

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO DE BIOMARCADORES DE MERCÚRIO EM PEIXES
DA AMAZÔNIA POR MEIO DA METALÔMICA E ANÁLISE
DO ESTRESSE OXIDATIVO**

ALIS CORREIA BITTARELLO

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção do
título de doutor.

BOTUCATU - SP
Julho - 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO DE BIOMARCADORES DE MERCÚRIO EM PEIXES
DA AMAZÔNIA POR MEIO DA METALÔMICA E ANÁLISE
DO ESTRESSE OXIDATIVO**

ALIS CORREIA BITTARELLO

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha
Coorientadores: Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri
Dra. Camila Pereira Braga

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção do
título de doutor.

BOTUCATU - SP
Julho - 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

Bittarello, Alis Correia.

Estudo de biomarcadores de mercúrio em peixes da Amazônia por meio da metalômica e análise do estresse oxidativo / Alis Correia Bittarello. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Coorientador: Luciana Francisco Fleuri

Coorientador: Camila Pereira Braga

Capes: 50400002

1. Eletroforese bidimensional.
2. Stress oxidativo.
3. Mercúrio.
4. Espectrometria de massa.

Palavras-chave: Eletroforese bidimensional; Estresse oxidativo; Mercúrio; Proteína.

Dedico

À minha querida mãe, pelo apoio incondicional, mesmo sem compreender muito bem os caminhos que escolhi, e por ter me ensinado a levantar a cabeça e a nunca desistir.

Agradeço

Ao meu orientador, Dr. Pedro de Magalhães Padilha, pela oportunidade e confiança. A sua dedicação ao ensino é um exemplo que vou levar para a vida!

À minha coorientadora, Dra. Luciana F. Fleuri, pela paciência, atenção e carinho. Me espelho em sua maneira afetuosa, respeitosa e sensível de se relacionar com os alunos e colegas!

À minha outra coorientadora, colega e amiga, Dra. Camila P. Braga, que foi a primeira a me estender a mão. Sua generosidade ao ensinar é extraordinária!

À todos os professores que já tive e me ajudaram a trilhar este caminho, em especial: ao Professor Otaviano Carneiro da Cunha Filho (UDESC), que foi o primeiro a jogar a semente e acreditar que eu poderia ir um pouco mais longe; ao Professor Sergio Makrakis (UNIOESTE), que me deu o meu primeiro "sim", confiando em uma pessoa que "caiu de paraquedas" no seu grupo de pesquisas, me direcionando para o melhor sempre; ao Professor Wilson R. Boscolo (UNIOESTE), que me deu sua confiança e todo o suporte para que eu pudesse crescer como pessoa e profissional. Meu eterno obrigada aos senhores que me impulsionaram para chegar até este momento e me deram mais que lições acadêmicas, me deram lições de vida de valor inestimável!

Aos meus colegas de laboratório, por todo apoio. Especialmente ao José C. Vieira, pela paciência diante de todas as minhas dúvidas e questionamentos. Não tenho dúvidas de que o futuro lhe reserva muito sucesso!

Ao meu psicólogo Ronaldo Tadeu Felitti, por me ajudar a lidar com meus medos e inseguranças. Por me ensinar que a vida é fé, coragem e movimento. O Sr. é um ser de luz!

Aos meus queridos amigos de departamento: Vânia A. Oliveira (Vâ), Carol Rodrigues (Carolzinha), Gabriela V. Athanázio (Gabi), Danielle Silva (Dani), Elaine Morato (Elaininha), Fabio Fava (Fabinho), Edilson Ramos e Rodrigo Zaluski, pelas longas conversas, pelo apoio nas horas tristes, pelo carinho e pelos sorrisos abundantes.

Aos meus amigos da vida: João Gabriel R. Almeida, Celita Mattiello, Bruno P. Souza, Lucelia Tessaro, Denise Bastos, Mariucha Rocha e Junior De Carli, que participaram desta parte da minha vida me dando todo suporte "técnico", "logístico", afetivo e "auditivo". Sou melhor hoje porque tenho pessoas como vocês ao meu lado, que me levam para frente sempre, nem que seja na base do "empurrão"! Gratidão eterna!

AUXÍLIOS FINANCEIROS

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

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



CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Processos: 2010/51332-5 e 2013/21297-1



CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Processo: 472388/2011-8



FUNDIBIO – Fundação do Instituto de Biociências



PROPG – Pró-Reitoria de Pós-Graduação



SUMÁRIO

CAPÍTULO I

ESTUDO DE BIOMARCADORES DE MERCÚRIO EM PEIXES DA AMAZÔNIA POR MEIO DA METALÔMICA E ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO	1
RESUMO GERAL	2
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1. A Região Amazônica e a Problemática do Mercúrio	8
2.2. A Espreciação do Mercúrio e sua Presença no Ambiente	9
2.3. Toxicocinética e Toxicodinâmica do Mercúrio	11
2.4. Biomarcadores de Toxicidade	15
2.5. Peixes como Indicadores da Saúde Ambiental	17
2.6. Radicais Livres, Espécies Reativas de Oxigênio, Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo.....	20
2.6.1. <i>Radicais livres e Espécies Reativas de Oxigênio</i>	20
2.6.2. <i>Antioxidantes Enzimáticos Endógenos</i>	23
2.6.3. <i>Contaminação Ambiental e o Estresse Oxidativo</i>	25
2.7. Proteômica e Metaloproteômica	27
3. REFERÊNCIAS	30

CAPÍTULO II

BIOMARCADORES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO HEPÁTICO E RENAL DE PEIXES DA AMAZÔNIA	42
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. Coleta e Preparo das Amostras	47
2.2. Extração, Precipitação e Quantificação de Proteínas	48
2.3. Eletroforese Bidimensional	48
2.4. Determinação de Mercúrio Total	50
2.5. Preparo e Identificação dos <i>Spots</i> Proteicos	51
2.6. Análise da Atividade das Enzimas do Sistema Antioxidante	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
5. REFERÊNCIAS	82

CAPÍTULO III

BIOMARCADORES MOLECULARES DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO MUSCULAR DE PEIXES AMAZÔNICOS	96
1. INTRODUÇÃO	99
2. MATERIAL E MÉTODOS	100
2.1. Coleta e Preparo das Amostras	100
2.2. Extração, Precipitação e Quantificação de Proteínas	101
2.3. Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE)	102
2.4. Determinação de Mercúrio Total	103
2.5. Preparo e Identificação dos <i>Spots</i> Proteicos	104
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
5. REFERÊNCIAS	117

CAPÍTULO IV

IMPLICAÇÕES	124
-------------------	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

BIOMARCADORES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO HEPÁTICO E RENAL DE PEIXES DA AMAZÔNIA

Tabela 1. Determinação de mercúrio total nos tecidos e precipitados proteicos de fígado e rim de <i>Plagioscion squamosissimus</i> e <i>Colossoma macropomum</i>	56
Tabela 2. Proteínas identificadas por espectrometria de massa, a partir da identificação e quantificação do mercúrio por GFAAS, no tecido hepático de <i>Plagioscion squamosissimus</i> e <i>Colossoma macropomum</i>	60
Tabela 3. Proteínas identificadas por espectrometria de massa, a partir da identificação e quantificação do mercúrio por GFAAS, no tecido renal de <i>Plagioscion squamosissimus</i> e <i>Colossoma macropomum</i>	62
Tabela 4. Atividade enzimática e concentração de hidroperóxido de lipídeos e mercúrio total no tecido hepático e renal de <i>Plagioscion squamosissimus</i> e <i>Colossoma macropomum</i>	78

