas com massa molecular inferior a 20 kDa, no entanto, tanto usando extração com água ultrapura quanto solução extratora, metalotioneínas ainda não foram caracterizadas nos géis destas espécies de peixes estudadas. Como as metalotioneínas são expressas quando há concentrações elevadas de algum poluente como metais tóxicos, no caso do mercúrio, pode-se inferir que a concentração encontrada nas espécies de peixes estudadas (Tabela 4) não apresenta nível de toxicidade suficientes para que sejam expressas metalotioneínas, já que os valores encontrados em tecido muscular desses indivíduos não ultrapassam aos valores aceitáveis para alimentos de consumo humano estabelecidos pela ANVISA (0.5 mg kg^{-1} até 1.0 mg kg^{-1}) [20, 90]. Para a concentração de mercúrio no tecido hepático de pescado, ainda não tem uma normativa que estabeleça um valor aceitável para consumo, até porque o fígado de peixe não tem muito interesse culinário nos centros comerciais, no entanto, a população ribeirinha tem o hábito de consumir esse órgão do pescado, principalmente dos peixes de grande porte como dourada e Filhote.

Estudos disponíveis na literatura mostram a identificação de metalotioneínas em espécies de peixes marinhos, moluscos, plantas, entre outros, capturados em águas contaminadas com cádmio, cobre ou até mesmo zinco em grande quantidade no ambiente. Para quantificar a MT nesses estudos, géis de SDS são feitos usando padrões conhecidos de metalotioneínas, no entanto, podem haver falhas, já que nesses estudos as bandas não são caracterizadas. Esses métodos utilizados nos estudos para detecção de MTs baseiam-se na identificação de grupos sulfidrilas das moléculas de proteínas e como muitas destas possuem grupos sulfidrilas em sua estrutura, pode gerar falsas MTs [30, 35, 38, 82, 91–99]. O estudo de Marcirella et al. (2016), correlacionou o nível de mercúrio com a identificação de MTs em Zebrafish, após 96 horas de exposição ao cloreto de mercúrio em doses que variavam de 7.7 a 38.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ HgCl_2 , observaram o aumento dos níveis de MTs no fígado acompanhado de alterações morfológicas no parênquima hepático, grandes áreas de lise, vacuolização intensa do citoplasma e uma diminuição no conteúdo de ambas as gotículas lipídicas e grânulos de glicogênio, além de alterações nas células endoteliais, retículo endoplasmático, entre outras [100]. No entanto, as MTs foram quantificadas por métodos de imunolocalização, não sendo identificadas por MS para confirmação. Como o método baseia-se em marcar alguns grupos das proteínas (cisteínas, por exemplo), pode haver interferência de outras proteínas que contêm esses aminoácidos, apresentando falsas MTs. Estudos de Gentès et al. (2015) detectaram presença de MTs, assim como aumento destas a medida que aumentou a concentração de Hg, entretanto essas MTs também não foram caracterizadas [101], assim como estudo de Oliveira et al., 2015 que utilizou métodos colorimétrico usando reagente de Ellman's e GSH como padrão de referência. [102]. Outra questão que pode ser levada em consideração é a concentração de mercúrio que esses animais são expostos em experimentos controlados, o que acaba sendo muitas vezes maior do que o encontrado na natureza. Tal vez essa seja a principal razão da produção de MTs em experimentos controlados. Peixes do Rio Madeira, apesar de alguns apresentarem concentrações de mercúrio relativamente altas ($1219 \pm 15 \mu\text{g kg}^{-1}$ no fígado de Tucunaré), não chega a ser tão severas como aquelas que os animais experimentais são submetidos. Nossos resultados foram baseados em dados de análises de espectrometria de massas (Tabela 8 a 14), onde todos os *spots* que poderiam ser uma eventual MT foram identificados. Além disso, o fracionamento das proteínas foi feito por eletroforese bidimensional (2D-PAGE), técnica que favorece a separação, deixando-as mais evidentes e com maior nitidez.

6.5 Descrição das proteínas encontradas nos *spots* de tecido muscular e hepático de cada espécie.

Actin. alpha skeletal muscle

Actinas são proteínas altamente conservadas, essenciais às células eucarióticas, possuem uma importante função na manutenção da estrutura do citoesqueleto, mobilidade e divisão celular, movimentos intracelulares, processos contráteis, integridade celular, polimerização em presença de sal neutro, além de se ligar ao Ca^{2+} e Mg^{2+} [87]. Nos vertebrados, foram identificados 3 grupos principais de isoformas de actina (alfa, beta e gama). Actina alfa é encontrada no musculo esquelético como principal constituinte do aparelho contráctil, juntamente com miosina e envolve principalmente a regulação da contração e relaxamento muscular através de interações mediadas por proteínas reguladoras, como a troponina e tropomiosina [103] já as isoformas beta e gama coexistem na maioria dos tipos de células como componentes do citoesqueleto e como mediadores da motilidade celular interna [104]. Essas isoformas de actinas foram identificadas no *spot* 9 do musculo de Tucunará (TM9), (Tabela 8) onde também foi verificado a presença de mercúrio (Tabela 7). Por essa proteína e suas isoformas se ligarem ao Ca^{2+} e Mg^{2+} que são elementos divalentes, a ligação com mercúrio inorgânico, pode ocorrer, já que este também é divalente e tem grande afinidade por sítios de ligação onde se ligam outros elementos químicos com essas mesmas propriedades [26].

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH) é uma enzima chave na glicólise, catalisa o primeiro passo da via através da conversão de D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em fosfato de 3-fosfo-D-glyceroyl, modula a organização e montagem do citoesqueleto, além de participar de eventos nucleares, incluindo a transcrição, o transporte de RNA, replicação do DNA e apoptose. A Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase é uma enzima de aproximadamente 37 kDa, que sob condições celulares normais, pode ser encontrada como tetrâmero formado por quatro subunidades idênticas contendo um único grupo tiol catalítico [87]. Essa enzima foi encontrada nos *spots* TM25, TM30 e TM31 de tecido muscular de Tucunará (tabela 8) e BCH62 no tecido hepático de Barba-chata (Tabela 14) onde foi detectado a presença de mercúrio (Tabela 7). Essa enzima tem um grupo tiol fazendo parte de sua estrutura, o que possibilita a interação desse elemento tóxico à proteína. Além disso, essa proteína tem aminoácido metionina que tem afinidade por metais [63].

L-lactate dehydrogenase A chain

A Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima encontrada em uma variedade de indivíduos e funciona como enzima chave do metabolismo dos glicídios. Em aerobiose (no fígado), transforma o lactato em piruvato que será em seguida utilizado na gliconeogênese. Em anaerobiose (no músculo), faz efeito contrário, libertando energia sob a forma de ATP. Seus níveis são elevados numa grande variedade de patologias, sobretudo em doenças cardíacas e hepáticas, servindo como indicadora de condições fisiológicas ou estruturais alteradas [105]. Esta enzima desempenha um papel importante em condições de estresse ocasionado por agentes químicos, e têm sido objeto de estudos devido à alteração de sua atividade em organismos aquáticos sob exposição aguda ou crônica a agroquímicos [106, 107]. O *spot* TM32 (Tabela 8) do tecido muscular de Tucunaré, onde foi detectado mercúrio (Tabela 7), foi identificado como sendo essa enzima. O fato dessa enzima já ser citada como indicador de patologias e em alguns relatos, marcador de toxicidade causado por poluentes aquáticos em peixes, pode explicar o aparecimento do mercúrio encontrado ligado a ela nessa espécie de peixe que, pelo que foi visto anteriormente, tem uma taxa considerável de mercúrio em seus tecidos.

RING finger protein 145

RING finger protein 145 é uma proteína de membrana, pouco citada na literatura. Estudos com Zebrafish, caracterizou ring finger protein 145 como componente integral da membrana, ligada a íons zinco [87]. Essa proteína foi caracterizada no *spot* TH34 de tecido hepático de peixe Tucunaré (Tabela 9) onde foi quantificado mercúrio ligado a esse *spot* proteico (Tabela 7). O fato dessa proteína se ligar a íons de Zn pode explicar a presença de mercúrio inorgânico ligada a ela, pois esse tem características parecidas, sendo o mercúrio mais eletroafinitivo que o Zn, podendo ocupar facilmente seu lugar na ligação. Além disso, é uma proteína que tem em sua estrutura aminoácidos cisteína que tem muita afinidade a metais divalentes.

Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1

As proteínas serina/treonina fosfatases compreendem duas famílias de genes chamados PPP e PPM. As proteínas fosfatases desta subfamília compreendem a família PPP de proteína ser/Thr fosfatases, que se divide em seis subtipos PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5 e PP7, baseados nas suas características bioquímicas, sensibilidade a inibidores e substratos específicos.

Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1 está envolvida na desfosforilação da família AKT quinase. Para realizar seu processo de catalise, ela precisa de íons divalentes (magnésio, cobalto ou manganês) como cofator metálico. O balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares, como hormônios, mitógenos, carcinógenos, citocinas, neurotransmissores, substâncias ou metabólitos tóxicos. Em consequência à ação destes efetores ocorre regulação da divisão, diferenciação, desenvolvimento e morte celular, regulação do metabolismo, expressão gênica, contração, transporte, aprendizado e memória. Muitas vias de sinalização celular são reguladas por fosforilação/desfosforilação de proteínas. Aproximadamente 30% das proteínas celulares são fosfoproteínas. Em células eucarióticas, a maioria da fosforilação de proteínas ocorre em resíduos de tirosina, serina e treonina, catalisada por proteínas quinases [108]. Análise do *spot* TH56 de tecido hepático de Tucunaré apresentou mercúrio (Tabela 7), sendo esse mesmo *spot* identificado *Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1* (Tabela 9). O fato dessa proteína se ligar a íons metálicos divalentes como magnésio, cobalto ou manganês, que apresenta característica similares ao mercúrio inorgânico, poderá explicar essa interação mercúrio/*Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1* encontrada nesse *spot* proteico. Além disso, a molécula ainda conta com grupos amino e hidroxilas que teoricamente podem reagir com mercúrio. Os aminoácidos cisteínas e metionina presentes em sua estrutura podem favorecer ainda mais essa associação mercúrio/proteína.

Heme transporter hrg1-A

Heme é um grupo prostético que consiste de um anel de protoporfirina e um átomo de ferro. Uma vez que a membrana celular não é livremente permeável para o heme, é necessário atribuir certos transportadores heme em localizações e orientações apropriadas nas células [109]. Uma das funções desses transportadores é encaminhar o grupo heme, resultante de hemácias senescentes, para reciclagem de ferro que será utilizado na produção de novos glóbulos vermelhos [110]. A expressão heme transporter *hrg1-A* já foi verificada em diversos tecidos, sendo altamente expressa no cérebro, rim, coração e músculo esquelético e moderadamente expressa no fígado, pulmão, placenta e intestino delgado [111]. No Tucunaré, *Heme transporter hrg1-A* foi encontrado no *spot* TH59 de tecido hepático (Tabela 9). Nesse *spot*, foi encontrado mercúrio nas análises por GFAAS

(Tabela 7). Como essa proteína contém aminoácidos metionina e cisteína em sua estrutura, o mercúrio pode estar ligado a eles. Como o mercúrio é tóxico, pode causar depleção de *Hrg1* em macrófagos comprometendo a o sistema imune e provocar a atenuação do transporte de heme a partir do compartimento fagolisossômico [86].

Thyroid hormone receptor alpha-A

Os hormônios da tireoide têm papel essencial na regulação fisiológica de diferentes tecidos, bem como na taxa metabólica geral, no nível de colesterol e no ritmo cardíaco. Os alvos dos hormônios da tireoide são os receptores da tireoide (TRs), que pertencem a superfamília de receptor nuclear (NR). Duas classes principais de receptores TR são conhecidos, TRa e TRb, cada um dos quais é expresso em várias isoformas (TRa-1, 2-TRa, TRb-1, TRb-2). As isoformas TR são expressos em diferentes níveis nos diferentes tecidos; a isoforma TRa-1 é dominante no coração (70%), enquanto a isoforma TRb-1 é dominante no fígado (80%). Receptores hormonais da tireoide são essenciais para o bom desenvolvimento inicial do sistema nervoso central (SNC), e sua produção é regulada pelo sistema de *feedback* hipotálamo-hipófise-tireoide, revisado por [112]. Ausência do hormônio da tireoide durante o estágio de blástula acarreta em desenvolvimento tardio, já que este atua como um repressor da transcrição e reprime a sinalização do ácido retinóico (AR) durante as fases de desenvolvimento blástula e gástrula. Suas funções moleculares são: ligação ao DNA, receptor da atividade hormonal da tireoide e ligação a íons de Zinco [87].

Recentemente, zebrafish foi introduzido como um novo modelo não-mamíferos para facilitar a manipulação, dissecação e análise genética de atividades do *Thyroid hormone* durante o desenvolvimento [113, 114]. Manipulação dos níveis de *Thyroid hormone* forneceram evidências de que esses são de particular importância durante as transições embrionária-larval e larva-juvenis [115]. Perturbação química da produção de *Thyroid hormone* em embriões de Zebrafish resulta no crescimento atrofiado de larvas, retardo no desenvolvimento da cartilagem da cabeça, cauda enrolada, mudanças na distribuição e estrutura dos melanóforos, e prejudica o desenvolvimento do timo [114–117]. Já quando embriões de zebrafish foram tratados com *Thyroid hormone* exógenos o desenvolvimento do tamanho corporal foi afetado, assim como retardamento do desenvolvimento do sistema gastrointestinal e comprometimento do tamanho dos melanóforos [114]. Estudos também mostraram que a ausência completa ou altas

concentrações de *Thyroid hormone* durante a embriogênese de Zebrafish é letal [113]. Esse hormônio foi caracterizado no *spot* TH67 (Tabela 9) onde foi detectado mercúrio (Tabela 7). Devido ele se ligar ao zinco e apresentar cisteína e metionina em sua estrutura, o mercúrio pode estar ligado a esses aminoácidos ou deslocando o zinco e ligando ao seu lugar na proteína [26].

Pro-thyrotropin-releasing hormone

Pro-hormônio libertador da tirotropina (proTRH) é o precursor do hormônio de libertação da tirotropina (TRH; pGlu-His-Pro-NH₂) [118]. TRH é produzido no núcleo paraventricular do hipotálamo, estimula a biossíntese e a secreção do hormônio estimulador da tireoide (TSH) a partir da pituitária anterior. TSH, por sua vez, estimula a biossíntese e liberação do hormônio da tireoide, desta forma, TRH exerce papel central na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HPT) [87]. Outros hormônios como prolactina, hormônio do crescimento, vasopressina, insulina e neurotransmissores clássicos como noradrenalina e adrenalina também são liberados por ação do TRH. Além disso, TRH está presente em vários locais fora do hipotálamo, apoiando potencial papel de neuromodulador ou neurotransmissor fora da função tradicional do eixo HPT. TRH também foi encontrado fora do sistema nervoso central (SNC) no trato gastrointestinal, pâncreas, tecidos reprodutores incluindo placenta, ovário, testículo, vesículas seminais, próstata, retina, e os elementos do sangue. A distribuição generalizada de TRH dentro e fora do CNS suporta uma grande variedade de funções para esta molécula, como revisado em [119]. Sua estrutura é composta por aminoácidos como glutamina, lisina e arginina que são ricos em grupos amina, hidroxilas e ácidos que podem se ligar a metais como o mercúrio. Em nossos estudos, esse hormônio foi caracterizado no *spot* TH67 de tecido hepático de Tucunará (Tabela 9), mesmo *spot* que foi detectado mercúrio nas análises por GFAAS (Tabela 7), mostrando uma possível interação do mercúrio com esse hormônio.

Triosephosphate isomerase

Triosefosfato isomerase (TIM) é uma enzima central na via glicolítica, catalisa a isomerização de dois produtos da reação de aldolase, D-gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato [120]. Uma de suas ações é assegurar um rendimento líquido positivo de ATP a partir da oxidação de glicose para piruvato, sendo absolutamente essencial para eficiente produção de energia [120, 121]. TIM é uma proteína representada pela isoformas α/β , com sítio ativo altamente conservado em todos os reinos apresentando

três resíduos catalíticos (Lys9, His89, e Glu137) [122]. Possui ampla funcionalidade devido ao grande número de cofatores, dentre eles metais, nucleotídeos e aminoácidos que coopera com sua atividade; algumas superfamílias TIM usam cofatores como ferro, enxofre e zinco [123]. Não há relato de casos de organismos desprovidos da triosefosfato isomerase, mas pessoas com deficiência no gene responsável por sua codificação apresentam anemia hemolítica crônica, cardiomiopatia e desordens neuromusculares [121, 124]. Os *spots* TH71 e TH81 de tecido hepático de Tucunaré (Tabela 9), FM29 e FM34 de tecido muscular de Filhote (Tabela 12), FH42, FH43, FH45, FH51 e FH58 de tecido hepático de Filhote (Tabela 13), BCH42 e BCH43 de tecido hepático de Barbachata (Tabela 14) foram identificado como sendo essa proteína, sendo nesses mesmos, detectado presença de mercúrio (Tabela 7). Como essa proteína e suas isoformas se ligam ao Ferro, zinco e tem grupos sulfidrila em suas estruturas, íons de mercúrio podem se ligar a esses grupos com facilidade, já que, o mercúrio tem maior afinidade pelos sítios ativos de ligação do Zinco a proteína.