CAPÍTULO III

BIOMARCADORES MOLECULARES DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO MUSCULAR DE PEIXES AMAZÔNICOS

Tabela 2. Determinação da concentração mercúrio total no tecido e precipitado proteico de músculo de <i>Plagioscion squamosissimus</i> e <i>Colossoma macropomum</i>	105
Tabela 2. Concentração de mercúrio nos spots proteicos obtidos por GFAAS. Massa molecular e ponto isoeletroco experimental de cada spot do tecido muscular de <i>Plagioscion squamosissimus</i> e <i>Colossoma macropomum</i>	108
Tabela 3. Proteínas identificadas por espectrometria de massa, a partir da identificação e quantificação do mercúrio por GFAAS, no tecido muscular de <i>Plagioscion squamosissimus</i> e <i>Colossoma macropomum</i>	109

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

ESTUDO DE BIOMARCADORES DE MERCÚRIO EM PEIXES DA AMAZÔNIA POR MEIO DA METALÔMICA E ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

Figura 1. Anatomia simplificada de um peixe teleósteo	13
Figura 2. Representação da ordem sequencial de respostas a poluentes dentro de um sistema biológico e local de atuação dos biomarcadores	16
Figura 3. <i>Plagioscion squamosissimus</i> (Heckel, 1840); nome vulgar: corvina, pescada ou pescada-branca	18
Figura 4. Exemplar jovem e adulto de <i>Colossoma macropomum</i> (Cuvier, 1818), respectivamente; nome vulgar: tambaqui	20
Figura 5. Papel das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa-S-transferase (GST), glutationa redutase (GR) e outros antioxidantes primários na defesa contra as espécies reativas de oxigênio (ERO). GSH = glutationa reduzida, GSSG = glutationa oxidada	25

CAPÍTULO II

BIOMARCADORES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO HEPÁTICO E RENAL DE PEIXES DA AMAZÔNIA

Figura 1. Mapa dos locais de coleta no Rio Madeira, a jusante e a montante da área do UHE Jirau-RO. 1-Caripunas (09°11'16,98"S 064°36'44,53"W); 2-Área da represa; 3-Rau (09°16'12,8"S 064°41'14,1"W); 4-São Lourenço (09°23'26,5"S 064°53'05,7"W)	47
Figura 2. Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por eletroforese 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido hepático de <i>Plagioscion squamosissimus</i> (A) e <i>Colossoma macropomum</i> (B)	57
Figura 3. Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por eletroforese 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido renal de <i>Plagioscion squamosissimus</i> (A) e <i>Colossoma macropomum</i> (B).....	58

CAPÍTULO III

BIOMARCADORES MOLECULARES DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO MUSCULAR DE PEIXES AMAZÔNICOS

Figura 1. Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por eletroforese 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular de <i>Plagioscion squamosissimus</i> (A) e <i>Colossoma macropomum</i> (B).	107
--	-----

CAPÍTULO I

*Estudo de Biomarcadores de Mercúrio em Peixes da Amazônia
por Meio da Metalômica e Análise do Estresse Oxidativo*

ESTUDO DE BIOMARCADORES DE MERCÚRIO EM PEIXES DA AMAZÔNIA POR MEIO DA METALÔMICA E ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

RESUMO GERAL

O mercúrio é um metal tóxico, de distribuição ubíqua, com capacidade para bioacumulação e biomagnificação, que provoca alterações em biomoléculas importantes no metabolismo e contribui para o estabelecimento do estresse oxidativo em organismos aquáticos. Logo, o presente estudo teve por objetivo identificar e avaliar possíveis biomarcadores proteicos e/ou enzimáticos da toxicidade do mercúrio em peixes da região amazônica, por meio do estudo metaloproteômico e avaliação do estresse oxidativo. Foram utilizadas metodologias de fracionamento e identificação de proteínas por eletroforese bidimensional (2D PAGE) associada à espectrometria de massas (MS), mapeamento do mercúrio, em *spots* proteicos, por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) e avaliação de marcadores de estresse oxidativo. As espécies utilizadas foram o *Plagioscion squamosissimus* (corvina) e *Colossoma macropomum* (tambaqui), coletados na área da Usina Hidrelétrica de Jirau (rio Madeira-RO), que foram selecionadas em função da abundância populacional, interesse para a pesca e posição diferente na cadeia trófica (carnívoro e onívoro, respectivamente). Os tecidos amostrados foram o hepático, renal e muscular. Os resultados obtidos demonstraram maior concentração de mercúrio total no *P. squamosissimus*, espécie carnívora, e padrão de distribuição deste elemento igual para ambas as espécies (figado>rim>músculo). Há tendência para maior atividade enzimática nos tecidos hepático e renal da espécie com maior concentração de mercúrio. Somente a atividade da glutationa peroxidase no rim e da glutationa-S-transferase no fígado do *P. squamosissimus* foi inferior, fato que pode ser explicado pela interação do mercúrio com essas enzimas, interferindo em sua conformação e função. Os dados obtidos por MS possibilitaram a identificação dos *spots* proteicos associados ao mercúrio, revelando proteínas envolvidas no metabolismo energético (gliceraldeído-3-fosfato, malato e L-lactato desidrogenase, enolase, creatina quinase e fosfoglicerato mutase), transporte (hemoglobinas α e β, proteínas de ligação a ácidos graxos e GTPases), síntese e

degradação de proteínas (ubiquitina e ribossomal S27a e ribosomal 40S S24) diferenciação celular (nucleosídeo difosfato quinase), regulação gênica (pterina-4- α -carbinolamina desidratase e histona H4), defesa imunitária (fator de aprimoramento de células *natural killer*), metabolismo do cálcio (parvalbumina β), adipogênese (UPF0366), metabolismo de xenobióticos e esteroidogênese (citocromo P450scc) e sistema antioxidante (glutationa peroxidase, glutationa-S-transferase, superóxido dismutase, catalase e aldeído desidrogenase). Contribuindo assim para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à toxicidade ao mercúrio e fornecendo novas perspectivas sobre possíveis candidatos a biomarcadores de monitoramento ambiental.

Palavras-chave: Espécies mercuriais, estresse oxidativo, 2D PAGE, LC-MS/MS, GFAAS.

STUDY OF MERCURY BIOMARKERS IN AMAZONIAN FISH THROUGH OF METALLOOMIC AND OXIDATIVE STRESS ANALYSIS

ABSTRACT

Mercury is a toxic metal, of ubiquitous distribution, with capacity for bioaccumulation and biomagnification, that causes changes in important biomolecules in the metabolism and contributes to the establishment of oxidative stress in aquatic organisms. Therefore, the present study aimed to identify and evaluate possible proteic and/or enzymatic biomarkers of the mercury toxicity in fish from the Amazon region, through a metalloproteomic study and evaluation of oxidative stress. Were used protein fractionation and identification methodologies by two-dimensional electrophoresis (2D PAGE) associated with mass spectrometry (MS), mapping of mercury in protein spots by atomic absorption spectrometry in graphite furnace (GFAAS) and evaluation of oxidative stress markers. The species used were *Plagioscion squamosissimus* (corvina) and *Colossoma macropomum* (tambaqui), collected in the area of the Jirau Hydroelectric Power Plant (Madeira-RO), which were selected due to the population abundance, interest for fishing and different position in the food chain (carnivorous and omnivorous, respectively). The tissues sampled were hepatic, renal and muscular. The results showed higher concentration of total mercury in *P. squamosissimus*, carnivorous species, and distribution pattern of this element equal to both species (liver> kidney> muscle). There is a tendency for greater enzymatic activity in the hepatic and renal tissues of the specie with the highest concentration of mercury. Only the activity of glutathione peroxidase in the kidney and glutathione-S-transferase in the liver of *P. squamosissimus* was lower, a fact that can be explained by the interaction of mercury with these enzymes, interfering in their conformation and function. The data obtained by MS allowed the identification of the protein spots associated with mercury, revealing proteins involved in energy metabolism (glyceraldehyde-3-phosphate, malate and L-lactate dehydrogenase, enolase, creatine kinase and phosphoglycerate mutase), transport (α and β hemoglobins, fatty acid binding proteins and GTPases), synthesis and degradation of proteins (ubiquitin and ribosomal S27a and ribosomal 40S S24), cell differentiation (nucleoside diphosphate kinase), gene regulation (pterin-4- α -