Parvalbumin

A *Parvalbumin*, é uma proteína da família das albuminas, no músculo está envolvida no relaxamento e contração muscular e desempenha importantes papéis fisiológicos, tais como a regulação do ciclo celular, síntese de mensageiros secundários e organização dos microtúbulos. É uma proteína *Metal-binding*, inicia sua cadeia com o aminoácido metionina e se liga a dois íons de cálcio [87]. A esta família de parvalbumina pertence as isoformas α e β que possui três sítios de ligação, dos quais, dois se liga ao Ca e Mg [125]. Parvalbumina também é conhecida por ser uma proteína de peixe que causa alergia em humanos. Essa proteína consiste de uma única cadeia polipeptídica formada por 95 a 113 resíduos de aminoácidos, dependendo da isoforma e está estruturalmente relacionada com a troponina C. Parvalbumina é composta por três domínios (AB, CD, EF) muito semelhantes uns aos outros, cada um dos quais contém uma *helix-loop-helix*. O domínio AB tem uma supressão de dois aminoácidos comparando aos outros domínios [125]. As isoformas *alpha* e 2, foram caracterizadas no *spot* JM19 de musculo de Jaraqui (Tabela 10), sendo nesse mesmo *spot* identificado com presença de mercúrio (Tabela 7). Como a parvalbumina é uma proteína que se liga a íons cálcio e Magnésio, sua ligação ao mercúrio também poderá ocorrer, já que este também tem propriedades químicas semelhantes como por exemplo, ser um metal divalente. Essa proteína e suas isoformas

também já foram encontradas anteriormente ligadas ao mercúrio em peixes amazônicos [26].

Peroxisomal 2.4-dienoyl-CoA reductase

Peroxisomal 2.4-dienoyl-CoA reductase é uma enzima auxiliar de beta-oxidação e tem sido observada em todas as espécies sendo uma enzima dependente de NADPH. Em mamíferos, esta enzima parece ter diferentes isoformas que são encontradas nas mitocondriais e peroxisomos. Em ratos, a oxidação do ácido docosahexanóico em peroxissomos é dependente da presença de NADPH. Além dessas funções, é conhecida sua participação em metabolismo de ácidos graxos [87]. Essa enzima foi caracterizada nos spots JH103 e JH105 de tecido hepático de Jaraqui (Tabela 11), que também apresentaram mercúrio (Tabela 7). Como pode ser observado, essa proteína tem aminoácidos cisteína em sua estrutura, favorecendo a interação mercúrio/proteína, também é uma enzima que participa do metabolismo de ácidos graxos que já foi descrito em estudos a interação de metais tóxicos e agrotóxicos ligados a lipídeos nos animais que tiveram contato com esses elementos tóxicos [126, 127].

Protein HEXIM

A *protein HEXIM* funciona como um provável regulador transcricional, inibindo a transcrição de RNA polimerase II. Até agora, duas proteínas HEXIM foram identificados, e HEXIM1 e HEXIM2. Essa proteína foi identificada vinculada a 7SK e consiste em uma estrutura conservada rica em arginina, localizada no meio da molécula. Além disso, a proteína HEXIM apresentam extensões de resíduos ácidos. Uma propriedade importante da HEXIM é sua capacidade de formar dímeros nas células. As interfaces de dimerização compreendem um espiral enrolado bipartido no C-terminal [128]. Apesar de ainda pouco conhecida suas funções, sabe-se que ela participa de alguns processos biológicos como: promotor de regulação negativa da transcrição de RNA polimerase II e transcrição modelada por DNA [87]. Suas funções moleculares são reduzir a atividade de uma proteína serina/treonina quinase dependente da ciclina e interagir seletivamente de forma não covalente com um snRNA [87]. No spot JH110 (Tabela 11) foi detectado presença de mercúrio (Tabela 7) e identificado proteína HEXIM. Essa proteína tem em sua estrutura metionina, cisteína e arginina que são aminoácidos ricos

em aminos além de apresentar grupos carboxílicos. O mercúrio pode estar ligado a esses grupos [63].

Centromere protein M

Centromere protein M (CENP-M) é um provável componente de um complexo centromérico envolvido na montagem de proteínas cinetócoro, progressão da mitose e segregação cromossômica [87]. CENP-M está estruturalmente e evolutivamente relacionadas com pequenas GTPases e crucial para a montagem e a estabilidade de um tetrâmero onde também compreende CENP-I, CENP-H, CENP-K [129]. Suas funções no organismo ainda não são bem compreendidas, apesar de ter sido caracterizada em Zebrafish e humanos. Essa proteína foi caracterizada no *spot* JH110 (Tabela 11) onde foi detectado mercúrio (Tabela 7). Sua relação com metais ainda não foi definida na literatura, no entanto, em sua estrutura molecular está presente aminoácidos como a cisteína que pode se ligar ao mercúrio.

Vesicle-trafficking protein SEC22b-B

A *vesicle-trafficking protein SEC22b-B* está envolvida com SNARE (*soluble NSF attachment receptor*) envolvidas no direcionamento e fusão de vesículas de transporte derivado do retículo endoplasmático (RE) para o complexo de Golgi, bem como transporte retrógrado de vesículas derivadas do complexo de Golgi para o RE. Os processos biológicos que essa proteína está envolvida são, transporte de proteína e mediador de transporte de vesículas. *Vesicle-trafficking protein SEC22b-B* é uma proteína de membrana de passagem única do tipo IV, encontrada na membrana endoplasmática do compartimento intermédio do complexo de golgi e no retículo endoplasmático. Está envolvida no transporte de várias proteínas, entre elas lactoferrina. Essa proteína foi caracterizada no *spot* JH112 (Tabela 11) onde foi encontrado mercúrio (Tabela 7). O fato dela está envolvido no transporte de vários componentes dentro da célula, entre eles a proteína lactoferrina, pode facilitar o transporte do mercúrio ligado a esses compostos. Ela também apresenta aminoácidos como metionina e cisteína que tem afinidade para metais como o mercúrio.

Protein AMN1 homolog

AMN1 homolog é uma proteína rica em leucina, envolvida no ciclo celular. Em espécies aquáticas, foi caracterizada em Zebrafish e em nossos estudos na espécie de peixe Jaraqui. Sua função em peixes não é bem conhecida mas acredita-se que seja semelhante as funções que ela exerce em humanos. Estudos com humanos relata proteína *Amn1* induzida apenas depois da ativação mitótica e atua de modo a inibir a saída da mitose por ligação a Tem1 e facilitando a inativação de Cdc14. Após o reestabelecimento das células, a proteína *Amn1* é rapidamente destruída. *Amn1* e Cdc15 compete pela ligação a Tem1. A falha na inibição desta interação resulta em interrupção de ambas e na montagem do fuso e orientação nuclear [87, 130]. A *AMN1 homolog* proteína foi caracterizada no *spot* JH112 (Tabela 11) onde foi encontrado mercúrio (Tabela 7). Como ela apresenta grupos ácidos, metionina, cisteínas e aminas na sua estrutura, o mercúrio poderá estar ligado a esses grupos.

Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 37

Proteínas destinadas à degradação pelo sistema *ubiquitina-proteassoma* são marcados por uma cadeia de ubiquitinas através de uma série de passos de conjugação de enzimas E1, E2 e E3, respectivamente [131]. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 37 (UCH37 ou UHCL5) é uma deubiquitinase que cliva ubiquitina em seu terminal carbonila Gli-76, suprimindo a degradação de proteína através de desmontagem da cadeia de poliubiquitina a partir da subunidade distal da cadeia [131–133]. [133]. Deubiquitinase antagoniza o complexo de promoção da anafase (APC/C) durante a transição G1/S mediando desubiquitinação de proteínas alvo APC/C, promovendo, assim, a entrada na fase S. Especificamente medeia desubiquitinação de "cadeias poliubiquitina Lys-11'-ligados, um tipo específico de ligação-ubiquitina mediada pelo complexo APC/C. *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 37*, participa de atividade catalítica como, hidrólise dependentes de tioésteres, amida, peptídeos e ligações isopeptídicas formadas pela Gly C-terminal da ubiquitina (uma proteína de 76-resíduo ligado a proteínas, como um sinal de direcionamento intracelular), além de ter atividade endopeptidase do tipo cisteína dependente de cálcio [87]. Essa proteína foi caracterizada no *spot* FM34 de tecido muscular de Filhote (Tabela 12), neste *spot* foi encontrado mercúrio (Tabela 7). Como ela está envolvida com íons de cálcio, o mercúrio pode estar deslocando esses íons de cálcio e se ligando no seu sítio de ligação na proteína ou ligar em hidroxilas e grupos tiois da cisteína.

ATP synthase subunit beta. Mitochondrial

ATP sintase (F1F0 ATP sintase ou complexo V) é uma enzima que faz parte de um complexo enzimático de múltiplas subunidades no processo fosforilação oxidativa. A energia liberada pela transferência de elétrons nas membranas mitocondriais permite ATP sintase sintetizar ATP a partir de difosfato de adenosina (ADP) e fosfato inorgânico [134]. ATPases do tipo F consistem em dois domínios estruturais; F1 - contendo o núcleo catalítico extra membranar, e F0 - contendo o canal de prótons na membrana, ligados entre si por uma haste central e uma haste periférica. Possui subunidade beta e alfa que possuem 13 e 16 resíduos de tirosina, respectivamente [92]. ATP sintase possui funções moleculares que incluem transporte de prótons e ligação ao ATP e ao MHC classe I. Está envolvida em processos biológicos como angiogênese, processo de metabólicos lipídicos, organização mitocondrial e diferenciação de osteoblastos [87]. Essa enzima foi caracterizada no *spot* FM36 de tecido muscular de Filhote (Tabela 12). Esse mesmo *spot* apresentou mercúrio por análises de GFAAS (Tabela 7). Nessa enzima, o mercúrio pode estar ligado através dos grupos aminas e hidroxilas da adenosina, hidroxilas e ácidos carboxílicos das tirosinas ou metioninas, aminoácidos componente da sua cadeia.

Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1

Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 foi alternativamente nomeada de *Receptor of activated protein kinase C 1 (RACK1)*, sendo membro da família de proteínas ricas em triptofano-aspartato (*WD-repeat*) e partilha homologia significativa com a subunidade β das proteínas G [135]. Envolvidas no recrutamento, montagem e/ou regulação de uma variedade de moléculas de sinalização. Interage com uma vasta variedade de proteínas e desempenha um papel importante em muitos processos celulares. Necessário para a localização *VANGL2* da membrana, inibe a sinalização de *Wnt* e regula a proliferação celular e divisão celular orientado durante a gastrulação [87]. Essa proteína foi encontrada no *spot* FH58 de tecido hepático de Filhote (Tabela 13), *spot* que apresentou mercúrio (Tabela 7). Como essa proteína tem aminoácidos guanina que tem grupos aminas, metionina e hidroxilas, o mercúrio pode se ligar a eles através de uma ligação fraca ou se ligar a cisteína e como esse metal é tóxico, poderá comprometer a função da proteína.

Adenylate kinase 2, mitochondrial

Adenylate kinase 2 (AK2) catalisa a transferência reversível do grupo fosfato entre o ATP e AMP. Desempenha um papel importante na homeostase energética celular e no metabolismo de nucleotídeos adenina. AK2 é amplamente expresso em muitos tecidos e em todas as células hematopoiéticas, está localizado no espaço intermembranar das mitocôndrias regulando os níveis intracelulares de ATP por catalisar a transferência reversível de um grupo fosfato na reação de $ATP + AMP \leftrightarrow 2 ADP$ [136]. AK tem três domínios, chamada Core, tampa e NMP, e dois sítios de ligação distintos; especificamente, o ATP, que é complexado com íons de magnésio (Mg^{2+}), liga-se entre os domínios CORE e tampa, local de ligação do ATP, enquanto AMP se uni entre o núcleo e a NMP, local de ligação a AMP [137]. A atividade da adenilato quinase é fundamental para a regulação da utilização de fosfato e o amplificador de novas vias de biossíntese. Desempenha um papel fundamental na hematopoese [87]. Alteração da sua atividade pode conduzir a patologias graves tais como insuficiência cardíaca, câncer e doenças neurodegenerativas [137]. Essa proteína, assim como todas as outras encontradas e discutidas nesse estudo, já foram descritas anteriormente em Zebrafish e suas sequências peptídicas depositadas em banco de dados Uniprot. *Adenylate kinase 2, mitochondrial* foi caracterizada no *spot* BCH42 de tecido hepático de Barba-chata (Tabela 14), *spot* que apresentou mercúrio (Tabela 7). Como essa proteína se liga a íons de Magnésio, íons divalentes com características semelhantes ao mercúrio, esse pode ser substituído no seu sítio de ligação, dando lugar ao mercúrio. Além disso, o aminoácido metionina faz parte de sua cadeia, podendo estar envolvido nessa ligação ao metal.

6.6 Análises do Estresse Oxidativo

A concentração de proteínas totais dos extratos proteicos de cada amostra foi dosada pelo método de Biureto, empregando albumina de soro bovino como padrão. O valor de proteína total foi utilizado para calcular a atividade específica de cada enzima analisada.

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

Para mostrar a variação da atividade das enzimas quando aumentou a concentração de mercúrio foi usado correlação de Pearson (r) ou r de Pearson que mede

o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas. É um índice adimensional com valores situados entre -1.0 e 1.0, que reflete a intensidade de uma relação linear entre dois conjuntos de dados. $R^2 = 1$, significa uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis, já $r^2 = -1$ significa uma correlação negativa perfeita entre as duas variáveis, ou seja, se um aumenta, o outro sempre diminui. Quando mais próximo de 0 for o valor de “r”, significa que as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra.

Tabela 15. Atividade enzimática (U/mg de proteína) no tecido hepático e muscular das espécies Jaraqui, Tucunaré, Filhote, cachorra e barba-chata. Teor de proteínas totais e concentração de mercúrio encontradas nessas espécies de peixes.

	Proteínas totais mgPT/100mg tecido	Hidroperóxido de lipídio nmol/g de tecido (HP)	Catalase μmol/g tecido (CAT)	Superóxido dismutase nmol/mg proteína (SOD)	Glutathione peroxidase nmol/mg de tecido (GSH-Px)	[] de mercúrio no pool de tecido μg kg⁻¹
Fígado Jaraqui	52.99	384.19	26.16	3.69	14.99	852.40±11.10
Fígado Barba-Chata	60.45	344.36	29.10	3.93	14.70	550.10±0.30
Fígado Tucunaré	52.65	462.14	10.46	3.14	8.57	1219±15
Fígado Cachorra	63.04	326.19	30.52	4.54	9.642	650.60±8.30
Fígado Filhote	50.94	438.98	10.25	4.64	5.25	1044±13.60
Músculo Tucunaré	47.38	152.33	17.27	2.68	36.38	101.30±1.30
Músculo Filhote	47.08	154.96	39.79	5.82	48.88	87.40±0.90
Músculo Jaraqui	45.06	171.63	44.02	6.86	41.60	71.40±0.93
Músculo Barba-Chata	41.50	136.13	40.31	5.69	46.49	60.20±0.20
Músculo Cachorra	48.56	196.06	37.61	4.17	46.21	100.10±6.30

As análises da atividade das enzimas e da lipoperoxidação do estresse oxidativo foram feitas para verificar se ocorreu resposta aos estímulos exógenos, possivelmente

causados pelo mercúrio aos peixes estudados. Ao se avaliar a resposta das enzimas que combatem as espécies reativas de oxigênio (ROS) pode-se inferir fisiologicamente que o organismo está assimilando a exposição que está sofrendo. A tabela 15 apresenta as atividades enzimáticas da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e a lipoperoxidação (LOOH).

Na análise dos resultados, para nortear a discussão considerou-se a amostra de tecido hepático de barba-chata como controle, já que esta apresentou a menor concentração de mercúrio entre os tecidos hepáticos estudados ($550.10 \pm 0.30 \mu\text{g kg}^{-1}$) e tecido hepático de Tucunaré como amostra que apresentou maior quantidade de mercúrio ($1219 \pm 15 \mu\text{g kg}^{-1}$). Observando de forma geral, o aumento nas concentrações de mercúrio nas amostras teve alguma influência nos valores das atividades das enzimas.

A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como também de peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois à custa da conversão da GSH (glutathione reduzida) a GSSG (glutathione oxidada). A literatura reporta que a contaminação por mercúrio pode diminuir os níveis ou até mesmo inativar a enzima glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e glutathione reductase (GR) [138–142]. A GST normalmente aparece com atividade inibida no tecido hepático de animais contaminados por metais potencialmente tóxicos. Essa inibição está envolvida com a desestabilização da membrana lisossômica provocada pela exposição aos metais potencialmente tóxicos e/ou com a associação do metal com a GSH, quando este entra na célula [143]. Na tabela 15 e figura 29, pode ser observado que quando a concentração de mercúrio aumentou no tecido hepático dos peixes estudados, a atividade da enzima glutathione diminuiu proporcionalmente ao aumento do mercúrio, levando a uma conclusão de que o mercúrio pode estar interferindo na atividade dessa enzima, suprimindo a sua atividade e causando estresse. Já nos tecidos musculares (Tabela 15 e figura 30) não foram observadas alterações nos níveis de atividade enzimática ao ponto de causar algum estresse. As concentrações de mercúrio no tecido muscular também não tiveram muitas variações, levando a crer que isso pode ter influenciado na estabilidade da atividade enzimática.

Figura 29. Gráfico de dispersão mostrando negativa correlação entre concentração de mercúrio e atividade da enzima GPx no tecido hepático dos peixes estudados (Pearson $r = -0.61$).