carbinolamine dehydratase and histone H4), immune defense (natural killer cell enhancement factor), calcium metabolism (β -parvalbumin), adipogenesis (UPF0366), xenobiotic metabolism and steroidogenesis (cytochrome P450scc) and antioxidant system (Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, superoxide dismutase, catalase and aldehyde dehydrogenase). Thus contributing to the understanding of the molecular mechanisms underlying mercury toxicity and providing new perspectives on potential candidates for environmental monitoring biomarkers.

Keywords: Mercury species, oxidative stress, 2D PAGE, LC-MS/MS, GFAAS.

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As emissões de mercúrio para o ambiente são de preocupação global, devido à distribuição ubíqua deste metal e de sua alta toxicidade para seres humanos e ecossistemas. Dada à relevância do impacto deste elemento no ecossistema aquático brasileiro, e pela possibilidade de ter sua disponibilidade aumentada em função de ações antropogênicas, é importante que se conheça e entenda os efeitos e caminhos desse elemento no organismo de peixes. Diversos trabalhos desenvolvidos nas últimas décadas destacam as altas concentrações de mercúrio determinadas nos peixes amazônicos (Pfeiffer *et al.*, 1993; Malm *et al.*, 1995; Guimarães *et al.*, 1999; Amorim *et al.*, 2000; Lechler *et al.*, 2000; Roulet *et al.*, 2000; Fadini e Jardim, 2001; Bastos e Lacerda, 2004; Bastos *et al.*, 2006). De uma forma geral, todas essas pesquisas apontam para a bioacumulação e biomagnificação do mercúrio, atingindo altas concentrações em níveis tróficos mais elevados, ou seja, apresentando-se em maior concentração em espécies predadoras.

Uma das formas de mercúrio disponíveis no ambiente e que mais preocupa em termos de toxicidade é o mercúrio na forma orgânica (metilmercúrio e dimetilmercúrio), que tem elevada taxa de captação e baixas taxas de eliminação. Ou seja, com o passar do tempo as concentrações de mercúrio aumentam e os organismos que apresentam maior longevidade apresentarão maiores concentrações deste metal. Outro aspecto a ser considerado é que conforme subimos os níveis na cadeia trófica, a concentração de mercúrio aumenta e também a taxa de conversão em metilmercúrio. Um peixe carnívoro adulto pode apresentar mais de 90% do mercúrio na forma metilada, enquanto que esse valor nas águas dos rios não ultrapassa os 2% (Amorim *et al.*, 2000; Maurice-Bourgoin *et al.*, 2000).

A toxicidade no organismo é dependente de uma série de variáveis, e a mera mensuração da concentração do mercúrio no ambiente e no organismo, não é suficiente para inferir tal situação. Muitas vezes os efeitos deletérios sobre populações são difíceis de detectar em organismos *in situ*, e quando estes se apresentam de forma clara, o processo destrutivo pode estar além do alcance de ações corretivas (Vander Oos *et al.*, 2003). Logo, deve existir uma conexão entre os níveis externos e internos de exposição, a bioacumulação órgão-específica e os efeitos subletais e de nível molecular.

No Brasil, a maior parte dos estudos de contaminação por mercúrio em ambientes de água doce, particularmente na região amazônica, se concentra na quantificação do metal na água, sedimentos e/ou em tecidos de peixes, principalmente os destinados a consumo humano (Pfeiffer *et al.*, 1991; Malm *et al.*, 1995; Malm, 1998; Maurice-Bourgoin *et al.*, 2000; Lechler *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2006; Lacerda e Malm, 2008; Sampaio da Silva *et al.*, 2009; Bastos *et al.*, 2015; Azevedo-Silva *et al.*, 2016). Em peixes em seu ambiente natural, os efeitos do mercúrio sobre os biomarcadores de estresse oxidativo ainda não estão totalmente esclarecidos, havendo poucos dados disponíveis na literatura.

O processo de bioacumulação do mercúrio pelos peixes pode desencadear no organismo desses animais processos de estabelecimento do estresse oxidativo, devido a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio, que possuem diferente poder de difusão e reatividade (Farina *et al.*, 2009). Além disso, pode atuar como espécie reativa por si mesmo, pois possui alta afinidade com os grupos tiol (R-SH) e/ou com os grupos selenol (R-SeH) (Schurz *et al.*, 2000) de proteínas e enzimas, podendo prejudicar a função destas (Farina *et al.*, 2009). Os radicais livres produzidos provocam diversas injúrias ao organismo, pois podem reagir com proteínas, lipídeos, ácidos nucléicos e outras biomoléculas. A livre difusão destas espécies pode levar a reações danosas como a oxidação de proteínas e a lipoperoxidação, ocasionando danos a estrutura de membranas biológicas e lesões oxidativas ao DNA (Bray, 2000; Barreiros *et al.*, 2006; Monserrat *et al.*, 2007; Lemos *et al.*, 2010).

Considerando o exposto, a análise da atividade de algumas enzimas do sistema antioxidante, associada a identificação de biomarcadores, permitirá melhor controle ambiental em programas de monitoramento, podendo ajudar a nortear ações preventivas contra impactos ambientais. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas estratégias de estudo utilizando ferramentas metaloproteômicas poderá contribuir significativamente na identificação e caracterização de proteínas biomarcadoras associadas ao mercúrio, e consequentemente, na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas que se conjugam com o mercúrio nos organismos vivos e quais os mecanismos de adaptação apresentados por estes animais frente à exposição ao metal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Região Amazônica e a Problemática do Mercúrio

A região amazônica, em sua maior parte localizada no território brasileiro, é alvo de interesse universal em função de sua riqueza em biodiversidade e importância ambiental. A maior bacia hidrográfica do mundo encontra-se nesta região, tendo como principal corpo d'água o rio Amazonas, que tem como principal afluente o rio Madeira.

O rio Madeira banha os estados de Rondônia e do Amazonas e é considerado rico em sedimentos e matéria dissolvida, com altas cargas de sólidos em suspensão (Sioli, 1968; Bastos *et al.*, 2006, Vauchel *et al.*, 2017). Sendo atualmente palco da instalação do complexo hidrelétrico do rio Madeira, que é composto por duas grandes usinas hidrelétricas (UHE), a UHE de Jirau e a de Santo Antônio, que estão em fase de finalização e em operação, respectivamente, na região de Porto Velho-RO.