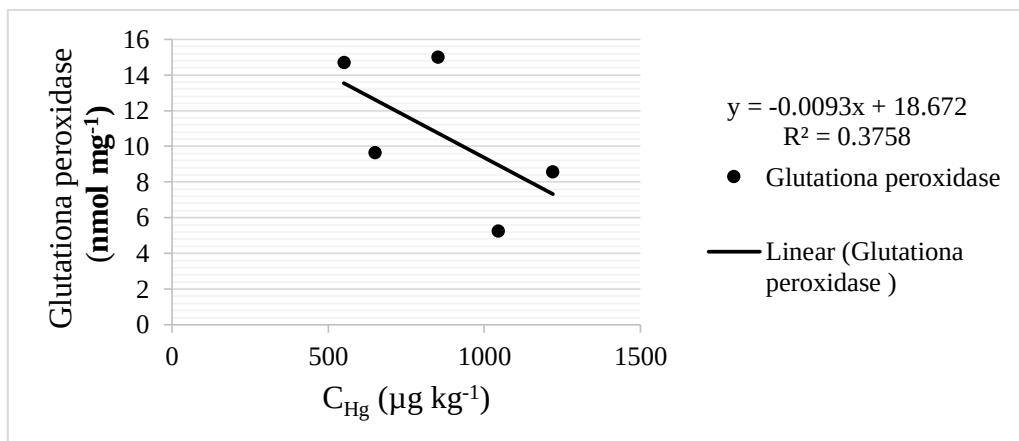
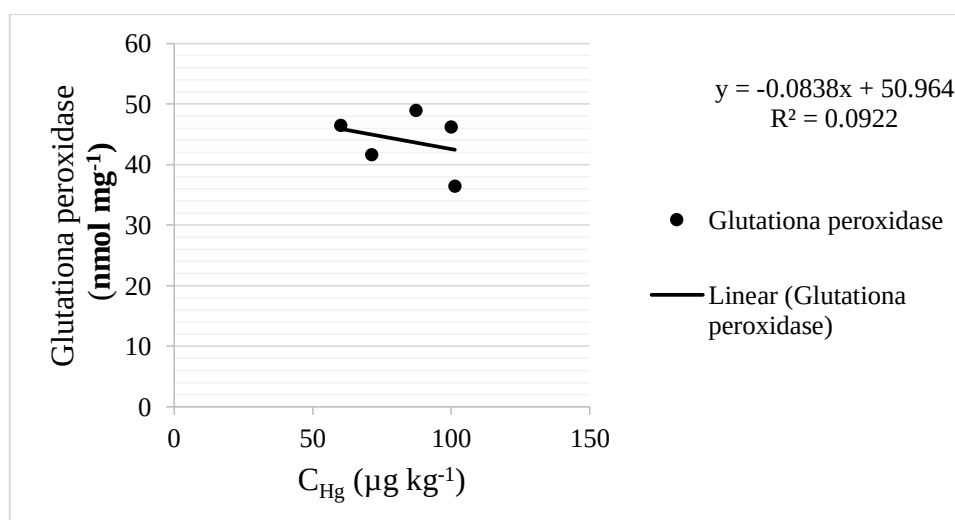


Figura 30. Gráfico de dispersão mostrando negativa correlação entre concentração de mercúrio e atividade da enzima GPx no tecido muscular dos peixes estudados (Pearson $r = -0.30$).



A catalase (CAT) é uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água e oxigênio ($H_2O + O_2$). É encontrada nos peroxissomas em animais e plantas e também nos glioxissomas (apenas em plantas) e no citoplasma de procariontes. A CAT assim como GPx, participa da oxidação de compostos hidrogenados, como metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis, com o consumo de um mol de peróxido [144]. Estudos de Martinez et al., (2016) relata depleção na atividade de CAT em animais na presença de mercúrio, assim como decréscimo na atividade de outras enzimas anti-estresse [140], no entanto, a CAT também tem sido relatada com aumento da atividade indicando estresse oxidativo. O estresse oxidativo encontrado é resultado da tentativa da célula em eliminar espécies reativas de oxigênio, formadas na metabolização de diversos compostos químicos, como espécies metálicas

potencialmente tóxicas [145, 146]. Os resultados de determinação da atividade da CAT em tecidos hepáticos de peixes apresentados na tabela 15 e figura 31 mostram, assim como o que ocorreu com a GPx, a depleção da atividade de CAT em relação ao aumento da concentração de mercúrio. Quanto maior a concentração de mercúrio no fígado das espécies estudadas, menor é a atividade de CAT. Se a diminuição da atividade enzimática de CAT é causada pelo aumento do estresse oxidativo, pode-se levar em consideração que as concentrações de mercúrio estão começando a desencadear estresse oxidativo nos animais. O mesmo pode ser observado para o tecido muscular (Tabela 15 e figura 32), que apesar do decréscimo na atividade de CAT não apresentar uma correlação tão forte quanto foi observada no tecido hepático, ela pode causar os mesmos riscos.

Figura 31. Gráfico de dispersão mostrando negativa correlação entre concentração de mercúrio e atividade da enzima catalase no tecido hepático dos peixes estudados (Pearson $r = -0.92$).

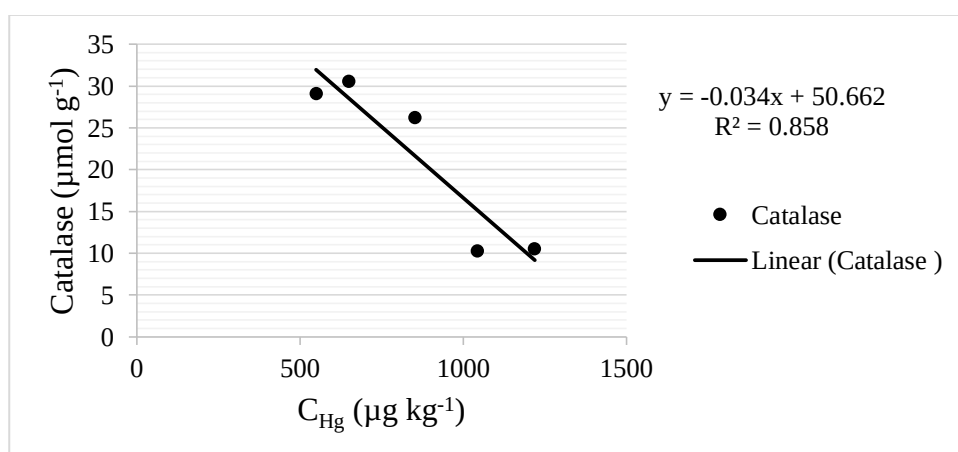
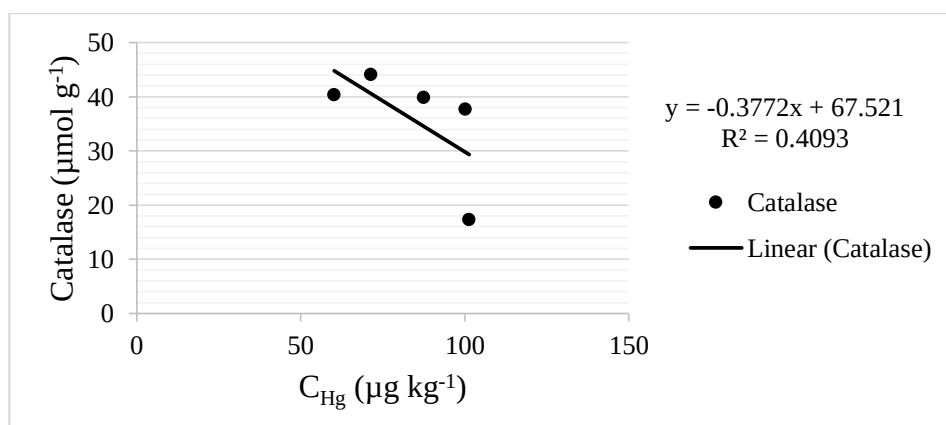


Figura 32. Gráfico de dispersão mostrando negativa correlação entre concentração de mercúrio e atividade da enzima catalase no tecido muscular dos peixes estudados (Pearson $r = -0.63$).



A SOD (Superóxido Dismutase) também é uma das enzimas que combate aos danos causados pelo estresse oxidativo. A SOD protege o citocromo reagindo com radicais superóxido e assim, diminuindo a presença dos radicais livres. O mecanismo de reação envolve a redução da SOD por radicais superóxido, formando oxigênio molecular. A SOD, na sua forma reduzida reage com outros radicais superóxido formando peróxido de hidrogênio, que em seguida sofre dismutação pela SOD ou por uma peroxidase, formando então água e oxigênio molecular [147]. O comportamento da SOD em organismos contaminados por metais potencialmente tóxicos apresenta controvérsias. Alguns estudos relatam a inibição da atividade da SOD em organismos contaminados com concentrações altas de metais como cobre, cádmio, mercúrio ou chumbo e, diminuição na sua atividade em relação às concentrações baixas desses metais potencialmente tóxicos [148, 149]. Os dados obtidos na determinação de atividade da SOD nas amostras de tecido hepático dos peixes estudados (tabela 15, figura 33), apresentou correlação moderada levando a acreditar que houve indução do estresse nos organismos estudados. Nos tecidos musculares (tabela 15, figura 34), a atividade de SOD foi mais afetada pelas concentrações do Hg.

Figura 33. Gráfico de dispersão mostrando negativa correlação entre concentração de mercúrio e atividade da enzima superóxido dismutase no tecido hepático dos peixes estudados (Pearson $r = -0.41$).

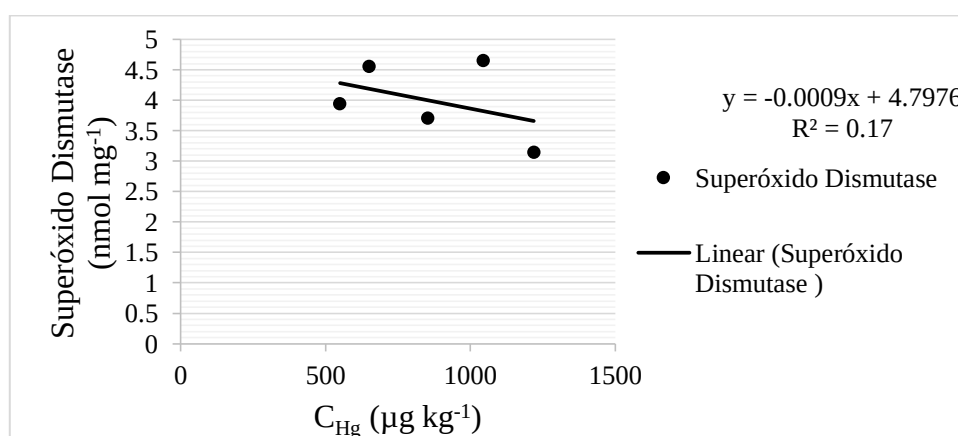
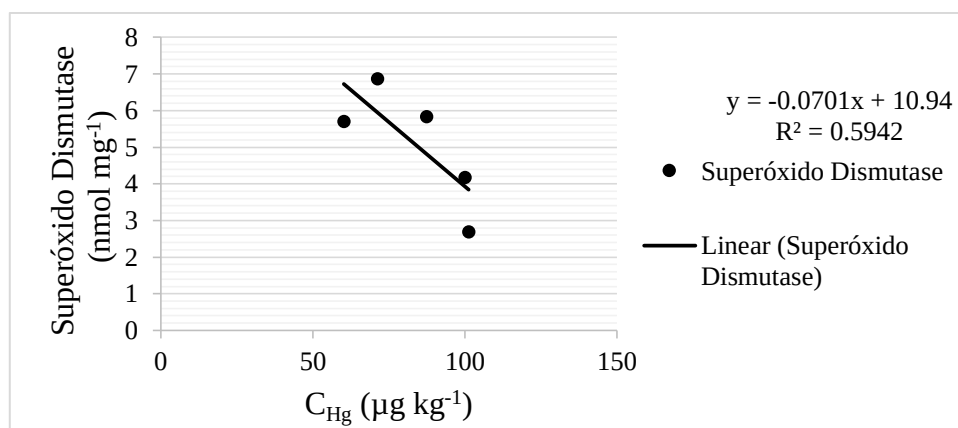


Figura 34. Gráfico de dispersão mostrando negativa correlação entre concentração de mercúrio e atividade da enzima superóxido dismutase no tecido muscular dos peixes estudados (Pearson $r = -0.77$).



O Hidroperóxido de lipídio (LOOH) pode estar envolvido em diversas patologias. Sendo um dos produtos primários da peroxidação lipídica, sua decomposição resulta em radicais peroxilas, com maior reatividade e toxicidade. A combinação de dois radicais peroxilas podem formar oxigênio molecular (O₂).

A formação de lipoperóxidos ocorre por meio de grupos hidroperóxidos que se ligam aos sítios hidrofóbicos dos ácidos graxos insaturados, tendo este processo uma dupla consequência: perturbação nas interações lipídicas, que levam às alterações estruturais das biomembranas e das lipoproteínas; e a formação de espécies reativas de oxigênio, que podem induzir a modificação secundária de outros constituintes da membrana. Assim, a peroxidação lipídica apresenta expressivas respostas frente a danos oxidativos, possuindo também estreita correlação com dados genéticos. Normalmente ocorre aumento da concentração de lipoperóxidos no fígado, quando altas concentrações de metais potencialmente tóxicos nesse órgão inibem as defesas antioxidantes, tornando-as insuficientes para prevenir a ocorrência de lesões oxidativas. O que pode resultar ocorrência de estresse oxidativo [150]. Como pode ser observado na tabela 15, figura 35 (tecido hepático) e figura 36 (tecido muscular), as concentrações de lipoperóxidos apresentaram comportamento inverso ao evidenciados para a atividade das enzimas, o que já era esperado, pois essas enzimas tiveram depleção da atividade com a elevação da concentração de mercúrio. Esses dados mostram que as concentrações de mercúrio determinadas nas espécies, estão de certa forma, causando estresse oxidativo ao ponto de promover a ativação das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. No entanto, aparentemente não atingiu ao ponto crítico de expressar proteínas de defesa específicas como as metalotioneínas, mas essas concentrações de mercúrio já estão sendo sentidas pelas defesas antioxidantes.

Figura 35. Gráfico de dispersão mostrando positiva correlação entre concentração de mercúrio e atividade de hidróperóxido de lipídio no tecido hepático dos peixes estudados (Pearson $r = 0.27$).

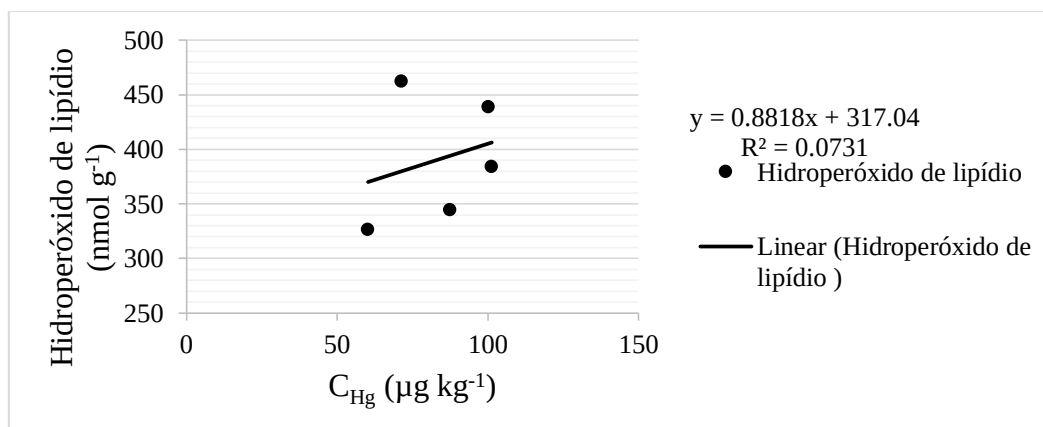
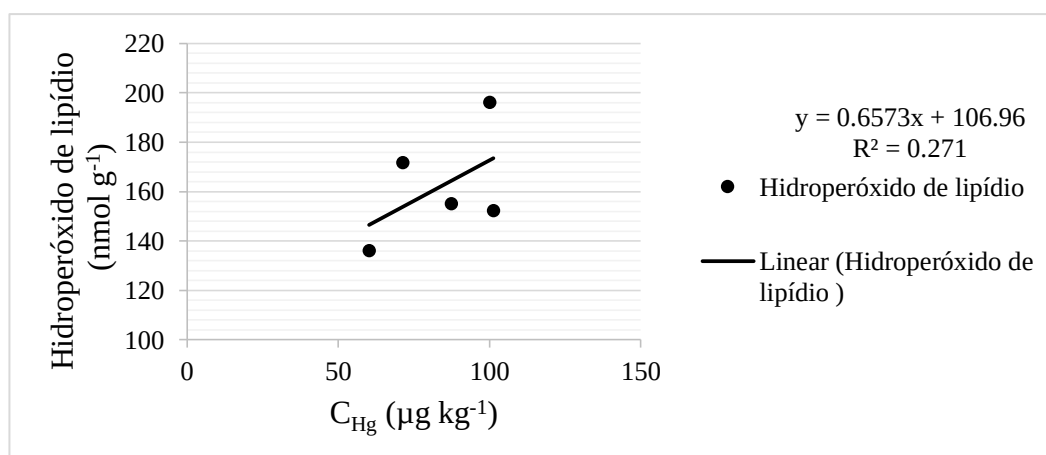


Figura 36. Gráfico de dispersão mostrando positiva correlação entre concentração de mercúrio e atividade de hidróperóxido de lipídio no tecido muscular dos peixes estudados (Pearson $r = 0.52$).



6.7 Análise das funções das proteínas usando o aplicativo de bioinformática Blast2Go.

Todas as proteínas dos tecidos muscular e hepático que foram identificadas com mercúrio ligado à sua estrutura foram organizadas de acordo com suas atividades no organismo: Componente Celular, Função Molecular e Processo Biológico usando a ferramenta de bioinformática *on line*, Blast2Go [151] (Figuras 37).

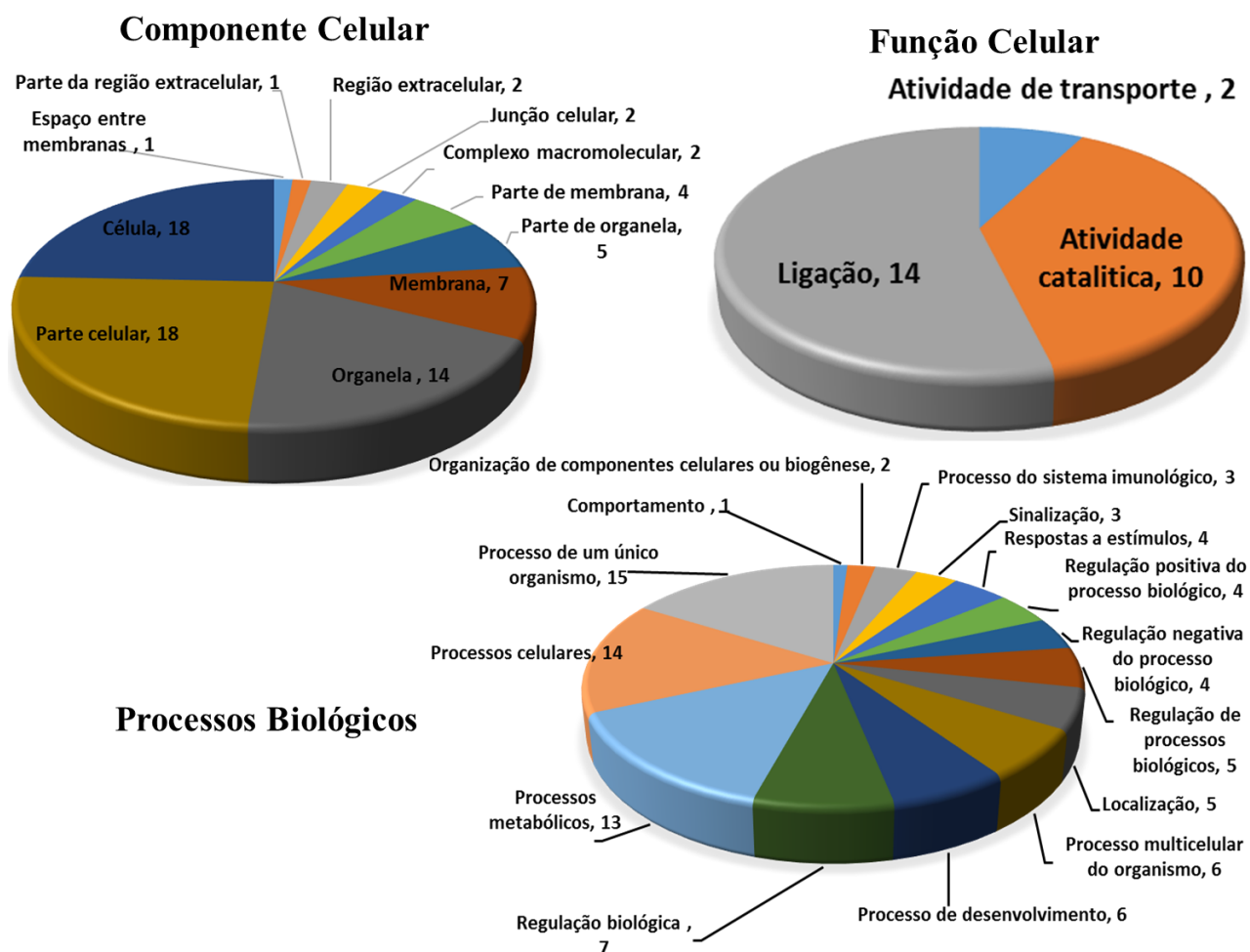


Figura 37. Figura obtida a partir do aplicativo de bioinformática usado na análise de proteínas encontradas nas espécies de peixes estudadas. Os gráficos representam as funções de componente celular, função celular e processos biológicos exercido pelas proteínas identificadas nas espécies de Peixes Jaraqui, Tucunaré, Filhote e Barba-chata.

6.8 Descrição das funções das proteínas de acordo com Blas2Go

As proteínas identificadas com mercúrio apresentaram sequências para muitas funções como demonstram os gráficos gerados pelo aplicativo de bioinformática on line Blast2Go. Dentro da função Componente Celular, as proteínas apresentaram as seguintes funções: 18 proteínas apresentou funções de parte celular (*Thyroid hormone receptor alpha-A*, *Pro-thyrotropin-releasing hormone*, *Actin cytoplasmic 1*, *Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1*, *Vesicle-trafficking protein SEC22b-B*, *Actin alpha skeletal muscle*, *Adenylate kinase 2 mitochondrial*, *Actin cytoplasmic 2*, *Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase*, *Heme transporter hrg1-A*, *Triosephosphate isomerase B*, *L-lactate dehydrogenase A chain*, *Triosephosphate isomerase A*,

Centromere protein M, Protein HEXIM e ATP synthase subunit beta, mitochondrial). Fazendo parte de organela foi encontrado 5 proteínas (*Vesicle-trafficking protein SEC22b-B, Adenylate kinase 2 mitochondrial, Heme transporter hrg1-A, Centromere protein M e ATP synthase subunit beta mitochondrial*). Sete das proteínas identificadas são proteínas de membrana (*Vesicle-trafficking protein SEC22b-B, Pro-thyrotropin-releasing hormone, Actin cytoplasmic 1, Actin cytoplasmic 2, Heme transporter hrg1-A, RING finger protein 145 e ATP synthase subunit beta, mitochondrial*). Duas proteínas foram identificadas fazendo parte de complexo macromolecular (*Vesicle-trafficking protein SEC22b-B e ATP synthase subunit beta, mitochondrial*). Quatorze das proteínas identificadas são proteínas de organela (*Thyroid hormone receptor alpha-A, Pro-thyrotropin-releasing hormone, Actin cytoplasmic 1, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, Vesicle-trafficking protein SEC22b-B, Actin alpha skeletal muscle, Adenylate kinase 2 mitochondrial, Actin cytoplasmic 2, Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase, Heme transporter hrg1-A, Centromere protein M, Protein HEXIM e ATP synthase subunit beta mitochondrial*). Quatro das proteínas identificadas fazem parte de membrana (*Vesicle-trafficking protein SEC22b-B, Heme transporter hrg1-A, RING finger protein 145 e ATP synthase subunit beta mitochondrial*). Duas proteínas apresentaram função de junção celular (*Actin cytoplasmic 1 e Actin, cytoplasmic 2*). Duas proteínas de região extracelular (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 e Pro-thyrotropin-releasing hormone*). Uma proteína de parte de região extracelular (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1*). Dezoito proteínas com função da célula (*Thyroid hormone receptor alpha-A, Pro-thyrotropin-releasing hormone, Actin cytoplasmic 1, Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, Vesicle-trafficking protein SEC22b-B, Actin alpha skeletal muscle, Adenylate kinase 2 mitochondrial, Actin cytoplasmic 2, Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase, Heme transporter hrg1-A, Triosephosphate isomerase B, L-lactate dehydrogenase A chain, Triosephosphate isomerase A, Centromere protein M, Protein HEXIM e ATP synthase subunit beta, mitochondrial*). Uma das proteínas identificadas apresentou função de proteína de proteína de espaço entre membranas (*Adenylate kinase 2, mitochondrial*).

Para o componente Função Celular, as proteínas identificadas apresentaram as seguintes funções: duas das 23 proteínas identificadas ligadas ao mercúrio apresentou

atividade de transporte (*Heme transporter hrg1-A* e *ATP synthase subunit beta mitochondrial*). Dez das 23 proteínas ligadas ao mercúrio apresentaram funções catalíticas (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1*, *Adenylate kinase 2 mitochondrial*, *Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1*, *Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase*, *L-lactate dehydrogenase A chain*, *Triosephosphate isomerase B*, *RING finger protein 145*, *Triosephosphate isomerase A*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* e *ATP synthase subunit beta mitochondrial*). Quatorze das 23 proteínas ligadas ao mercúrio apresentaram funções de ligação, essa função corrobora com os estudos feitos envolvendo essas proteínas ligadas ao mercúrio, já que como elas apresentaram função de ligação e essas ligações podem ser com íons metálicos como cobre, magnésio, zinco, cálcio, ferro e outros cofatores que essas proteínas/enzimas necessitam. O mercúrio que foi encontrado ligado a elas poderiam estar ligados ao sítio de algum desses outros metais. As proteínas encontradas fazendo função de ligação foram (*Thyroid hormone receptor alpha-A*, *Pro-thyrotropin-releasing hormone*, *Actin cytoplasmic 1*, *Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1*, *Parvalbumin-2*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *Vesicle-trafficking protein SEC22b-B*, *Actin alpha skeletal muscle*, *Adenylate kinase 2 mitochondrial*, *Actin cytoplasmic 2*, *RING finger protein 145*, *Protein HEXIM*, *ATP synthase subunit beta mitochondrial* e *Parvalbumin alpha*).

Para a função de Processos Biológicos as proteínas foram identificadas executando função de: localização, cinco proteínas (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1*, *Vesicle-trafficking protein SEC22b-B*, *Pro-thyrotropin-releasing hormone*, *Heme transporter hrg1-A* e *ATP synthase subunit beta, mitochondrial*). Duas das proteínas ligadas ao mercúrio apresentaram a função de organização de componente celulares ou biogêneses (*Vesicle-trafficking protein SEC22b-B* e *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Três proteínas apresentaram função de sinalização (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1*, *Thyroid hormone receptor alpha-A* e *Thyroid hormone receptor alpha-A*). Quatro proteínas identificadas exercem a função de regulação negativa do processo biológico (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1*, *Thyroid hormone receptor alpha-A*, *Pro-thyrotropin-releasing hormone* e *Protein HEXIM*). Quatorze proteínas apresentaram, apresentaram função de processos celulares (*Thyroid hormone receptor alpha-A*, *Pro-thyrotropin-releasing hormone*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *Guanine nucleotide-binding protein*

subunit beta-2-like 1, Vesicle-trafficking protein SEC22b-B, Adenylate kinase 2 mitochondrial, Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase, Heme transporter hrg1-A, RING finger protein 145, L-lactate dehydrogenase A chain, Triosephosphate isomerase B, Triosephosphate isomerase A, Protein HEXIM e ATP synthase subunit beta, mitochondrial). Seis proteínas apresentaram funções de processos de desenvolvimento (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, Thyroid hormone receptor alpha-A, Actin alpha skeletal muscle, Adenylate kinase 2 mitochondrial, Heme transporter hrg1-A e RING finger protein 145*). Quinze proteínas apresentaram função de processo de organização de um único organismo (*Thyroid hormone receptor alpha-A, Pro-thyrotropin-releasing hormone, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, Vesicle-trafficking protein SEC22b-B, Actin alpha skeletal muscle, Adenylate kinase 2 mitochondrial, Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase, Heme transporter hrg1-A, RING finger protein 145, Triosephosphate isomerase B, L-lactate dehydrogenase A chain, Triosephosphate isomerase A, Protein HEXIM e ATP synthase subunit beta, mitochondrial*). Treze proteínas estão ligadas a processos metabólicos (*Thyroid hormone receptor alpha-A, Pro-thyrotropin-releasing hormone, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, Actin alpha skeletal muscle, Adenylate kinase 2 mitochondrial, Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase, RING finger protein 145, Triosephosphate isomerase B, L-lactate dehydrogenase A chain, Triosephosphate isomerase A, Protein HEXIM e ATP synthase subunit beta mitochondrial*). Sete proteínas foram identificadas como proteínas de regulação biológicas (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, Thyroid hormone receptor alpha-A, Actin alpha skeletal muscle, Pro-thyrotropin-releasing hormone, Heme transporter hrg1-A, Protein HEXIM e Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Quatro proteínas envolvidas em regulação positiva do processo biológico (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, Thyroid hormone receptor alpha-A, Actin alpha skeletal muscle e Pro-thyrotropin-releasing hormone*). Cinco proteínas com função de regulação de processos biológicos (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, Thyroid hormone receptor alpha-A, Actin alpha skeletal muscle e Pro-thyrotropin-releasing hormone, Protein HEXIM*). Quatro proteínas desenvolvendo função de respostas a estímulos (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, Thyroid hormone receptor alpha-A, Pro-thyrotropin-releasing hormone e L-lactate dehydrogenase A chain*). Três proteínas com função de processos de sistema imunológico

(*Adenylate kinase 2 mitochondrial*, *Heme transporter hrg1-A* e *RING finger protein 145*). Seis proteínas envolvidas em processos multicelular do organismo (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1*, *Thyroid hormone receptor alpha-A*, *Actin alpha skeletal muscle*, *Adenylate kinase 2 mitochondrial*, *Heme transporter hrg1-A* e *RING finger protein 145*). Uma proteína envolvida em comportamento (*Pro-thyrotropin-releasing hormone*).

6.9 Análise de bioinformática usando o aplicativo *String* para mostrar as interações entre as proteínas

Usando o aplicativo on line *String* foi possível ver as interações diretas que as proteínas encontradas com mercúrio podem fazer no organismo dos peixes estudados. Na figura 38 são mostradas as interações diretas feitas por 8 (duas isoformas da parvalbumina, actina do musculo, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triosephosphate isomerase 1B, triosephosphate isomerase 1A, lactate dehydrogenase A4, lactate dehydrogenase A4 e ATP synthase) das 23 proteínas encontradas ligadas ao mercúrio. No entanto, quando feito essa mesma rede de interação usando todas as proteínas encontradas nos indivíduos (47 proteínas), inclusive as que não apresentaram mercúrio, essa rede de interações direta aumentou para 17 ligações, ou seja, 17 das 47 proteínas tem ligação diretas dentro do organismo, levando a inferir que um eventual dano causado pelo mercúrio em uma destas proteínas, poderá desencadear uma reação em cadeia com prejuízo ainda maior para o organismo (figura 39). Como pode ser visto na figura 40, quando interagem essas proteínas com mais 20 possíveis proteínas encontradas em peixes, o número de interações aumenta proporcionalmente a quantidade de proteínas inseridas (43 interações diferentes). Esse evento ocorre proporcionalmente a cada proteína inserida para interação. Como sabemos que o sistema biológico é muito complexo e organizado, qualquer interferência causada pelo mercúrio em uma dessas vias pode desencadear um problema bem mais sério.

Figura 39. Figura obtida a partir do aplicativo de bioinformática *on line String* usado na análise de interações entre as proteínas encontradas nas espécies de peixes estudadas. A figura representa as 17 interações diretas feitas entre as 23 proteínas identificadas ligadas ao mercúrio mais as 24 identificadas livre de mercúrio, nas espécies de Peixes Jaraqui, Tucunaré, Filhote e Barba-chata.

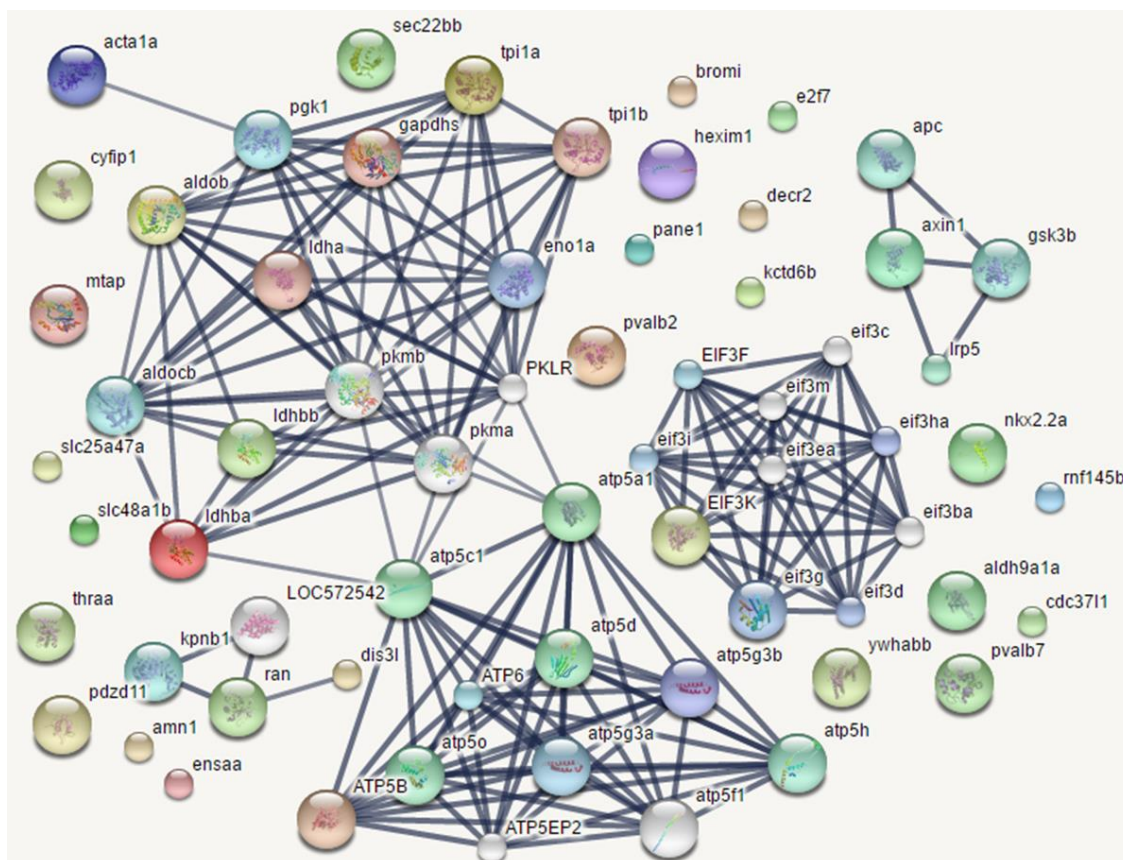


Figura 40. Figura obtida a partir do aplicativo de bioinformática *on line String* usado na análise de interações entre as proteínas encontradas nas espécies de peixes estudadas, interagindo com mais 20 possíveis proteínas encontradas em peixes. Como pode ser visto na figura, o número de interações aumentam a medida que outras proteínas fazem parte do conjunto.