Toda essa região amazônica passou por uma intensa corrida do ouro entre os anos de 1980 e 1990, que despertou grande preocupação em relação a contaminação da água e solo locais com grandes quantidades de mercúrio. Durante o processo de mineração, executado em sua maioria com dragas mecânicas que removem os sedimentos do fundo do rio, as partículas concentradas são amalgamadas com mercúrio, que forma um complexo mercúrio-ouro. Este complexo formado passa por um processo de queima, onde vapor de mercúrio é liberado para a atmosfera (Pfeiffer e Lacerda, 1988; Malm *et al.*, 1990). Acredita-se que durante o auge da extração de ouro (década de 1980), a região do rio Madeira, tenha recebido aproximadamente 100 toneladas de mercúrio (Pfeiffer *et al.*, 1991).

Conjuntamente ao problema da mineração, alguns estudos tem apontado também para concentrações elevadas de mercúrio em horizontes minerais superficiais de latossolos de florestas remotas da Amazônia, que seriam de origem natural e não antropogênica (Roulet e Lucotte, 1995). E que o maior aporte deste elemento para os corpos d'água estaria relacionado principalmente a processos de erosão do solo, promovida pelo desmatamento e práticas agrícolas, que constituem uma grande perturbação do ciclo natural do mercúrio (Roulet *et al.*, 1999).

Maurice-Bourgoin *et al.* (2000), apontam como sendo duas as principais fontes de mercúrio no caso do rio Madeira: os aportes atmosféricos de baixo nível, a longo prazo, a partir de processos naturais (como vulcanismo, ainda ativo na cordilheira real, na Bolívia), e as entradas de emissão antrópica durante as atividades de mineração do ouro.

Outro fator que tem despertado preocupação recentemente, quanto a disponibilidade do mercúrio para a biota aquática, é a construção das usinas hidrelétricas no rio Madeira. A princípio o revolvimento dos sedimentos, a desaceleração do fluxo de água, a geração de ambientes anóxicos, e outros fatores associados a construção desses empreendimentos, poderiam modificar o ciclo do mercúrio, contribuindo para remobilização e transformação das espécies mercuriais (Fearnside, 2014). Processos de metilação, com transformação da forma inorgânica pra forma orgânica, o metilmercúrio (MeHg), poderiam ser favorecidos.

2.2. A Especiação do Mercúrio e sua Presença no Ambiente

A toxicidade do mercúrio depende muito de sua especiação, ou seja, de sua forma química. E quando presente em um ambiente aquático, outros fatores são importantes, como o pH da água e a quantidade de matéria orgânica suspensa e dissolvida, que podem favorecer interações, como complexação e adsorção, interferindo na biodisponibilidade dos íons metálicos (Baird e Cann, 2011).

Enquanto a forma líquida do mercúrio tem pouca toxicidade, sendo excretado em sua maioria quando ingerido, o vapor de mercúrio, que consiste em átomos livres e neutros, é altamente tóxico. Quando inalados, esses átomos se difundem facilmente dos pulmões para a corrente sanguínea, e como são eletricamente neutros, atravessam prontamente a barreira sangue-cérebro. O resultado é uma série de danos ao sistema nervoso central, que se manifesta principalmente com sintomas relacionados a dificuldades de coordenação, visão e senso tátil (Ercal *et al.*, 2001).

Uma das peculiaridades do mercúrio vaporizado, que o torna preocupação global, é que quando presente no ar, o mercúrio elementar está principalmente no estado de vapor (gasoso), com uma pequena fração ligada às partículas atmosféricas, e esse vapor gasoso atmosférico pode viajar por longas distâncias antes de ser oxidado e

devolvido aos solos e corpos aquáticos pela chuva, precipitando normalmente longe dos locais onde foi emitido originalmente, podendo se distribuir por todo o planeta (Fitzgerald, 1995).

O mercúrio na forma iônica (Hg^{2+}) é o mais encontrado no ambiente e em águas naturais, geralmente está associado ao particulado em suspensão ou eventualmente depositado em sedimentos. Este íon pode formar um composto covalente com o ânion metila (CH_3^-), formando o dimetilmercúrio ($\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$). Esse processo de formação, conhecido como metilação, ocorre no sedimento de rios e lagos, especialmente em condições anaeróbicas, quando bactérias anaeróbicas e microrganismos convertem o Hg^{2+} em $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$. A metilcobalamina é o agente ativo responsável por este processo, ela é derivada da vitamina B₁₂ com um ânion CH_3^- ligado ao cobalto, e é um constituinte comum neste tipo de microrganismos (Clarkson e Magos, 2006; Baird e Cann, 2011).

Ainda, pelos mesmos caminhos de formação do dimetilmercúrio, são formados compostos, menos voláteis, misturados de CH_3HgCl e CH_3HgOH , coletivamente chamados de metilmercúrio (ou monometilmercúrio), e consistem em moléculas covalentes, frequentemente escritas como CH_3HgX . Já o íon metilmercúrio (CH_3Hg^+) existe somente em compostos com ânions como nitrato ou sulfato. A produção dos compostos de metilmercúrio (MeHg) é predominante sobre a do dimetilmmercúrio em águas ácidas ou neutras. A metilação do mercúrio pelas bactérias sulfato-redutoras é estimulada pelo íon sulfato (SO_4^{2-}), já a presença do íon sulfeto promove a formação de complexos de sulfeto de mercúrio, que não levam a metilação (Baird e Cann, 2011).

A metilação do mercúrio inorgânico ocorre na região anaeróbica dos corpos d'água, favorecida por sedimentos ricos em matéria orgânica. Este processo de organificação acelera a bioacumulação e biomagnificação deste metal na cadeia trófica e aumenta seus efeitos tóxicos na biota aquática e, consequentemente, à saúde humana por consumo de peixes contaminados (Porcella, 1994). O metilmercúrio têm maior potencial tóxico que os sais de Hg^{2+} , pois é lipossolúvel e altamente móvel, sendo prontamente transportado para as membranas biológicas (Malm, 1998). O composto CH_3HgX , no organismo, converte o X em um aminoácido sulfurado (Baird e Cann, 2011), interferindo no metabolismo de uma série de biomoléculas.

Pelo processo de bioacumulação os organismos vão aumentando sua concentração de metilmercúrio com o passar do tempo, já que a taxa de eliminação deste elemento é baixa. Já no processo de biomagnificação, os organismos da base da cadeia alimentar têm concentrações maiores que as do ambiente, e assim sucessivamente até os peixes carnívoros que apresentam concentrações maiores que os da base, e de até um milhão de vezes maiores que as do ambiente onde habitam (Guimarães e Forti, 1999). Pela facilidade de ligação do metilmercúrio com os grupos sulfidrílicos das proteínas, este composto acaba se distribuindo por todo o peixe, podendo alcançar 90% do mercúrio total bioacumulado (Nevado *et al.*, 2010), tornando o pescado um potencial risco à saúde humana, como uma das principais fontes de exposição.

2.3. Toxicocinética e Toxicodinâmica do Mercúrio

Como visto acima, o mercúrio está distribuído na água de acordo com suas propriedades físico-químicas, e sofre influência de diversos parâmetros ambientais, como o conteúdo de matéria orgânica dissolvida, sedimentos, pH, oxigênio dissolvido, entre outros. Sua toxicidade vai depender da absorção, distribuição, metabolismo e excreção, variáveis que coletivamente recebem o nome de toxicocinética (Kennedy, 2011).