7 Conclusões

- Embora tenha encontrado interações do mercúrio com muitas proteínas das espécies estudadas, as metalotioneínas não foram encontradas nestas espécies de peixes, levando a inferir que as concentrações de mercúrio encontradas atualmente nos tecidos desses

organismos ainda não estão sendo capaz de induzir a produção dessas pequenas proteínas de defesa do organismo, sob as condições presentes nos locais de coleta no Rio Madeira, Rondônia.

- As análises das enzimas do estresse oxidativo e do Hidroperóxido de lipídio mostraram alterações nos seus níveis de atividade, indicando um possível estresse oxidativo nas espécies estudadas provocado provavelmente, pela bioacumulação do mercúrio nos organismos.

- Com base nos resultados que foram apresentados durante o estudo, pode-se afirmar que as análises do mercúrio realizadas por Absorção Atômica em Forno de Grafite foram eficientes, mostrando sensibilidade nas quantificações do metal tanto nos *pools* de tecido quanto *pellets* e *spots* proteicos, assim como nos padrões de músculo (DORM 4) e fígado (DOLT 4) de peixes usados para validar o método.

- A eletroforese bidimensional mostrou como uma boa aliada nos fracionamentos de proteínas para análises de mercúrio, apresentando boa separação dos *spots* proteicos e facilitando a caracterização das suas proteínas por espectrometria de massas e/ou quantificação do mercúrio ligado a essas proteínas por Absorção Atômica em Forno de Grafite. Como pode ser visto nas imagens de gel obtidas (Figuras 21 a 28), foram possíveis separar *spots* proteicos de baixa massa molecular, sendo possível perfeitamente obter metalotioneínas, se estas estivessem presentes nas amostras estudadas.

8 Referências

1. Avramescu ML, Yumvihoze E, Hintelmann H, et al (2011) Biogeochemical factors influencing net mercury methylation in contaminated freshwater sediments from the St. Lawrence River in Cornwall, Ontario, Canada. *Sci Total Environ* 409:968–978. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.11.016
2. Bastos WR, Lacerda LD (2004) A CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO NA BACIA DO RIO MADEIRA : *Geochim Bras* 18:99–114.
3. Queiroz JV (2015) ABORDAGEM METALÔMICA QUANTITATIVA DE MERCÚRIO EM PEIXES DA REGIÃO AMAZÔNICA.
4. Queiroz, Luiz Jardim; Vilara-Torrente, G.; Ohara, W. M.; Pires, T. H. S. ; Zuanon, J.; Doria CRC (2013) Peixes do Rio Madeira.
5. Queiroz, Luiz Jardim; Vilara-Torrente, G.; Ohara, W. M.; Pires, T. H. S. ; Zuanon, J.; Doria CRC (2014) Peixes do Rio Madeira, 1st ed. doi: CDD-597.09811
6. Fadini PS, Jardim WF (2001) Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? *Sci Total Environ* 275:71–82.
7. UNEP (2013) The Global Mercury Assessment. United Nations Environ. Program.
8. Mma (2013) Diagnóstico Preliminar sobre o Mercúrio no Brasil.
9. Mailman M, Stepnuk L, Cicek N, Bodaly RAD (2006) Strategies to lower methyl mercury concentrations in hydroelectric reservoirs and lakes: A review. *Sci Total Environ* 368:224–35. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.09.041
10. de Castro NSS, Lima MDO (2014) Biomarkers of mercury exposure in the Amazon. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2014/867069
11. González-Estecha M, Bodas-Pinedo A, Guillén-Pérez JJ, et al (2014) [Methylmercury exposure in the general population; toxicokinetics; differences by gender, nutritional and genetic factors]. *Nutr Hosp* 30:969–88. doi: 10.3305/nh.2014.30.5.7727
12. Kainz M, Telmer K, Mazumder A (2006) Bioaccumulation patterns of methyl mercury and essential fatty acids in lacustrine planktonic food webs and fish. *Sci*

Total Environ 368:271–82. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.09.035

13. Syaripuddin K, Kumar A, Sing KW, et al (2014) Mercury accumulation in bats near hydroelectric reservoirs in Peninsular Malaysia. *Ecotoxicology* 23:1164–1171. doi: 10.1007/s10646-014-1258-y
14. Hylander LD, Gröhn J, Tropp M, et al (2006) Fish mercury increase in Lago Manso, a new hydroelectric reservoir in tropical Brazil. *J Environ Manage* 81:155–66. doi: 10.1016/j.jenvman.2005.09.025
15. Crump KL, Trudeau VL (2009) Mercury-induced reproductive impairment in fish. *Environ Toxicol Chem* 28:895–907. doi: 10.1897/08-151.1
16. Marshall JL, Booth JE, Williams JW (1984) Characterization of the Covalent Mercury (11)-NADPH Complex*.
17. Dórea JG, Farina M, Rocha JBT (2013) Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *J Appl Toxicol* 33:700–11. doi: 10.1002/jat.2855
18. Rand B, Station TL, Junction B (1991) Remote Seepage.
19. Rodrigues Bastos W, Paulo J, Gomes O, et al (2005) Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.09.048
20. FAO/WHO (2004) Human energy requirements. *FAO Food Nutr Tech Rep Ser* 10:6.
21. Molina CI, Gibon F-M, Sánchez Y, et al (2010) Implicancia ambiental del mercurio en ecosistemas acuáticos de la Amazonía: Situación en Bolivia. *Rev. Virtual REDESMA* Oct. 4:
22. Rosato A, Valasatava Y, Andreini C (2016) Minimal Functional Sites in Metalloproteins and Their Usage in Structural Bioinformatics. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms17050671
23. Vieira Rocha A, Rita Cardoso B, Cominetti C, et al (2014) Selenium status and hair mercury levels in riverine children from Rondônia, Amazonia. *Nutrition*. doi: 10.1016/j.nut.2014.03.013

24. Val J, Muniz S, Goma J, Navarro E (2015) Influence of global change-related impacts on the mercury toxicity of freshwater algal communities. *Sci Total Environ* 540:53–62. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.05.042
25. Ung CY, Lam SH, Hlaing MM, et al (2010) Mercury-induced hepatotoxicity in zebrafish: in vivo mechanistic insights from transcriptome analysis, phenotype anchoring and targeted gene expression validation. *BMC Genomics* 11:212. doi: 10.1186/1471-2164-11-212
26. Vieira JCS, Cavecci B, Queiroz J V., et al (2015) Determination of the Mercury Fraction Linked to Protein of Muscle and Liver Tissue of Tucunaré (*Cichla spp.*) from the Amazon Region of Brazil. *Arch Environ Contam Toxicol* 69:422–430. doi: 10.1007/s00244-015-0160-9
27. Souza MM, Gloria ENE, Bastos WR (1989) Mercury concentrations in inland waters of gold-mining areas in rondonia, brazil. 88:233–240.
28. Sousa PR (2011) Espectrofotometria Molecular Espectrometria de Absorção Atômica. 1–14.
29. Saghiri MA, Asatourian A, Orangi J, et al (2015) Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis-Part I: N, Fe, Se, P, Au, and Ca. *Crit Rev Oncol Hematol*. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.05.010
30. Tomas M, Tinti A, Bofill R, et al (2016) Comparative Raman study of four plant metallothionein isoforms: Insights into their Zn(II) clusters and protein conformations. *J Inorg Biochem* 156:55–63. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.12.027
31. SILVA BSDF (2008) ESTUDO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS METALOTIONEÍNA, NFkB, CICLINA D1 E CDK4 EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE HUMANO. 0–89.
32. Hauser-Davis RA, Bastos FF, Dantas RF, et al (2014) Behaviour of the oxidant scavenger metallothionein in hypoxia-induced neotropical fish. *Ecotoxicol Environ Saf* 103:24–8. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.01.015
33. Nelson DL, Cox MM (2002) *Lehninger Princípios de Bioquímica* 2. Oikos 2:1232. doi: 10.1002/14651858

34. Mackay EA, OVERNELL J, DUNBAR B, et al (1993) Complete Amino-Acid-Sequences of 5 Dimeric and 4 Monomeric Forms of Metallothionein From the Edible Mussel *Mytilus-Edulis*. *Eur J Biochem* 218:183–194. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18364.x
35. Adam V, Fabrik I, Kizek R, et al (2010) Vertebrate metallothioneins as target molecules for analytical techniques. *TrAC - Trends Anal Chem* 29:409–418. doi: 10.1016/j.trac.2010.02.004
36. Naji A, Ismail A, Kamrani E, Sohrabi T (2014) Correlation of MT levels in livers and gills with heavy metals in wild tilapia (*Oreochromis mossambicus*) from the Klang River, Malaysia. *Bull Environ Contam Toxicol* 92:674–9. doi: 10.1007/s00128-014-1243-4
37. Hauser-Davis R a., Bastos FF, Tuton B, et al (2014) Bile and liver metallothionein behavior in copper-exposed fish. *J Trace Elem Med Biol* 28:70–74. doi: 10.1016/j.jtemb.2013.09.003
38. Inácio AF (2006) Metalotioneína e Metais em *Geophagus brasiliensis* - Acará. 78.
39. Vašák M (2005) Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol* 19:13–17. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.03.003
40. Rosa A, Arias L, Santos VG (2008) Metallothionein: molecular and cellular processes. 16:701–716.
41. Silva; NPGNCFAFDPC (2005) No Soro De Bovinos Sadios Determination of the Reference Range of Glutathione Peroxidase. 21:89–93.
42. Bihari G, Chainy N, Paital B, Dandapat J (2016) An Overview of Seasonal Changes in Oxidative Stress and Antioxidant Defence Parameters in Some Invertebrate and Vertebrate Species. 2016:
43. Parkin D., Bray F., Devesa S. (2001) Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 37:4–66. doi: 10.1016/S0959-8049(01)00267-2
44. Braga C. (2012) DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA APLICAÇÃO DA METALÔMICA NA IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES EM PLASMA E FÍGADO DE RATOS DIABÉTICOS.

45. Moraes PM, Santos FA, Cavecci B, et al (2013) GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. *Food Chem* 141:2614–2617. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.008
46. Nóbrega PCA e JA (2000) DETERMINAÇÃO DIRETA DE SELÊNIO EM ÁGUA DE COCO E EM LEITE DE COCO UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE. 23:310–312.
47. PUC-RJ (2010) Métodos Analíticos Utilizados na Determinação Elementos-traço em Amostras Biológicas. Certificação Digit 0420972/CB:26–38.
48. Saran LM (2010) Fcva/ unesp jaboticabal espectroscopia de absorção atômica.
49. Garcia R, Baez AP (2012) Atomic absorption spectrometry (AAS). In: *At. Absorpt. Spectrosc.* pp 1–12
50. Hill SJ, Fisher AS (2010) Atomic Absorption, Methods and Instrumentation. In: *Encycl. Spectrosc. Spectrom.* pp 46–53
51. Boss CB, Fredeen KJ (1997) Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. North 2–12.
52. Moraes PM, Santos FA, Padilha CCF, et al (2012) A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. *Biol Trace Elem Res* 150:195–199. doi: 10.1007/s12011-012-9502-x
53. Marshall WD (1997) Atomic absorption, emission and fluorescence spectrometry: principles and applications. *Tech Instrum Anal Chem* 18:141–178.
54. Jenniss S, Katz S, Lynch R (1997) Applications of Atomic Spectrometry to Regulatory Compliance Monitoring, Ed. 2. Wiley-VCH, New York
55. O’Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007–21. doi: 10.1016/j.bbi.2008.05.010
56. Bezerra RQ, Martins GR, Barroso IC, et al (2013) Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa como ferramentas proteômicas aplicadas à definição de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva de caprinos. *Acta Vet Bras* 7:100–112.

57. VILLAR LS (2006) Otimização De Metodologia Para Extração E Determinação De Metalotioneínas Por Eletroforese Em Gel De Poliacrilamida De Ostras *Crassostrea Rhizophorae* (Guilding, 1828) Para Aplicação Em Estudos Ambientais.
58. Rocha TL, Costa PHA, Magalhães JCC, et al (2005) Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. *Embrapa* 1–12.
59. Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4:3665–3685. doi: 10.1002/pmic.200401031
60. Berth M, Moser FM, Kolbe M, Bernhardt J (2007) The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:1223–1243. doi: 10.1007/s00253-007-1128-0
61. Flack CP, Woollen JW (1984) Prevention of interference by dextran with biuret-type assay of serum proteins. *Clin Chem* 30:559–561.
62. Choe LH, Lee KH (2003) Quantitative and qualitative measure of intralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis. *Electrophoresis* 24:3500–3507. doi: 10.1002/elps.200305614
63. Braga CP, Bittarello a. C, Padilha CCF, et al (2015) Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. *Talanta* 132:239–244. doi: 10.1016/j.talanta.2014.09.021
64. Beranova-Giorgianni S (2003) Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: Strengths and limitations. *TrAC - Trends Anal Chem* 22:273–281. doi: 10.1016/S0165-9936(03)00508-9
65. Ong SE, Pandey a (2001) An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng* 18:195–205. doi: 10.1016/S1389-0344(01)00095-8
66. Issaq HJ, Veenstra TD (2008) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): Advances and perspectives. *Biotechniques* 44:697–

700. doi: 10.2144/000112823

67. Rabilloud T, Lelong C (2011) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *J Proteomics* 74:1829–1841. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.040
68. Williams RAD (1986) *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*.
69. Schleicher M, Watterson DM (1983) Analysis of differences between Coomassie blue stain and silver stain procedures in polyacrylamide gels: Conditions for the detection of calmodulin and troponin C. *Anal Biochem* 131:312–317. doi: 10.1016/0003-2697(83)90175-6
70. Santos PM, Teixeira MC, Sá-correia I (2004) A Análise Proteómica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. *Bol Biotechnol* 6:1–17. doi: 10.1021/bm050551n
71. Cunsolo V, Muccilli V, Saletti R, Foti S (2011) Applications of mass spectrometry techniques in the investigation of milk proteome. *Eur J Mass Spectrom* 17:305–320. doi: 10.1255/ejms.1147
72. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, et al (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1:2856–2860. doi: 10.1038/nprot.2006.468
73. Nagele E, Martin V, Horth P, Vad C (2004) 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Rev Proteomics* 1:38–46.
74. Moraes MCB, Do Lago CL (2003) Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Quim Nova* 26:556–563. doi: 10.1590/S0100-40422003000400019
75. Chiaradia MC, Collins CH, Jardim ICSF (2008) O estado da arte da cromatografia associada ?? espectrometria de massas acoplada ?? espectrometria de massas na an??lise de compostos t??xicos em alimentos. *Quim Nova* 31:623–636. doi: 10.1590/S0100-40422008000300030
76. Gross JH (2011) *Mass spectrometry - A textbook*. *Anal Bioanal Chem*. doi: 10.1007/s00216-011-5457-6

77. Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, et al (2003) Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. Clin Biochem Rev 24:3–12.
78. Queiroz, Luiz Jardim; Vilara-Torrente, G.; Ohara, W. M.; Pires, T. H. S. ; Zuanon, J.; Doria CRC (2014) Peixes do rio Madeira, 2nd ed. São Paulo
79. Queiroz, Luiz Jardim; Vilara-Torrente, G.; Ohara, W. M.; Pires, T. H. S. ; Zuanon, J.; Doria CRC (2014) Peixes do Rio Madeira. São Paulo
80. João Lara Mesquita Resex São João da Ponta. <http://marsemfim.com.br/resex-sao-joao-da-ponta/>. Accessed 5 Apr 2017
81. Correia CCLT, Hauser-davis RA, Tatiana O, Saint D (2006) OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE OSTRAS CRASSOSTREA RHIZOPHORAE (GUILDING, 1828) PARA APLICAÇÃO EM ESTUDOS AMBIENTAIS.
82. Motta TCS (2013) OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE OSTRAS CRASSOSTREA RHIZOPHORAE (GUILDING, 1828) PARA APLICAÇÃO EM ESTUDOS AMBIENTAIS.
83. Lima PM, Neves RDCF, dos Santos F a, et al (2010) Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SRXRF and FAAS after 2D-PAGE separation: Preliminary results. Talanta 82:1052–6. doi: 10.1016/j.talanta.2010.06.023
84. Macirella R, Guardia A, Pellegrino D, et al (2016) Effects of Two Sublethal Concentrations of Mercury Chloride on the Morphology and Metallothionein Activity in the Liver of Zebrafish (*Danio rerio*). Int J Mol Sci 17:1–16. doi: 10.3390/ijms17030361
85. Sampaio D, Lucotte M, Paquet S, Davidson R (2009) Influence of ecological factors and of land use on mercury levels in fish in the ´s River basin , Amazon \$ Tapajo. 109:432–446. doi: 10.1016/j.envres.2009.02.011
86. Vieira JCS (2014) Estudo metaloproteômico do mercúrio em amostras de tecido hepático de peixes coletados na área de influência do AHE JIRAU - Bacia do rio

87. UniProt (2016) Universal Protein Resource (UniProt). In: 2016. <http://www.uniprot.org/>. Accessed 28 Apr 2016
88. Werhahn W (2001) Purification and Characterization of the Preprotein Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane from Arabidopsis. Identification of Multiple Forms of TOM20. *Plant Physiol* 125:943–954. doi: 10.1104/pp.125.2.943
89. Kilby PM, Welwyn RD, City G (2000) electrophoresis. c:4–6.
90. Ministério da Agricultura P e A (2013) Sistema Integrado de Legislação Sistema Integrado de Legislação. (DOU 22/12/1999 22/12/1999:1–51.
91. Huang SS-Y, Hung SSO, Chan HM (2014) Maintaining tissue selenium species distribution as a potential defense mechanism against methylmercury toxicity in juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquat Toxicol* 156:88–95. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.08.004
92. Cong W, Zhao T, Zhu Z, et al (2014) Metallothionein prevents cardiac pathological changes in diabetes by modulating nitration and inactivation of cardiac ATP synthase. *J Nutr Biochem* 25:463–474. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.12.007
93. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59:627–647. doi: 10.1007/s00018-002-8454-2
94. Siscar R, Koenig S, Torreblanca A, Solé M (2014) The role of metallothionein and selenium in metal detoxification in the liver of deep-sea fish from the NW Mediterranean Sea. *Sci Total Environ* 466–467:898–905. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.07.081
95. Serén N, Glaberman S, Carretero M a, Chiari Y (2014) Molecular evolution and functional divergence of the metallothionein gene family in vertebrates. *J Mol Evol* 78:217–33. doi: 10.1007/s00239-014-9612-5
96. Martins FCS, Almeida EA, Márcia C Bisinoti (2010) Determinação de metalotioneína hepática em tilápias expostas a Fe , Cu , Cd e Pb na presença e ausência de Substâncias Húmicas Aquáticas . 77.