De maneira geral, os metais se acumulam nos tecidos de animais aquáticos e tornam-se tóxicos quando as concentrações atingem limiares de toxicidade. Essas concentrações tóxicas dependem do tipo de metal, de sua especiação, da espécie de organismo contaminado e de seu estádio de desenvolvimento. Os metais são absorvidos pelos peixes principalmente através das brânquias, do sistema digestivo, e de forma menos significativa, pelo tegumento (pele e seus anexos) (Cajaraville *et al.*, 2003). Quanto ao metilmercúrio, cerca de 95% deste composto, quando ingerido pelo peixe é absorvido no trato gastrointestinal e se distribui por todos os tecidos, em um processo que dura aproximadamente 30 horas (Clarkson, 2002).

O fígado, tem papel fundamental na toxicocinética dos xenobióticos, ele revela informações sobre o estado fisiológico do peixe, e atua como órgão central na acumulação e desintoxicação de contaminantes (Caballero *et al.*, 1999). Entre as

funções essenciais realizadas por este órgão, podemos citar a regulação do metabolismo, a síntese de proteínas plasmáticas, o armazenamento de energia e de algumas vitaminas e metais essenciais, além da biotransformação e excreção de esteróides e xenobióticos (Hylland *et al.* 2003). Entremeados entre os hepatócitos, no tecido hepático, encontra-se uma série de ductos, sinusóides, capilares e veias, que possibilitam as trocas com o sistema circulatório. O oxigênio é recebido pela artéria hepática e todo fluxo de sangue a partir do estômago, intestino e ceco pilórico, contendo metabólitos e nutrientes, é recebido através da veia porta hepática, antes que este entre na circulação sistêmica geral (Rust, 2002).

O MeHg no organismo passa por ciclos entero-hepáticos extensivos, ou seja, é excretado na vesícula biliar e parcialmente reabsorvido na circulação portal, retornando ao fígado. Uma fração do mercúrio biliar é convertida pela microflora intestinal em mercúrio inorgânico, que é reabsorvido em pequena quantidade, sendo a maior parte eliminada do corpo por desmetilação e excreção nas fezes (Clarkson, 2002; Kennedy, 2011). Presume-se que o MeHg seja bombeado para fora das células de mamíferos como um complexo com a GSH (tripeptídeo glutationa, γ -glutamil-cisteinil-glicina). Ele é excretado na bile como um complexo de glutationa, esta porção glutationa é então degradada no ducto e vesícula biliar para um dipeptídeo e finalmente para um complexo L-cisteína (Kerper *et al.*, 1992). Nesta forma, ele é reabsorvido na corrente sanguínea para ser devolvido ao fígado, completando assim o ciclo entero-hepático (Ballatori e Clarkson, 1985; Dutczak e Ballatori, 1994).

Juntamente com o fígado, o rim desempenha função importante tanto no acúmulo como no metabolismo da maioria dos agentes tóxicos. O mercúrio inorgânico parece ter uma tendência a se acumular preferencialmente no rim enquanto o MeHg parece acumular-se especialmente do fígado (Berntssen *et al.*, 2003). Em peixes teleósteos o rim está localizado na região dorsal, junto a coluna vertebral (figura 1). É dividido de forma simplificada em duas porções, uma anterior, chamada de rim cefálico, e uma posterior. Predominantemente a função do rim é a excreção, que inclui vários processos fisiológicos, como a eliminação de resíduos nitrogenados, a regulação iônica e osmótica, o equilíbrio ácido-base e o controle do volume de fluido extracelular (McMillan, 2011; Perry, 2011). Em peixes de água doce, age na excreção do excesso de água e reabsorção dos solutos filtrados, evitando a perda de eletrólitos (Katoh *et al.*,

2008). O rim cefálico tem importante envolvimento com o sistema imune e a hematopoiese (Bone e Moore, 2008). Em experimentos laboratoriais foram constatadas áreas de necrose na região do rim cefálico de peixes alimentados com MeHg (Mela *et al.*, 2007), o que pode sugerir interferência desse metal nos mecanismos de imunidade dos peixes.

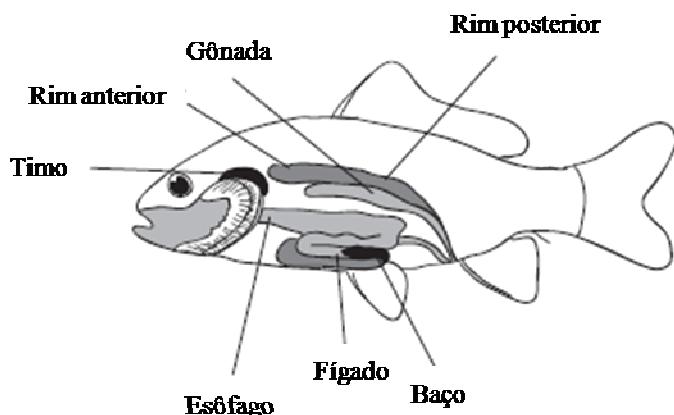


Figura 1. Anatomia simplificada de um peixe teleósteo (Adaptado de Bone e Moore, 2008).

A proporção de tóxicos acumulados entre diferentes tecidos do peixe depende em grande parte de processos dinâmicos entre a captação, armazenamento e eliminação. Após a exposição de curto prazo, as brânquias ou o trato digestivo e o fígado geralmente apresentam carga mais elevada de tóxicos, enquanto que as concentrações nos rins e músculos aumentam mais lentamente após um intervalo de tempo (Chovanec *et al.* 2003). A distribuição do mercúrio entre tecidos de peixes segue um padrão mais ou menos estabelecido, com as concentrações mais elevadas no fígado ou rim, seguido pelo músculo, cérebro e gônadas (Thompson, 1990; Adams *et al.*, 2010).

O músculo do peixe parece estarativamente envolvido somente na acumulação do MeHg, em preterimento a outros metais tóxicos, devido em grande parte a alta afinidade apresentada por este elemento com as proteínas que contém aminoácidos sulfurado (Uysal *et al.*, 2008). Uma vez que esta é normalmente a parte destinada ao consumo humano, muitos estudos relatam apenas os níveis de metais no tecido muscular, especialmente em peixes de regiões contaminadas (Porvari, 1995; Durrieu *et*

al., 2005; Kehrig *et al.*, 2008), a fim de avaliar se os níveis aceitáveis para a saúde humana não são excedidos.

De maneira geral, os músculos dos peixes são categorizados em dois grupos distintos de fibras musculares, que podem ser facilmente distinguidas visualmente, como um conjunto de fibras vermelhas e outro de fibras brancas, que tem função de movimentação lenta e rápida, respectivamente (Bone e Moore, 2008). O músculo vermelho diverge do branco por possuir muitos vasos capilares e elevadas concentrações de hemoglobinas e mioglobinas (armazenam oxigênio) (Freadman, 2006). E, em virtude da presença dessas teias capilares e dessas proteínas, presume-se que ele poderia estar mais exposto ao mercúrio (Khoshnamvand *et al.*, 2013, Bosch *et al.*, 2016, Vieira *et al.*, 2017).

Geralmente, em humanos, a eliminação do mercúrio do organismo varia de acordo com a forma química, o mercúrio metálico é através da urina, das fezes e do ar expirado, enquanto que o mercúrio inorgânico é eliminado na urina e nas fezes, já a forma orgânica é eliminada nas fezes, embora o metilmercúrio em sua maior parte sofra reciclagem entero-hepática (Clarkson, 2002).

Já no que diz respeito a toxicodinâmica, que está relacionada aos mecanismos de interação entre os agentes tóxicos e as biomoléculas (interação metal-receptor) (Kennedy, 2011), e os possíveis desequilíbrios homeostáticos produzidos, a característica que se destaca em relação o mercúrio é a sua capacidade de ligação à proteínas não específicas. O mercúrio liga-se particularmente a grupos sulfidrila (-SH) (Schurz *et al.*, 2000), que são grupos funcionais comuns em muitas proteínas, e esta ligação pode levar a degradação da função destas, razão pela qual a exposição ao metal pode resultar em efeitos múltiplos e variados em muitos sistemas.