97. Jara-Biedma R, González-Dominguez R, García-Barrera T, et al (2013) Evolution of metallothionein isoforms complexes in hepatic cells of *Mus musculus* along cadmium exposure. *BioMetals* 26:639–650. doi: 10.1007/s10534-013-9636-0
98. Fang Y, Yang H, Wang T, et al (2010) Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macra veneriformis*. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 151:325–333. doi: 10.1016/j.cbpc.2009.12.005
99. Orct T, Lazarus M, Ljubojević M, et al (2015) Metallothionein, essential elements and lipid peroxidation in mercury-exposed suckling rats pretreated with selenium. *Biometals* 701–712. doi: 10.1007/s10534-015-9859-3
100. Macirella R, Guardia A, Pellegrino D, et al (2016) Effects of two sublethal concentrations of mercury chloride on the morphology and metallothionein activity in the liver of zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms17030361
101. Gentès S, Maury-Brachet R, Feng C, et al (2015) Specific Effects of Dietary Methylmercury and Inorganic Mercury in Zebrafish (*Danio rerio*) Determined by Genetic, Histological, and Metallothionein Responses. *Environ Sci Technol* 49:14560–14569. doi: 10.1021/acs.est.5b03586
102. Oliveira VA, Oliveira CS, Mesquita M, et al (2015) Zinc and N-acetylcysteine modify mercury distribution and promote increase in hepatic metallothionein levels. *J Trace Elem Med Biol* 32:183–188. doi: 10.1016/j.jtemb.2015.06.006
103. Wasko et al (2005) Caracterização molecular do gene de Alfa-actina muscular cardíaca da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Pisces , Cichlidae). 89109.
104. Gunning P, Ponte P, Okayama H, et al (1983) Isolation and characterization of full-length cDNA clones for human alpha-, beta-, and gamma-actin mRNAs: skeletal but not cytoplasmic actins have an amino-terminal cysteine that is subsequently removed. *Mol Cell Biol* 3:787–95. doi: 10.1128/MCB.3.5.787.Updated
105. Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R (2015) Lactate dehydrogenase 5: An old friend and a new hope in the war on cancer. *Cancer Lett* 358:1–7. doi: 10.1016/j.canlet.2014.12.035

106. Isaias AC, Fiorini MP, Girardi L, et al (2010) provenientes de lagoas de mineração / São José dos Campos-SP. VI Encontro Lat Am Pós-Graduação 2213–2216.
107. Petrelli F, Cabiddu M, Coinu A, et al (2015) Prognostic role of lactate dehydrogenase in solid tumors: A systematic review and meta-analysis of 76 studies. *Acta Oncol (Madr)* 54:961–970. doi: 10.3109/0284186X.2015.1043026
108. Aoyama H, Maria T, Silva A, et al (2003) Revisão. 26:896–900.
109. Yanatori I, Tabuchi M, Kawai Y, et al (2010) Heme and non-heme iron transporters in non-polarized and polarized cells. *BMC Cell Biol* 11:39. doi: 10.1186/1471-2121-11-39
110. White C, Yuan X, Schmidt PJ, et al (2013) HRG1 Is Essential for Heme Transport from the Phagolysosome of Macrophages during Erythrophagocytosis. *Cell Metab* 17:261–270. doi: 10.1016/j.cmet.2013.01.005
111. Rajagopal A, Rao AU, Amigo J, et al (2008) Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature* 453:1127–31. doi: 10.1038/nature06934
112. Gierach I, Li J, Wu W, et al (2012) Bacterial biosensors for screening isoform-selective ligands for human thyroid receptors α -1 and β -1. 2:247–253.
113. Han M-HJ, Hu Z, Chen CY, et al (2014) Dysbindin-associated proteome in the p2 synaptosome fraction of mouse brain. *J Proteome Res* 13:4567–80. doi: 10.1021/pr500656z
114. Liu Y-W, Chan W-K (2002) Thyroid hormones are important for embryonic to larval transitory phase in zebrafish. *Differentiation* 70:36–45. doi: 10.1046/j.1432-0436.2002.700104.x
115. Lam SH, Sin YM, Gong Z, Lam TJ (2005) Effects of thyroid hormone on the development of immune system in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 142:325–35. doi: 10.1016/j.ygcen.2005.02.004
116. Brown DD (1997) The role of thyroid hormone in zebrafish and axolotl development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13011–6.
117. Elsalini OA, Rohr KB (2003) Phenylthiourea disrupts thyroid function in

- developing zebrafish. *Dev Genes Evol* 212:593–8. doi: 10.1007/s00427-002-0279-3
118. Nillni EA, Friedman TC, Todd RB, et al (1995) Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinant PC1. *J Neurochem* 65:2462–72.
 119. Nillni EA, Sevarino KA (2011) The Biology of pro-Thyrotropin-Releasing Hormone-Derived Peptides1. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.20.5.0379>
 120. Joseph-McCarthy D, Lolis E, Komives EA, Petsko GA (1994) Crystal structure of the K12M/G15A triosephosphate isomerase double mutant and electrostatic analysis of the active site. *Biochemistry* 33:2815–23.
 121. Lolis E, Alber T, Davenport RC, et al (2002) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution.
 122. Park SH, Kim HS, Park MS, et al (2015) Structure and Stability of the Dimeric Triosephosphate Isomerase from the Thermophilic Archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *PLoS One* 10:e0145331. doi: 10.1371/journal.pone.0145331
 123. Goldman AD, Beatty JT, Landweber LF (2016) The TIM Barrel Architecture Facilitated the Early Evolution of Protein-Mediated Metabolism. *J Mol Evol* 82:17–26. doi: 10.1007/s00239-015-9722-8
 124. Roland BP, Zeccola AM, Larsen SB, et al (2016) Structural and Genetic Studies Demonstrate Neurologic Dysfunction in Triosephosphate Isomerase Deficiency Is Associated with Impaired Synaptic Vesicle Dynamics. *PLOS Genet* 12:e1005941. doi: 10.1371/journal.pgen.1005941
 125. Ayako Kobayashi, Ayako Ichimura, Yukihiro Kobayashi KS (2016) Allergology International IgE-binding epitopes of various fish parvalbumins exist in a stereoscopic conformation maintained by Ca²⁺ binding. 4–7.
 126. Zhang F, Yu H, Ni X, et al (2016) Effect of ω-3 polyunsaturated fatty acids on the growth of IEC-6 cells injured by heavy metals. *Biomed reports* 4:635–641. doi: 10.3892/br.2016.621
 127. Falck F, Ricci A, Wolff MS, et al (1992) Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch Environ Health* 47:143–6.

128. Martinez-Zapien D, Saliou J-M, Han X, et al (2015) Intermolecular recognition of the non-coding RNA 7SK and HEXIM protein in perspective. *Biochimie* 117:63–71. doi: 10.1016/j.biochi.2015.03.020
129. Basilico F, Maffini S, Weir JR, et al (2014) The pseudo GTPase CENP-M drives human kinetochore assembly. *Elife* 3:e02978.
130. Wang Y, Shirogane T, Liu D, et al (2003) Exit from Exit: Resetting the Cell Cycle through Amn1 Inhibition of G Protein Signaling. *Cell* 112:697–709. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00121-1
131. Chen Z, Niu X, Li Z, et al (2011) Effect of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 37 on apoptotic in A549 cells. *Cell Biochem Funct* 29:142–148. doi: 10.1002/cbf.1734
132. Zhang M, Cai F, Zhang S, et al (2014) Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) delays Alzheimer's progression in vivo. *Sci Rep* 4:7298. doi: 10.1038/srep07298
133. Chen Y-J, Ma Y-S, Fang Y, et al (2013) Power and promise of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 37 as a target of cancer therapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 14:2173–9.
134. Bartolucci M, Ravera S, Garbarino G, et al (2015) Functional Expression of Electron Transport Chain and FoF1-ATP Synthase in Optic Nerve Myelin Sheath. *Neurochem Res* 40:2230–2241. doi: 10.1007/s11064-015-1712-0
135. Adams DR, Ron D, Kiely PA (2011) RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Commun Signal* 9:22. doi: 10.1186/1478-811X-9-22
136. Six E, Lagresle-Peyrou C, Susini S, et al (2015) AK2 deficiency compromises the mitochondrial energy metabolism required for differentiation of human neutrophil and lymphoid lineages. *Cell Death Dis* 6:e1856. doi: 10.1038/cddis.2015.211
137. Formoso E, Limongelli V, Parrinello M, et al (2015) Energetics and Structural Characterization of the large-scale Functional Motion of Adenylate Kinase. *Sci Rep* 5:8425. doi: 10.1038/srep08425
138. Main Tectonic Events and Metallogeny of the North China Craton - Google Livros. <https://books.google.com.br/books?id=OkS8DAAAQBAJ&pg=PA246&lpg=PA>

246&dq=El-

Desouky+et+al.,+2013&source=bl&ots=FRTsuYxXSI&sig=VkuK3kGRbIlPU9iCofa2lOEsa2E&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwijoZP0ovzRAhUBfZAKHS-cDzIQ6AEIHTAA#v=onepage&q&f=false. Accessed 6 Feb 2017

139. Poliana E, Gravina L (2016) FATORES ASSOCIADOS À CAPACIDADE FUNCIONAL EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA PRÉ-DIALÍTICA.
140. Martinez CS, Peçanha FM, Daniela S Brum, Francielli W Santos, Jeferson L Franco APPZ (2016) Reproductive dysfunction after mercury exposure at low levels : evidence for a role of glutathione peroxidase (GPx) 1 and GPx4 in male rats.
141. Agrárias DDEC, Rotta RB (2007) Estudo da atividade da enzima glutathione peroxidase em carne de frango.
142. Rima JAH, Martim SA, Dobbss LB, et al (2011) Adição de Ácido Cítrico Potencializa a Ação de Ácidos Húmicos e Altera o Perfil Protéico da Membrana Plasmática em Raízes de Milho. *Ciência Rural* 41:614–620. doi: 10.1590/S0103-84782011000400011
143. Bocchetti R, Fattorini D, Pisanelli B, et al (2008) Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquat Toxicol* 89:257–266. doi: 10.1016/j.aquatox.2008.07.011
144. Azooz MM, Abou-Elhamd MF, Al-Fredan MA (2012) Biphasic effect of copper on growth, proline, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of wheat (*Triticum aestivum* cv. Hasaawi) at early growing stage. *Aust J Crop Sci* 6:688–694.
145. Doris Abele, José Pablo Vazques-Medina TZ-S (2006) Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems - Google Livros. <https://books.google.com.br/books?id=l55uClBrY-UC&pg=PT436&lpg=PT436&dq=Sturve+et+al.,+2006&source=bl&ots=xDGv3LJt3Y&sig=FGpWvZGZ2ERXhUKdFDuyePjTDS&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwi1vrVqvzRAhXCUJAKHaY8CKEQ6AEIlzAC#v=>

onepage&q=Sturve et al.%2C 2006&f=fals. Accessed 6 Feb 2017

146. Petry HB, Reis B, Silva RR, et al (2015) Porta-enxertos influenciam o desempenho produtivo de laranjeiras-de-umbigo submetidas a poda dr??stica. *Pesqui Agropecu Trop* 45:449–455.
147. Berg J, Lässig M, Wagner A (2004) Structure and evolution of protein interaction networks: a statistical model for link dynamics and gene duplications. *BMC Evol Biol* 4:51. doi: 10.1186/1471-2148-4-51
148. Chandran K, Hu Z, Smets BF (2005) Applicability of an extant batch respirometric assay in describing dynamics of ammonia and nitrite oxidation in a nitrifying bioreactor. *Water Sci Technol* 52:503–8.
149. Dautremepuits C, Betoulle S, Paris-Palacios S, Vernet G (2004) Immunology-Related Perturbations Induced by Copper and Chitosan in Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Arch Environ Contam Toxicol* 47:370–8. doi: 10.1007/s00244-004-3115-0
150. Girotti S, Ferri E, Maccagnani L, et al (2002) Plasma antioxidant capacity determination: comparative evaluation of chemiluminescent and spectrophotometric assays. *Talanta* 56:407–14.
151. Blast2GO - Functional Annotation and Genomics. <https://www.blast2go.com/>. Accessed 9 Feb 2017

9 Anexos

Tabela 1. Resultados da caracterização dos *spots* proteicos por ESI MS MS do padrão certificado de metalotioneínas (MTs).

	Protein.Entry	Protein Accession	Protein.Description	Protein. score	Protein. avgMass	Protein. Matched Products	Protein.seq Cover(%)
Spot 1	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	515.3669	59241.7947	64	15.47
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	353.9767	49559.1506	33	10.62
	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	304.6099	49509.2266	25	11.06
	G1U9T6_RABIT	G1U9T6	Troponin T_ fast skeletal muscle (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=TNNT3 PE=4 SV=1	298.9175	25481.582	10	7.96
	TNNT3_RABIT	P02641	Troponin T_ fast skeletal muscle OS=Oryctolagus cuniculus GN=TNNT3 PE=1 SV=4	298.9175	34711.3728	10	5.73
	G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	279.3552	45973.1284	17	3.99
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	206.4519	50682.4752	22	6.68
	G1SWB0_RABIT	G1SWB0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT25 PE=4 SV=1	140.7615	50788.3631	9	2
	G1SWB8_RABIT	G1SWB8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT27 PE=4 SV=1	140.7615	51260.7945	9	1.96

Spot 2	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	855.3911	59241.7947	92	16.87
	G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	456.636	65708.7683	28	7.53
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	361.463	49559.1506	39	10.62
	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	337.5455	49509.2266	34	13.09
	G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	247.5824	45973.1284	16	3.99
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	214.4007	50682.4752	30	8.69
	G1TAY6_RABIT	G1TAY6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT19 PE=3 SV=1	183.9282	44683.0173	19	6.25
	G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	183.9282	86148.3415	22	3.35
	G1SDN2_RABIT	G1SDN2	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT17 PE=3 SV=1	183.9282	48298.1605	22	5.83
	K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_ type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	146.7177	46714.8636	13	3.89
Spot 3	G1SWB0_RABIT	G1SWB0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT25 PE=4 SV=1	139.9417	50788.3631	9	2
	G1SWB8_RABIT	G1SWB8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT27 PE=4 SV=1	139.9417	51260.7945	9	1.96
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	210.2457	59241.7947	36	7.56
	G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	155.6325	65708.7683	17	4.91

	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	139.2667	50682.4752	17	6.24
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	124.8869	49559.1506	18	6.19
	G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	119.6649	86148.3415	16	4.69
	K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_ type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	119.6649	46714.8636	16	8.52
Spot 4	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	721.7393	49509.2266	64	24.83
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	689.8272	59241.7947	78	13.88
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	490.1113	49559.1506	48	11.95
	G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	436.6606	65708.7683	36	9
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	429.4333	50682.4752	47	14.25
	G1TAY6_RABIT	G1TAY6	Uncharacterized protein OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT19 PE=3 SV=1	379.8722	44683.0173	25	6.25
	G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	379.8722	86148.3415	30	3.61
	G1SDN2_RABIT	G1SDN2	Uncharacterized protein OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT17 PE=3 SV=1	379.8722	48298.1605	30	6.29
	G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Orctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	375.1459	45973.1284	20	3.99

	K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_ type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	336.3712	46714.8636	19	3.89
	G1TDN6_RABIT	G1TDN6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT5 PE=3 SV=1	306.893	63656.6505	33	9.52
	G1SWB0_RABIT	G1SWB0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT25 PE=4 SV=1	288.3725	50788.3631	13	2
	G1SWB8_RABIT	G1SWB8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT27 PE=4 SV=1	288.3725	51260.7945	13	1.96
Spot 5	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	149.7053	59241.7947	43	10.9
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	165.815	59241.7947	35	7.03
Spot 6	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	116.5775	49559.1506	17	5.53
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	1045.082	59241.7947	116	13.88
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	527.5901	49559.1506	61	10.62
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	428.9557	50682.4752	48	14.25
Spot 7	G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	417.0717	65708.7683	37	11.29
	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	398.1713	49509.2266	50	18.06
	G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	320.0319	86148.3415	39	7.9
	G1TAY6_RABIT	G1TAY6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT19 PE=3 SV=1	287.7429	44683.0173	27	6.25