De forma resumida, em peixes, o mercúrio pode causar efeitos que incluem a perda de apetite, lesões cerebrais, cataratas, dificuldades de coordenação e alterações comportamentais em concentrações abaixo de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Kennedy, 2011). Ele parece provocar alterações na regulação osmótica e iônica de peixes (Stagg *et al.* 1992). E outros efeitos subletais relatados são os prejuízos ao crescimento, reprodução e desenvolvimento (Sfakianakis *et al.*, 2015). Os efeitos reprodutivos estão geralmente relacionados com níveis suprimidos de esteróides sexuais plasmáticos, inibição do

desenvolvimento gonadal, alteração no comportamento reprodutivo, redução na produção de ovos e desova (Kennedy, 2011).

2.4. Biomarcadores de Toxicidade

Os biomarcadores são alterações mensuráveis ao nível molecular, celular ou sistêmico, utilizadas para indicar a exposição ou efeito de alguma substância ou composto sobre o organismo, ou ainda, são as alterações biológicas ocasionadas pela presença de um determinado contaminante no ambiente (Walker *et al.*, 1996). São de grande valor no monitoramento ambiental, pois geralmente dão indicações precoces de alterações ambientais, permitindo a tomada de decisões para remediação antes da ocorrência de danos irreversíveis no ecossistema.

Uma vez que os efeitos do mercúrio, não estão relacionados com sua concentração no ambiente, mas na quantidade deste composto que consegue permear os tecidos, causando efeitos tóxicos específicos, mesmo que a níveis subletais (Indulski e Lutz, 1997), este tipo de ferramenta que reflete o status saudável ou não dos organismos, mesmo nos níveis baixos de organização biológica, apresentando resposta rápida ao estressor químico, são de grande relevância nos estudos ecotoxicológicos (Arias *et al.*, 2007).

A exposição constante e por tempo prolongado a substâncias tóxicas presentes no ambiente aquático, como no caso do mercúrio, que possui o agravante de ser bioacumulado, acabam provocando uma sequência de respostas que podem ser, desde a nível molecular em um organismo, até a evolução para problemas mais graves refletidos em populações e até mesmo ecossistemas (figura 2) (Jesus e Carvalho, 2008). Logo, quanto mais cedo as alterações ou disfunções são detectadas, mais rápida é a resposta de remediação, e melhores são as chances de conter a propagação dos danos.

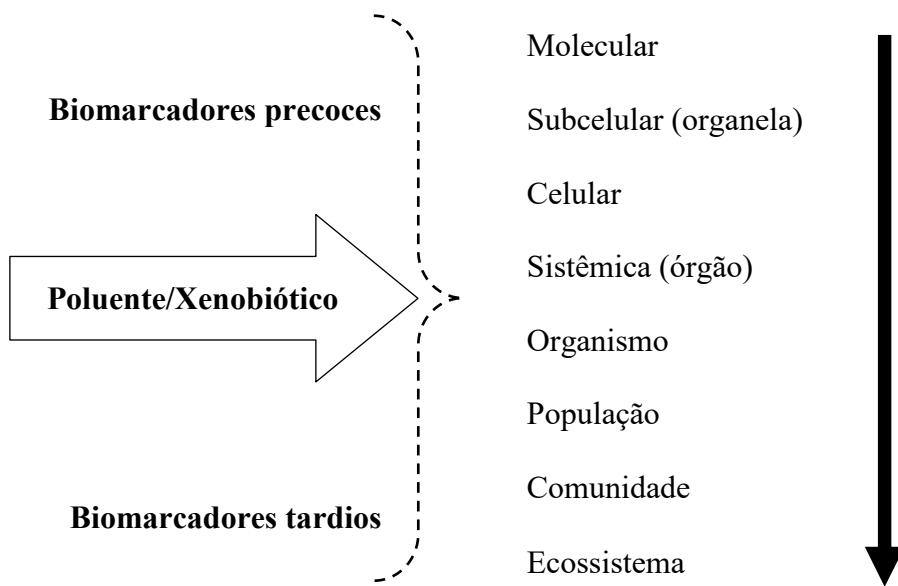


Figura 2. Representação da ordem de respostas a poluentes dentro de um sistema biológico e local de atuação dos biomarcadores (adaptado de Jesus e Carvalho, 2008).

As características mais importantes dos biomarcadores estão relacionadas a possibilidade de se entender as interações entre os contaminantes e os organismos de um determinado ambiente; e a de mensurar possíveis efeitos subletais, o que permite a tomada de decisões remediadoras ou preventivas (Arias *et al.*, 2007). Eles podem ser moleculares, celulares, sistêmicos e ao nível de indivíduo, podendo ser classificados ainda como de exposição, efeito ou suscetibilidade.

Os biomarcadores de exposição são sensíveis e específicos em relação ao agente tóxico, e tratam-se de alterações biológicas mensuráveis que evidenciam a exposição (Lech e Vodicnik, 1985). Entre os indicadores que tem sido normalmente estudados em peixes de ambientes contaminados, estão as enzimas presentes no fígado, envolvidas na destoxificação de xenobióticos e seus metabólitos, bem como, as enzimas de biotransformação de fase I e fase II e demais cofatores (Stien *et al.*, 1998; Delfino-Vieira *et al.*, 2016; Delfino-Vieira *et al.*, 2017).

Já os biomarcadores de efeito, de maneira geral, não são específicos em relação aos estressores, mas ocorrem na presença deste e poderão ser revertidos tão logo o estressor seja retirado do ambiente. Podem ser caracterizados como uma resposta adaptativa em nível molecular, com indução do sistema de defesa celular (Jesus e Carvalho, 2008). Nesta classificação podem ser encaixadas as respostas do sistema

antioxidante, como o aumento da atividade das enzimas CAT, SOD e GPX, por exemplo, frente ao estabelecimento do estresse oxidativo mediado pela presença do estressor químico.

E por fim, os biomarcadores de suscetibilidade são definidos como indicadores de processos que causam variações de repostas, entre exposição e efeito, ao longo do tempo (Barrett *et al.* 1997), determinando condições como: estado de saúde do indivíduo, compensações do metabolismo, disfunções, alterações morfológicas e morte (Jesus e Carvalho, 2008).

2.5. Peixes como Indicadores da Saúde Ambiental

As principais vantagens da utilização de peixes como indicadores na avaliação de vários efeitos de contaminantes aquáticos incluem a capacidade destes organismos de metabolizar, concentrar e acumular diversas substâncias tóxicas (Mieiro *et al.*, 2011). Embora, ainda existam várias lacunas na integração dos dados de acumulação e toxicidade de várias substâncias tóxicas, algumas pesquisas de campo, com peixes *in situ*, têm demonstrado alguns dos efeitos negativos da presença do mercúrio no organismo destes animais. Dentre estes podemos citar: alterações reprodutivas (Drevnick e Sandheinrich, 2003), alterações histopatológica (Adams *et al.*, 2010), genotoxicidade (Guilherme *et al.*, 2008) e estabelecimento do estresse oxidativo por desequilíbrio no sistema antioxidante (Larose *et al.*, 2008; Mieiro *et al.*, 2010).