	G1SDN2_RABIT	G1SDN2	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT17 PE=3 SV=1	287.7429	48298.1605	30	6.29
	K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_ type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	290.7323	46714.8636	35	19.71
	G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	287.6369	45973.1284	28	3.99
	G1TMP1_RABIT	G1TMP1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=LOC100008885 PE=4 SV=1	181.3962	49365.3273	13	1.62
	G1TL31_RABIT	G1TL31	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=LOC100340601 PE=3 SV=1	181.3962	50598.7026	13	1.61
	G1T6X1_RABIT	G1T6X1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT31 PE=3 SV=1	181.3962	49409.183	13	1.68
	G1T4P0_RABIT	G1T4P0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT32 PE=3 SV=1	181.3962	51985.2971	13	1.57
	G1T6X4_RABIT	G1T6X4	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=LOC100343678 PE=3 SV=1	181.3962	53054.3114	13	1.54
	G1T4Q6_RABIT	G1T4Q6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT33B PE=3 SV=1	181.3962	47935.3771	13	1.73
	G1U758_RABIT	G1U758	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT18 PE=3 SV=1	181.3962	50670.7374	13	1.58
	G1SWS0_RABIT	G1SWS0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=LOC100343422 PE=3 SV=1	181.3962	52246.3629	13	1.56
	G1T4P5_RABIT	G1T4P5	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT35 PE=3 SV=1	181.3962	52245.3675	13	1.54
Spot 8	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	263.2363	59241.7947	36	7.56
	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	211.6544	49509.2266	28	7.67

	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	211.401	50682.4752	25	8.69
	G1TAY6_RABIT	G1TAY6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT19 PE=3 SV=1	201.0362	44683.0173	17	4
	G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	201.0362	86148.3415	21	3.61
	G1SDN2_RABIT	G1SDN2	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT17 PE=3 SV=1	201.0362	48298.1605	21	6.29
	K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_ type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	201.0362	46714.8636	17	3.89
Spot 9	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	2104.282	59241.7947	140	17.93
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	1198.428	49559.1506	78	11.95
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	920.3139	50682.4752	57	8.69
	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	901.9568	49509.2266	68	19.19
	G1TKH3_RABIT	G1TKH3	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Oryctolagus cuniculus GN=SOD1 PE=3 SV=1	623.7729	16212.6037	10	6.54
	G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	611.5447	45973.1284	31	3.99
	G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	500.6521	65708.7683	38	12.44
	G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	471.7038	86148.3415	37	3.61

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

	G1TDN8_RABIT	G1TDN8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT73 PE=3 SV=1	183.7841	60364.2297	25	21.5
	G1SRX8_RABIT	G1SRX8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=GFAP PE=3 SV=1	170.6446	49482.7961	30	17.3
	G1SS18_RABIT	G1SS18	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT8 PE=3 SV=1	159.1737	43444.8617	12	2.94
	G1SPP3_RABIT	G1SPP3	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT4 PE=3 SV=1	159.1737	65951.3716	11	1.85
	G1SHZ4_RABIT	G1SHZ4	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT7 PE=3 SV=2	159.1737	41730.8616	11	3.01
	G1TDN6_RABIT	G1TDN6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT5 PE=3 SV=1	143.5414	63656.6505	44	11.9
	REVERSE5355	REVERS E5355	Reversed Sequence 5355	138.7256	52920.9991	11	4.01
	G1TB09_RABIT	G1TB09	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KCTD20 PE=4 SV=1	96.3445	48646.3348	12	7.64
	G1U0K9_RABIT	G1U0K9	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT222 PE=3 SV=1	91.9084	35150.9061	10	7.12
	G1TE79_RABIT	G1TE79	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=1	78.2095	50053.8596	14	2.55
	G1T9C9_RABIT	G1T9C9	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=CCM2 PE=4 SV=1	55.1712	49222.3853	6	3.21
Spot 10	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	2745.12	18624.4871	70	48.78

G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	2524.246	18720.643	57	28.66
G1TC44_RABIT	G1TC44	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus PE=3 SV=1	2483.398	18684.6258	57	37.8
G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	454.1237	59241.7947	80	16.7
G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	291.8872	65708.7683	30	12.27
G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	212.8118	49559.1506	28	13.72
G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	186.8301	50682.4752	24	6.24
G1TE74_RABIT	G1TE74	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT20 PE=3 SV=2	111.3469	86148.3415	12	2.14
K1C12_RABIT	Q28706	Keratin_ type I cytoskeletal 12 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT12 PE=2 SV=1	111.3469	46714.8636	12	3.89
G1TAY6_RABIT	G1TAY6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT19 PE=3 SV=1	107.4454	44683.0173	11	4
G1SDN2_RABIT	G1SDN2	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT17 PE=3 SV=1	107.4454	48298.1605	11	3.73
G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	107.4454	49509.2266	11	3.61
G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	97.1009	45973.1284	7	1.75
G1SI20_RABIT	G1SI20	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Oryctolagus cuniculus GN=IDH1 PE=3 SV=1	95.9893	48829.0722	17	14.94

Spot 11	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	9846.166	18624.4871	122	65.24
	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	9642.029	18720.643	98	32.93
	G1TC44_RABIT	G1TC44	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus PE=3 SV=1	5246.1	18684.6258	92	54.27
Spot 12	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	14290.26	18624.4871	111	48.78
	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	14157.96	18720.643	101	32.93
	G1TC44_RABIT	G1TC44	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus PE=3 SV=1	6540.87	18684.6258	79	37.8
Spot 13	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	15401.4	18624.4871	120	60.37
	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	15022.94	18720.643	99	32.93
	G1TC44_RABIT	G1TC44	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus PE=3 SV=1	9511.501	18684.6258	88	49.39
	G1SDY5_RABIT	G1SDY5	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=YWHAZ PE=3 SV=1	180.4884	28875.488	17	21.54
Spot 14	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	4532.2	18624.4871	37	25

	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	4524.529	18720.643	35	19.51
	G1TPH4_RABIT	G1TPH4	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=MSRB1 PE=4 SV=1	780.5851	13642.0573	10	7.09
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	237.7597	59241.7947	51	11.07
	G1T4S1_RABIT	G1T4S1	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT13 PE=3 SV=2	175.4622	49559.1506	22	8.19
	G1T4R6_RABIT	G1T4R6	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT16 PE=3 SV=2	127.8581	50682.4752	12	4.23
	G1T8T1_RABIT	G1T8T1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT28 PE=4 SV=1	116.4369	45973.1284	13	3.99
	G1T1Y7_RABIT	G1T1Y7	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT14 PE=3 SV=2	116.4369	49509.2266	13	3.61
Spot 15	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	1496.712	18720.643	22	10.98
	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	1496.712	18624.4871	22	10.98
	G1TPH4_RABIT	G1TPH4	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=MSRB1 PE=4 SV=1	300.7414	13642.0573	7	7.09
	G1T1V0_RABIT	G1T1V0	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT10 PE=3 SV=1	185.9896	59241.7947	47	11.07
	G1U9I8_RABIT	G1U9I8	Uncharacterized protein OS=Oryctolagus cuniculus GN=KRT1 PE=3 SV=2	193.5002	65708.7683	19	4.91

Spot 16	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	1682.463	18720.643	19	10.98
	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	1682.463	18624.4871	19	10.98
	MT2C_RABIT	P80290	Metallothionein-2C OS=Oryctolagus cuniculus PE=1 SV=1	252.2853	7554.7983	14	56.45
Spot 17	G1TX83_RABIT	G1TX83	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=3 SV=1	169.2333	18720.643	9	10.98
	PPIA_RABIT	Q9TTC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Oryctolagus cuniculus GN=PPIA PE=2 SV=3	169.2333	18624.4871	9	10.98

Proteínas caracterizadas por ESI MS/MS dos spots que não apresentaram mercúrio nas análises por Absorção Atômica em Forno de Grafite (Tabelas 2 a 8).

Tabela 2. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de Tecido Muscular de Tucunaré (*Cichla spp*) (TM).

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
TM10	Hsp90 co-chaperone Cdc37-like 1	CD37L_DANRE	76.2908	6.9/17.88	5.36/36.371	20.13	AGQEGYLDVFHTELQAFK
							TCIQMQDMQILQNVLSSMNPQVAEYHVK SIINITQSWPNESDPDK ARALASSTELSHTEHQWR
TM20	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	126.6716	6.98/25.32	6.45/26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK RHVFGESDELIGQK
	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	126.6716	6.98/25.32	4.90/26.853	5.24	GAFTGEISPAMIK RHVFGESDELIGQK
TM21	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	126.3422	7.22/24.87	6.45/26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	126.3422	7.22/24.87	4.90/26.853	5.24	GAFTGEISPAMIK
TM22	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	460.9844	7.36/25.19	4.90/26.853	41.53	GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSERR EAGTTEDVVFEQTK GAFTGEISPAMIKDCGIDWVILGHSER ELAAQADVDGFLVGGASLKPEFVDIINARS HVFGESEDELIGQKVAHCLESDLGVIACIGEK

Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	309.3396	7.36/25.19	6.45/26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
Homeobox protein Nkx-2.2a	NX22A_DANRE	83.121	7.36/25.19	7.86/30.307	7.06	TPGVLVQSPLENVQNLPLK QQRYLSAPER
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	EIF3K_DANRE	63.0126	7.36/25.19	4.92/25.427	15.98	DLIDGITGFEE SVR DLIDGITGFEE SVRK LYQFNLAYFQTTVTAQILLK MATTFEQMRANVGK
14-3-3 protein beta/alpha-B	143BB_DANRE	59.3596	7.36/25.19	4.68/27.393	15.7	YLIANASQAESK LGLALNFSVFYYEILNSPENACQLAK

Tabela 3. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de Tecido Hepático de Tucunaré (*Cichla spp.*) (TH).

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
TH 60	60S ribosomal protein L22	RL22_ICTPU	339.1476	5.79/29.42	9.21/ 14.757	9.38	VVANTKESYELR
	PDZ domain-containing protein 11	PDZ11_DANRE	161.8012	5.79/29.42	6.51/16.424	16.9	AGLQEGDQVLSVNEVDFQDIEHSR IPYDDYQLPVVFLPSYENPPAWIPPQER
TH74	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	1331.523	7.06/25.17	6.45/26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK

TH75	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1331.523	7.06/25.17	4.90/ 26.853	5.24	GAFTGEISPAMIK
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	1828.119	7.23/25.03	6.45/26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1828.119	7.23/25.03	4.90/ 26.853	5.24	GAFTGEISPAMIK

Tabela 4. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido Hepático de Jaraqui (*Semaprochilodus sp.*) (JF).

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
JF 57	Protein broad-minded	BROMI_DANRE	56.7497	3.75/25.96	5.92/ 147.547	4.62	ISGAPSVECAEEILLHLEETDK EYVESSLGAVIEVETENFTK TEYNLREMATSVLDLMDR YLREYVESSLGAVIEVETENFTK SQFSTEDEAELQTLLR LNSMESALTHTADTLAR
JF 59	Transcription factor E2F7	E2F7_DANRE	53.7599	4.46/25.81	8.00/ 79.326	7.19	FLALYPDYPESSESINISLDEVATCLGVERR EGNGLHAVQHVQNAHAASSR EGNGLHAVQHVQNAHAASSRR LDIGHTAAN
JF108	Peroxisomal 2.4-dienoyl-CoA reductase	DECR2_DANRE	713.3394	6.03/27.44	7.73/ 31.999	13	VNTVAPGPISGTEGYR VNTVAPGPISGTEGYRR HLAVEWGPSGVR HGCDTVIASR

	Aldehyde dehydrogenase family 9 member A1-A	A9A1A_DANRE	90.5231	6.03/27.44	6.18/ 55.262	2.95	ANNTTFGLASGVFTR FLEEVVK
JF109	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase. mitochondrial	HOGA1_DANRE	481.236	5.82/27.59	8.91/ 35.307	6.79	LIEPNTAVTR LVMAGSGCESTR
	Peroxisomal 2.4-dienoyl-CoA reductase	DECR2_DANRE	189.447	5.82/27.59	7.73/ 31.999	11.67	VNTVAPGPISGTEGYRR VNTVAPGPISGTEGYR QPETILAAVDETLK QPETILAAVDETLKTFGR
JH120	Solute carrier family 25 member 47-A	S247A_DANRE	103.9638		9.70/32.15	2.38	LQMDGVR YSGPIHCLLSICR YSGPIHCLLSICREQGLSGLYR QMDGVR
JH121	Solute carrier family 25 member 47-A	S247A_DANRE	58.9564		9.70/32.15	9.86	LQMDGVR YSGPIHCLLSICREQGLSGLYR YSGPIHCLLSICR
JF136	DIS3-like exonuclease 1	DI3L1_DANRE	50.378	8.05/26.69	6.02/120.352	0.95	YIQGILSVNK ALADSLER
JF144	Fructose-bisphosphate aldolase B	ALDOB_DANRE	54.5234	8.78/41.02	8.48/39.288	16.48	ISDSCPSALGIAENANVLAR GILAADESTGTMAK VDKGTAGLAGTDGETTTQGLDGLSER

Tabela 5. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido Muscular de Filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) (FM).

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
----------	----------	--------	-------	---------------	--------------------	---------------	------------------------

FM28	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	256.5766	8.21/27.07	6.45/ 26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	256.5766	8.21/27.07	4.90/ 26.853	5.24	GAFTGEISPAMIK

Tabela 6. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido Hepático de Filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) (FH).

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
FH44	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1997.041	5.59/22.75	4.90/26.853	27.02	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK ANVSDAVADSVRIIYGGSVTGGNCK GIDWVILGHSER
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	755.1089	5.59/22.75	6.45/26.828	11.29	GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK
FH46	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	3687.184	4.42/26.27	4.90/ 26.853	28.63	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK ELAAQADVDGFLVGGASLKPEFVDIINAR GIDWVILGHSER
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	1793.685	4.42/26.27	6.45/ 26.828	11.29	GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK

FH47	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	2063.673	4.44/28.73	4.90/ 26.853	22.58	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK TASPEQAQEVHEK DCGIDWVILGHSERR GIDWVILGHSER
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	805.0159	4.44/28.73	6.45/ 26.828	11.29	GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK
FH48	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	309.8567	4.73/27.59	4.90/ 26.853	5.65	DCGIDWVILGHSER
	ATP synthase subunit beta. mitochondrial	ATPB_CYPKA	103.7908	4.73/27.59	5.05/ 55.247	16.6	LVLEVAQHLGENTVR IPVGPETLGR VALVYQGMNEPPGAR TIAMDGTGLVLR VLDTGAPIR VALTGLTVAEYFR IMNVIGEPIDER VLDTGAPIRIPVGPETLGR AHGGYSVFAGVGERTR
	BTB/POZ domain-containing protein KCTD6	KCTD6_DANRE	61.5789	4.73/27.59	6.11/ 27.632	4.22	DAQGNYFIDR VHLMDYITKQGFTIR
FH49	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1549.035	5.21/26.27	4.90/ 26.853	10.89	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	882.8912	5.21/26.27	6.45/ 26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
	ATP synthase subunit beta. mitochondrial	ATPB_CYPKA	114.4909	5.21/26.27	5.05/ 55.247	12.93	LVLEVAQHLGENTVR IPVGPETLGR VALVYQGMNEPPGAR TIAMDGTGLVLR LGAVGR AHGGYSVFAGVGER VALTGLTVAEYFR VLDTGAPIRIPVGPETLGR
FH50	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	114.461	5.37/26.27	4.90/26.853	5.65	DCGIDWVILGHSER

FH55	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	383.4862	6.36/25.23	4.90/ 26.853	16.94	GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSER VVLAYEPVWAIGTGK
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	356.8373	6.36/25.23	6.45/ 26.828	11.29	GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK
	Proteasome subunit beta type-1-B	PSB1B_CARAU	122.944	6.36/25.23	6.52/26.002	5.91	GAVYSFDPVGSYQR
	Proteasome subunit beta type-1-A	PSB1A_CARAU	122.944	6.36/25.23	6.52/26.175	5.88	GAVYSFDPVGSYQR
FH56	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	124.2217	6.58/25.02	4.90/ 26.853	15.32	GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSER VIADNVKDWTR GWLRANVSDAVADSVR
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	107.4444	6.58/25.02	6.45/ 26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK

Tabela 7. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido Muscular de Barba-Chata (*Pinirampus pirinampu*) (BCM).

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
----------	----------	--------	-------	---------------	--------------------	---------------	------------------------

BCM8	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	587.9317	6.45/ 26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	587.9317	4.90/ 26.853	5.24	GAFTGEISPAMIK
BCM18	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	1359.526	8.19/35.784	12.91	VPTPNVSVVDLTVR LVTWYDNEFGYSNR LTGMAFR VGINGFGR
BCM19	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	102.7835	8.19/35.784	4.2	VPTPNVSVVDLTVR
BCM25	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN_DANRE	2201.612	6.60/ 24.460	6.51	VASETALPDEDDDL VASETAL
	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	654.714	4.90/ 26.853	16.13	GAFTGEISPAMIK DCGIDWVILGHSER IIYGGSVTGGNCK VIADNVKDWTR
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	513.9687	6.45/ 26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	69.2913	8.19/ 35.784	4.2	VPTPNVSVVDLTVR LVTWYDNEFGYSNR
BCM26	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	2809.631	4.90/ 26.853	10.48	GAFTGEISPAMIK IIYGGSVTGGNCK
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	2800.162	6.45/ 26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK

BCM29	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	985.8698	4.90/ 26.853	25.4	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK VIADNVKDWTR ANVSDAVADSVR IYGGSVTGGNCK
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	589.796	6.45/ 26.828	10.48	GAFTGEISPAMIK IYGGSVTGGTCK
	Actin. cytoplasmic 1	ACTB1_DANRE	89.8146	5.30/41.767	15.73	SYELPDGQVITIGNER IWHHTFYNELR AVFPSIVGRPR DLYANTVLSGGTTMYPGIADR MQKEITSLAPSTMK FPSIVGRPR
BCM40	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_DANRE	889.7413	6.83/ 36.246	9.91	VIGSGTNLDSAR VVVVTAGAR LSGLPR LNLVQR SGLPR VVTAGAR LVQR GLPR
	L-lactate dehydrogenase B-B chain	LDHBB_DANRE	636.3925	8.62/ 36.710	5.39	VIGSGTNLDSAR LNLVQR LVQR
	L-lactate dehydrogenase B-A chain	LDHBA_DANRE	636.3925	6.39/ 36.247	5.39	VIGSGTNLDSAR LNLVQR LVQR
BCM43	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	1917.961	8.19/35.784	10.51	VPTPNVSVVDLTVR LVTWYDNEFGYSNR LTGMAFR GMAFR DLTVR

Tabela 8. Proteínas identificadas utilizando ESI MS/MS nas amostras de tecido Hepático de Barba-Chata (*Pinirampus pinirampu*) (BCH).