Nesta pesquisa, escolhemos trabalhar com duas espécies de peixes de grande abundância populacional do rio Madeira, de importância na dinâmica do ecossistema, de posição diferenciada na cadeia trófica aquática, e que tivessem relativa importância pesqueira e inserção nos hábitos alimentares da população local. Estas espécies foram o *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) e o *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818).

O *Plagioscion squamosissimus* é popularmente conhecido como corvina, pescada ou pescada-branca, pertence a família Sciaenidae que está distribuída em ambientes marinhos e de água doce (Santos *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2008). São peixes de médio a grande porte (até 50 cm de comprimento), caracterizados por apresentar coloração prateada, e a presença na base da nadadeira peitoral de uma mancha escura,

cauda em formato de seta e linha lateral continua e aparente (do opérculo a nadadeira caudal) (figura 3) (Ferreira *et al.*, 1998).

As corvinas tem hábitos noturnos, bentopelágicos (se movimentam na coluna d'água próximo ao fundo) e sedentários. O sedentarismo desta espécie é uma característica favorável ao estudo de contaminações aquáticas, pois reflete as condições dos locais onde foram capturados (Santos *et al.*, 2006). Tem preferência por lagos e poços profundos de canais de rios, logo, pode ter sua abundância favorecida pela instalação de barragens (Mérona *et al.*, 2010).

Em relação a reprodução, a corvina tem desova parcelada, reproduzindo-se por todo ano, mas com o maior pico durante os períodos de enchente. A maturação, na fêmea, acontece quando o peixe atinge aproximadamente 19 cm de comprimento padrão (Nakatani *et al.*, 2001). Na fase adulta, são piscívoros (topo de cadeia), alimentando-se basicamente de peixes e ocasionalmente camarões. As formas jovens se alimentam principalmente de pequenos crustáceos e insetos aquáticos (Santos *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2008).

Embora as estatísticas pesqueiras estejam defasadas (não se produzem estatísticas no Brasil desde 2011), a corvina tem uma importância significativa na comercialização e consumo, principalmente em âmbito regional (região amazônica). Em 2011 representou 5,39% da produção pesqueira continental extrativista do Brasil, o equivalente a 13.150 toneladas de pescado (MPA, 2011).



Figura 3. *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840); nome vulgar: corvina, pescada ou pescada-branca (Santos *et al.*, 2006).

Quanto ao *Colossoma macropomum*, mais conhecido como tambaqui, é uma espécie pertencente a família Characidae e subfamília Serrasalminae. Originalmente faz parte das bacias dos rios Amazonas e Orinoco, no entanto, a piscicultura acabou por dispersá-la por toda a América do Sul (Santos *et al.*, 2006).

É um peixe de grande porte, atingindo de 90 a 100 cm de comprimento e até 30 kg de peso corporal em ambiente natural (Araújo-Lima e Goulding, 1998). É o segundo maior peixe de escamas da Amazônia, perdendo somente para o pirarucu (*Arapaima gigas* - Schinz, 1822). Tem como principais características corporais o formato rombóide, nadadeira adiposa com raios, mandíbula forte e presença de dentes molariformes. Tem variação quanto a forma corporal e padrão de coloração durante a ontogenia, enquanto jovens o corpo é mais alto e vai se alongando com a idade. Os indivíduos adultos tem a coloração variando de mais escura em rios de águas pretas a mais claras em rios de águas claras ou barrentas (figura 4) (Goulding e Carvalho, 1982).

Sua distribuição vertical na coluna d'água é demersal (apesar de ter capacidade natatória ativa, encontra-se a maior parte do tempo associada ao fundo), tem hábitos diurnos e apresenta comportamento migratório no período reprodutivo, que acontece no início da época de cheia. Sua desova é total, e a maturação sexual é atingida entre 55 e 61 cm de comprimento, o que corresponde a aproximadamente 3,5 a 5 anos de idade (Vieira *et al.*, 1999).

A presença de dentes fortes e de rastros branquiais longos são características anatômicas diretamente relacionadas ao hábito alimentar desta espécie, pois na natureza, quando adultos, se alimentam principalmente de frutos, sementes e de zooplâncton como complemento, sendo classificados de forma generalizada como onívoros. As larvas, após atingirem o tamanho de 5 a 7 mm de comprimento, passam a se alimentar de zooplâncton, principalmente cladóceros, rotíferos, copépodos e larvas de insetos (Goulding e Carvalho, 1982).

Geralmente, tem maior atividade alimentar no período de cheia, quando se deslocam para as áreas de floresta inundada nas margens dos rios, onde a disponibilidade de alimentos é mais abundante. Já no período de seca, a atividade alimentar decai, passando a alimentar-se principalmente de zooplâncton e a utilizar as reservas corporais de gordura armazenadas no período de abundância de alimentos. Essa reserva pode chegar de 9 a 10% do peso corporal, e fica localizada principalmente na

região da cavidade abdominal e fígado, e é uma adaptação do organismo à disponibilidade sazonal de alimentos e a para a reprodução (Soares *et al.*, 2008).

O tambaqui tem destaque tanto na pesca como na piscicultura, principalmente na região amazônica, com destacada importância econômica por estar inserida nos hábitos de consumo da população. Teve a captura mensurada em aproximadamente 4.235 tonelada no ano de 2011 no Brasil, a partir da pesca extrativista, perfazendo um total de 1,74% do pescado total daquele ano (MPA, 2011).



Figura 4. Exemplar jovem e adulto de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), respectivamente; nome vulgar: tambaqui (Santos *et al.*, 2006).

2.6. Radicais Livres, Espécies Reativas de Oxigênio, Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo

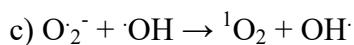
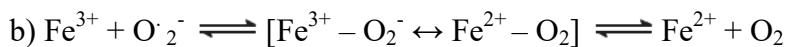
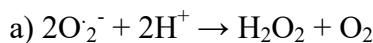
2.6.1. Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio

De maneira simplificada, as moléculas são formadas de átomos que se ligam covalentemente (pares de elétrons são compartilhados entre pares de átomos). E existe um princípio fundamental que rege as ligações covalentes entre dois átomos, que é a de que um átomo é mais estável quando sua camada mais externa de elétrons está preenchida. Quando por alguma razão estas ligações são quebradas, e um átomo ou molécula tem orbitais contendo um elétron não pareado, estes são chamados de radicais livres (Novelli, 2005), e tem o poder de induzir danos oxidativos a outras biomoléculas. Além da quebra das ligações covalentes, estes radicais podem ser formados durante reações de oxiredução, quando um átomo ou molécula recebe apenas um elétron (Karp, 2008).

Já as espécies reativas, são átomos ou moléculas que podem ou não apresentar elétrons desemparelhados, que possuem alta reatividade e atuam como radicais nos processos oxidativos. E os produtos das reações de oxidação desencadeadas por estas espécies reativas também agem como radicais, propagando a reação e estendendo os danos no organismo (Winston, 1991; Rolo *et al.*, 2012).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser formadas no meio intracelular, durante os processos oxidativos envolvendo a produção de energia (cadeia transportadora de elétrons) (Bray, 2000), na biotransformação de xenobióticos (ciclo redox), no metabolismo do citocromo P450, ou ainda, na presença de íons metálicos livres (reações oxidativas) (Regoli *et al.*, 2002). Existem três formas principais de ERO: o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-); que são formados a partir do oxigênio molecular (Bray, 2000).