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM do spot	pI/MM teórica (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
----------	----------	--------	-------	---------------	--------------------	---------------	------------------------

BCH32	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	244.1696	4.90/ 26.853	5.65	DCGIDWVILGHSER
	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	138.4102	8.19/ 35.784	4.2	VPTPNVSVVDLTVR LEKPAKYDEIK
BCH49	Glycosyltransferase-like domain-containing protein 1	GTDC1_DANRE	103.7032	7.34/ 49.737	5.54	QLSFEVSVLGETFTDVPDIFSEAK SHIQTSSPSSYPDVEPPEK
BCH64	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	MTAP_DANRE	286.6013	5.99/ 30.847	50.36	IGIIGGSGLDDPDILEGR AESLMFR VQTFYDGGQPTSPPGVCHIPMAEPFCSK QHTIMPTNVNYQ ANIWALKEEGCTHLLVTTACGSLREDIQPGDIVLIDQFIDR ASSILLTAIPQICQMDWDSTINAHKSMSQSSVMLPK VQTFYDGGQPTSPPGVCHIPMAEPFCSK
BCH65	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1440.038	4.90/ 26.853	27.02	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK VIADNVKDWTR ELAAQADVDGFLVGGASLKPEFVDIINAR
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	221.7584	6.45/ 26.828	5.24	GAFTGEISPAMIK
	Alpha-endosulfine	ENSA_DANRE	131.0833	7.68/ 13.756	12.9	YPSLGHKPGGSDFLMK YPSLGHKPGGSDFLMKR
BCH69	Triosephosphate isomerase A	TPISA_DANRE	1947.918	4.90/ 26.853	16.94	DCGIDWVILGHSER GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK
	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	881.053	6.45/ 26.828	11.29	GAFTGEISPAMIK VVLAYEPVWAIGTGK

BCH73	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN_DANRE	341.6551	6.60/24.460	6.51	VASETALPDEDDDL
	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	DECR2_DANRE	163.8472	7.73/ 31.999	9.67	VNTVAPGPISGTEGYR VNTVAPGPISGTEGYRR HLAVEWGPGSVR VNTVAPGPISGTEGYRR VNTVAPGPISGTEGYR
BCH74	Axin-1	AXIN1_DANRE	105.263	6.71/ 94.329	6.59	VLPGYLPTVIEDVEWR YQDNREYR GPYGSISGPKK RPDLDLGYEPEGSASPTPPYLK TGGESPKLFSDQSSVSGNGK YGSISGPKK
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	G3P2_DANRE	1386.215	6.55/ 36.107	6.27	VPVADVSVVDLTCR LTGMAFR GMAFR
BCH77	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	972.1147	8.19/ 35.784	10.51	VPTPNVSVVDLTVR LTGMAFR LVTWYDNEFGYSNR LTGMAFR GMAFR

10 Súmula Curricular

Nome: José Cavalcante Souza Vieira

Data de nascimento: 22 de março de 1982

Nacionalidade: Brasileiro

Natural de: Poxoréo/Mato Grosso (MT)

Email: jcavalcante@ibb.unesp.br ou jcavalcante-s@bol.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2008 - 2011 Licenciatura em Ciências Biológicas

Universidade Federal de Mato Grosso UFMT / Campus de Rondonópolis.

2012 – 2014 Mestre em Biologia Geral e Aplicada (BGA)

UNESP – Instituto de Biociências de Botucatu

2014 - 2017 Doutorado em Biologia Geral e Aplicada (BGA)

UNESP – Instituto de Biociências de Botucatu

PRODUÇÃO ACADÊMICA DESENVOLVIDA NO PERÍODO DO DOUTORADO

Disciplinas cursadas

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Tópicos especiais: Aspectos Atuais nas Herpesvíroses e Desenvolvimento de Vacinas

Conceito – A

Créditos: 01

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges e Prof. Dr. Hélio Langoni

Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada

Ética na pesquisa: vamos falar sobre isto?

Conceito – A

Créditos: 03

Biologia do Músculo Estriado Esquelético

Conceito – A

Créditos: 04

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho e Prof^a. Dr^a. Maeli Dal Pai

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada

Conceito – A

Créditos: 02

Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes e Prof^a. Dr. José Maurício Sforcin

Sinalização Celular

Conceito – A Créditos: 04

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Estratégias de Preparo de Amostras Biológicas para Abordagens Proteômicas e Metalômicas.

Conceito – A

Créditos: 05

Pedro de Magalhães Padilha

Estágio Docência – carga horaria 60h

Total: 20 créditos

Trabalhos em congressos

VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; CAVECCI, B.; BITARELLO, A. C., QUEIROZ, J. V.; OLIVEIRA, G.; PADILHA, P. M. ANÁLISE COMPARATIVA DO MERCÚRIO ANTES E DEPOIS DA CONSTRUÇÃO DA BARRAGEM DE JIRAU EM PORTO VELHORONDÔNIA. *19º Encontro Nacional de Biomedicina – 19º ENBM*. Botucatu, SP. 2016.

MALHEIROS, J. M.; **VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA**; VALENCIA-ENRIQUEZ, C. E.; BRAGA, CAMILA PEREIRA; VENTURINI, G. C.; OLIVEIRA, H. N.; PADILHA, PEDRO M.; CHARDULO, L. A. L. Calcium Concentration in Muscle Longissimus thoracis and Meat Tenderness of Nellore Cattle. *18th International Conference on Heavy Metals in the Environment, ICHMET 2016*, em Ghent, Belgium, 2016.

VIEIRA, J. C. S.; QUEIROZ, J. V.; CAVECCI, B.; BITARELLO, A. C.; BRAGA, C. P.; OLIVEIRA, G.; LIMA, P. M.; ZARA, L. F.; PADILHA, P. M. Mercury Determination in the fish species usually traded of the Madeira River, the Brazilian Amazon, *Simposio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes (Aquanutri)*, Botucatu, 2016.

VIEIRA, JOSÉ C. S.; BRAGA, CAMILA P.; CAVECCI, B.; QUEIROZ, J. V.; OLIVEIRA, G.; BITARELLO, A. C.; ZARA, L. F.; PADILHA, P. M. Mercury Fractionation in Tucunaré (*Cichla spp*) and Filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) from Brazilian Amazon, *18th International Conference on Heavy Metals in the Environment, ICHMET 2016*, em Ghent, Belgium, 2016.

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

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

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

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

CAVECCI, B.; **VIEIRA, J. C. S.**; QUEIROZ, J. V.; BITARELLO, A. C.; PADILHA, CILENE C. F.; ZARA, L. F.; PADILHA, PEDRO DE M. Characterization of Mercury-Bound Protein in Fish of the Amazon In: *6º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes AquaNutri*, Botucatu, 2015.

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

VIEIRA, J. C. S.; CAVECCI, B.; QUEIROZ, J. V.; BITARELLO, A. C.; BRAGA, CAMILA P.; PADILHA, CILENE C. F.; ZARA, LUIZ F.; PADILHA, PEDRO M. Determination of Mercury Fraction linked to protein of muscle tissue and liver of fish from Amazon region-Brazil In: *38º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia*, 2015.

VIEIRA, J. C. S.; QUEIROZ, J. V.; CAVECCI, BRUNA; BITTARELLO, ALIS CORREIA; BRAGA, CAMILA PEREIRA; OLIVEIRA, G. Mercury Determination in the Fish Species Usually Traded of the Madeira River, the Brazilian Amazon In: *Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes- AquaNutri*, Botucatu, 2015.

QUEIROZ, J. V.; **VIEIRA, J. C. S.**; CAVECCI, B.; BITARELLO, A. C.; BRAGA, CAMILA P.; PADILHA, CILENE C.F.; ZARA, LUIZ FABRÍCIO; PADILHA, PEDRO M. Mercury Fractionation in Filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) of the Madeira River in Brazil Using Metalloproteomic Strategies In: *Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes - 6º AquaNutri*, 2015.

VIEIRA, J. C. S.; CAVECCI, BRUNA; QUEIROZ, J. V.; BITARELLO, A. C.; BRAGA, CAMILA PEREIRA; PADILHA, CILENE C.F.; ZARA, LUIZ FABRÍCIO; PADILHA, PEDRO M. Mercury Fractionation in Fish of the Madeira River-Brazil Using

Metalloproteomic Strategies In: *EuroAnalysis The European Conference on Analytical Chemistry*, 2015.

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

VIEIRA, J. C. S.; QUEIROZ, J. V.; CAVECCI, B.; BITARELLO, A. C.; BRAGA, CAMILA PEREIRA; OLIVEIRA, G.; ZARA, L. F.; PADILHA, PEDRO DE M. Potential Protein Biomarkers of Mercury Toxicity in Amazonian Fish In: *9 CTDC e XIX CBTox*, Natal, 2015.

VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, CAMILA PEREIRA; CAVECCI, B.; BITARELLO, A. C.; QUEIROZ, J. V.; OLIVEIRA, G.; PADILHA, PEDRO M. Quantificação de mercúrio em tecido hepático de peixes Amazônicos In: *XIV Workshop da Pós-Graduação*, 2015.

OLIVEIRA, G.; **VIEIRA, J. C. S.**; BRAGA, C. P.; CAVECCI, BRUNA; BITTARELLO, A. C.; QUEIROZ, J. V.; PADILHA, P. M. Análise quantitativa de mercúrio em fígado de Jaraqui, Tucunaré e Filhote da região de Porto Velho - Brasil, 2014.

BITTARELLO, A.C.; **VIEIRA, J. C. S.**; BRAGA, C. P.; CAVECCI, B.; QUEIROZ, J. V.; PADILHA, CILENE C.F.; ZARA, L. F.; PADILHA, PEDRO DE M. Biomarcadores proteicos de mercúrio em peixes da bacia do rio madeira Rondônia / Ro, 2014.

VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; CAVECCI, B.; BITTARELLO, A.C.; QUEIROZ, J. V.; PADILHA, PEDRO DE M. Biomarcadores Proteicos de Mercúrio em Tecido Hepático de Peixe Jaraqui (*Semaprochilodus sp*) do rio Madeira/Brasil, 2014.

SILVA, T. M.; FIGUEIREDO, W. S.; BITTARELLO, A. C.; CAVECCI, B.; **VIEIRA, J. C. S.**; ZARA, L. F.; PADILHA, PEDRO DE M. Determinação de Mercúrio total em amostras de leite de Lactantes residentes no alto rio Madeira, Rondônia, Brasil, 2014.

SILVA, T. M.; FIGUEIREDO, W. S.; CAVECCI, B.; **VIEIRA, J. C. S.**; PADILHA, CILENE C.F.; ZARA, L. F.; PADILHA, PEDRO DE MAGALHÃES. Estudo

metaloproteômico quantitativo do mercúrio em amostras de leite de lactantes residentes no alto rio Madeira, Rondônia, Brasil, 2014.

QUEIROZ, J. V.; CAVECCI, BRUNA; **VIEIRA, J. C. S.**; BRAGA, CAMILA PEREIRA; BITTARELLO, A.; PADILHA, I. F.; PADILHA, CILENE C.F.; PADILHA, PEDRO DE M. Estudos de Biomarcadores de Toxicidade de Mercúrio em Tucunaré (*Cichla sp.*) Coletados na Região do Rio Madeira, 2014.

BITTARELLO, A.; CAVECCI, B.; **VIEIRA, J. C. S.**; BRAGA, C. P.; QUEIROZ, J. V.; PADILHA, I. F.; PADILHA, CILENE C.F.; PADILHA, PEDRO DE M. Estudos Iniciais do Metaloma de Curimatã (*Prochilodus sp.*) da Região Amazônica, Buscando Biomarcadores de Toxicidade de Mercúrio, 2014.

PADILHA, PEDRO DE MAGALHÃES; **VIEIRA, JOSÉ C.S.**; BITTARELLO, A.; QUEIROZ, J. V.; BRAGA, C. P.; CAVECCI, B.; PADILHA, CILENE C.F.; ZARA, L. F. Mapeamento de mercúrio em spots proteicos de tecido hepático de peixes da região Amazônica, 2014.

PADILHA, CILENE C.F.; CAVECCI, B.; BITTARELLO, A.; LIMA, P. M.; **VIEIRA, J. C. S.**; QUEIROZ, J. V.; BRAGA, CAMILA PEREIRA; PEZZATO, L. E.; PADILHA, PEDRO DE M. Perfil Metalômico de tecido de Tilápia do Nilo criadas em cativeiro, 2014.

VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; CAVECCI, BRUNA; BITTARELLO, A.; QUEIROZ, J. V.; OLIVEIRA, G.; PADILHA, PEDRO DE M. Possíveis Proteínas Biomarcadoras de Mercúrio em Tecido Hepático de Peixe da Bacia do Rio Madeira/Brasil, 2014.

VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; CAVECCI, BRUNA; OLIVEIRA, G.; QUEIROZ, J. V.; PADILHA, CILENE C.F.; PADILHA, PEDRO DE M. Proteínas Marcadoras de Mercúrio em peixes do Rio Madeira - Amazonas Brasileira, 2014.

VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; CAVECCI, BRUNA; BITTARELLO, A.; QUEIROZ, J. V.; PADILHA, PEDRO DE M. Quantificação de Mercúrio em Fígado de Peixe Filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) da Região de Porto Velho/Brasil por GFAAS, 2014.

VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; QUEIROZ, J. V.; PADILHA, P. M. Quantification of Mercury by GFAAS in Samples of Hepatic Tissue of Tucunaré Region in the AHE Jirau Region -Amazon-Brazil, 2014.

VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; QUEIROZ, J. V.; PADILHA, P. M. Quantification of Mercury by GFAAS in Samples of Hepatic Tissue of Tucunará Region in the AHE Jirau Region -Amazon-Brazil, 2014.

CAVECCI, B.; **VIEIRA, J. C. S.;** BRAGA, C. P.; QUEIROZ, J. V.; BITTARELLO, A.; PADILHA, I. F.; PADILHA, CILENE C.F.; PADILHA, PEDRO DE M. Relação Estequiométrica entre moléculas de proteína e átomos de Mercúrio em amostras de Dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) utilizando 2D-PAGE e GFAAS, 2014.

Curso de curta duração ministrado

Curso Teórico Prático em Preparo de Amostras, Eletroforese e Radiação Gama. **José Cavalcante Souza Vieira;** Érica Amanda de Barros; Jéssica Malheiros. Workshop da Pós-Graduação 2014.

Proteômica e Metalômica: Abordagens e Estratégias de Análise. **José Cavalcante Souza Vieira** e Bruna Cavecci. Workshop da Pós-Graduação 2015.

Participação como ouvinte em minicurso.

Princípios Básicos de Liofilização. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Curso de curta duração em Metabolômica: conceitos básicos, instrumentação e técnicas. Congresso Brasileiro de Química, CBQ, Brasil.

Escrita de Artigos Científicos de Alto Impacto. UNESP. SP. 17º ENBM.

Prêmio em congresso

Menção Honrosa no XIII Prêmio Edy de Lello Montenegro de Pós-Graduação do 18º Encontro Nacional de Biomedicina, UNESP de Botucatu. 18º ENBM, 2015.

Menção Honrosa no VI Prêmio Márcia Guimarães da Silva de Apresentação de Paineis do 17º Encontro Nacional de Biomedicina de Botucatú-SP, UNESP/Botucatu, 2014.

Artigos publicados

BRAGA, CAMILA P.; **VIEIRA, J. C. S. José C.S. Vieira;** GROVE, R. A.; BOONE, C. H.; LEITE, A. L.; BUZALAF, MARÍLIA A. R.; FERNANDES, A. A. H.; ADAMEC, J.; PADILHA, PEDRO M.. A proteomic approach to identify metalloproteins and metal-

binding proteins in liver from diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017.

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

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

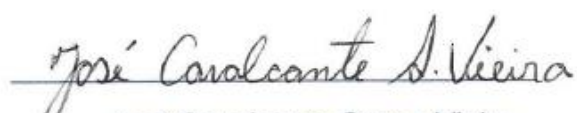
POZZI, CARLA MARIANE COSTA; BRAGA, CAMILA PEREIRA; **VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA**; CAVECCI, BRUNA; VITOR DE QUEIROZ, JOÃO; DE SOUZA BARBOSA, HERBERT; ARRUDA, MARCO AURELIO ZEZZI; GOZZO, FABIO CESAR; PADILHA, PEDRO DE MAGALHÃES. Metal ions bound to the human milk immunoglobulin A: *Metalloproteomic approach*. *Food Chemistry*, 2015.

CAVECCI, BRUNA; DE LIMA, PAULA MONTEIRO; **VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA**; BRAGA, CAMILA PEREIRA; DE QUEIROZ, JOÃO VITOR; BITTARELLO, ALIS CORREIA; DE PADILHA, PEDRO MAGALHÃES. Use of ultrasonic extraction in determining apparent digestibility in fish feed. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2015.

DE CASTRO, CECÍLIA SILVA; ARGENTIM, DANIEL; NOVELLI, PAULA KERNI; COSTA, JULIANA MARA; DE MENEZES, CAMILA SOUSA MAGELA; NETO, ARMANDO CONTIN; **DE SOUZA VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE**; DE MAGALHÃES PADILHA, PEDRO; AGOSTINHO, CLAUDIO ANGELO. Feed digestibility and productive performance of bullfrogs raised in cages and fed in different periods and high frequency. *Aquaculture (Amsterdam)*, 2014.



Pedro de Magalhães Padiha



José Cavalcante Souza Vieira