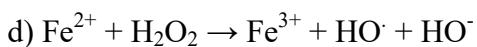
O O_2^- é formado após a redução parcial do O_2 , sendo liberado na mitocôndria pela cadeia transportadora de elétrons (Dröge, 2002). Não é muito reativo, pois não consegue atravessar as membranas, ficando restrito ao compartimento onde foi gerado. A formação desta espécie reativa ocorre espontaneamente nas proximidades da membrana interna da mitocôndria onde se dá a cadeia respiratória. Ele também pode ser produzido dentro da célula por ação catalítica das enzimas lipooxigenase e ciclooxygenase, e por flavoenzimas, como a xantina oxidase (Nordberg e Arnér, 2001), ou pela ativação de macrófagos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos (Dröge, 2002). Tem a capacidade de gerar o H_2O_2 por dismutação em meio aquoso (equação a), o OH^- por redução de quelatos de Fe (equação b) e o oxigênio singlete (1O_2) em reação com o radical OH^- (equação c) (Barreiros *et al.*, 2006).



O H_2O_2 não é um radical livre, no entanto, pode atravessar as membranas e se distribuir em outros locais no organismo, e participa na formação do radical OH^- , uma das ERO mais reativas. Tem a capacidade de oxidar proteínas que apresentam resíduos de cisteína ou grupos tiol muito reativos, como a GSH (glutationa reduzida) por

exemplo (Husain *et al.*, 1987; Halliwell *et al.*, 2000). É gerado pela dismutação do O_2^- ou pela oxidação de ácidos graxos (Barreiros *et al.*, 2006).

O radical OH[·] é o mais danoso ao organismo, pois retira um átomo de hidrogênio das moléculas com que reage (Barth *et al.*, 2007). É produzido na reação de Fenton, a partir da redução do H_2O_2 por íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^+) (equação d) (Fridovich, 1995). Pode reagir na cadeia lateral de proteínas, atacando preferencialmente os aminoácidos metionina, cisteína, triptofano, histidina e fenilalanina; gerando clivagem de ligações, que podem resultar em perda de atividade enzimática, lise e até morte celular (Berger, 1999).



Em condições fisiológicas normais, estas ERO estão envolvidas na produção de energia, em processos de fagocitose, crescimento e sinalização celular, e síntese de biomoléculas. Porém, quando há excessiva formação das ERO e/ou deficiência do sistema antioxidante, o estresse oxidativo se instala e estas espécies passam a ser relacionadas a origem de um várias alterações degenerativas (Dröge, 2002).

A ação das ERO nos ácidos nucléicos pode levar a modificações estruturais do DNA, induzindo a mutações. Em proteínas causam a peroxidação proteica, com a quebra de cadeias polipeptídicas, perda de função de proteínas/enzimas, levando a formação de proteína carbonil e alterações funcionais nas células (Sohal *et al.*, 1994).

Já os componentes lipídicos das membranas celulares sofrem oxidação pelas ERO, conduzindo a uma reação em cadeia chamada de lipoperoxidação, que é comumente dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação (equações e-i). Na fase de iniciação o radical livre retira um átomo de hidrogênio (H) do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular (ou organela), formando um radical lipídico (L[·]); este radical, na primeira equação de propagação (equação f), reage com o O_2 formando um radical peroxila (LOO[·]), que por sua vez retira outro H do ácido graxo poliinsaturado formando mais uma vez L[·] (equação g); este processo autocatalítico segue até que dois radicais livres formados se encontrem e se estabilizem (LOO[·], L[·]) (equações h,i), ou antioxidantes neutralizem estes radicais (Novelli, 2005).



f) $L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot$	Propagação;
g) $LH + LOO\cdot \rightarrow L\cdot + LOOH$	Propagação;
h) $LOO\cdot + L\cdot \rightarrow LOOH$	Terminação;
i) $LOO\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOOL + O_2$	Terminação.

De maneira geral, a lipoperoxidação pode levar a alterações da estrutura e permeabilidade das membranas (Parffit *et al.*, 1994), com perda da seletividade (Baber e Harris, 1994) e formação de produtos citotóxicos (Hershko, 1989).

2.6.2. Antioxidantes Enzimáticos Endógenos

Para se proteger dos danos provocados por estas ERO, o organismo possui estratégias de defesa que incluem diferentes mecanismos de ação, e podem ser resumidos em: 1) evitar a formação das ERO; 2) neutralizar as espécies já formadas; e 3) reparar os danos ocasionados por elas (Barreiros *et al.*, 2006). E as principais substâncias agindo nesta defesa são os antioxidantes, que estão presentes em menores concentrações que as biomoléculas, e tem o poder de prevenir, proteger ou reduzir a destruição oxidativa promovida pelas ERO (Novelli, 2005).

Os antioxidantes dividem-se em dois grandes grupos, um composto por enzimas antioxidantes, e outro não enzimático, que compreendem algumas vitaminas (ácido ascórbico e tocoferol, por exemplo), minerais (como o Se) e compostos endógenos (bilirrubina e o tripeptídeo glutationa - GSH, por exemplo) (Halliwell, *et al.*, 1995; Pietta, 2000; Reischl *et al.*, 2007). Na linha de defesa enzimática, atuam enzimas como a glutationa peroxidase (GPx), a glutationa redutase (GR), a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e, no caso de inativação de xenobióticos, a glutationa-S-transferase (GST), entre outras.

A GPx e a CAT apresentam a mesma função, estas enzimas controlam os níveis de H_2O_2 formados durante as reações de dismutação do radical $O_2\cdot^-$ pela SOD, e dos hidroperóxidos formados na peroxidação lipídica, formando H_2O e O_2 (figura 5) (Yu, 1994). Porém, mesmo realizando a mesma função, sabe-se que a GPx tem maior afinidade pelo H_2O_2 que a CAT (cerca de 10 vezes maior) (Powers *et al.*, 1999), logo, quando as concentrações de H_2O_2 é baixa, a GPx é a maior responsável pela sua eliminação, e a atuação da CAT aumenta quando as concentrações desta ERO

aumentam no interior da célula. A GPx apresenta selênio na sua estrutura e este metal é indispensável para suas reações catalíticas, tem ação principalmente no citosol (Brigelius-Flohé, 1999). Já a CAT é uma hemeproteína citoplasmática encontrada em diversos tecidos (sangue, mucosas, rim e fígado) e necessita da presença de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosforilado reduzido) para sua atividade (Scott *et al.*, 1993).

A GPx e a GR atuam em sinergismo, e precisam de GSH e NADPH para seu funcionamento. A GSH é um tripeptídeo (γ -glutamil-cisteinil-glicina) que contém um grupo sulfidrila presente na cisteína que lhe confere grande capacidade redutora (Meister e Anderson, 1983). Na reação catalisada pela GPx a GSH é a molécula doadora de elétrons, sendo convertida então para a forma oxidada (GSSG), que é um composto não reativo (Ursini e Bindoli, 1987). Os níveis de GSH no organismo são mantidos pela GR que utiliza o NADPH como fonte de elétrons e converte novamente a GSSG a GSH (figura 5) (Barreiros *et al.*, 2006).

A SOD é um grupo de metaloenzimas que atuam na primeira etapa da via antioxidante, destoxicificando radicais superóxido, dismutando-os em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Ryan e Aust, 1992). Existem três formas conhecidas desta enzima (Zelko *et al.*, 2002), a SOD [Cu-Zn], citosólica, a SOD [Mn], mitocondrial (próxima a cadeia respiratória), e a SOD [Fe], encontrada somente em algumas bactérias (Luo, 2001; Connor, 2007; Gallagher *et al.*, 2009). A ação antioxidante se inicia com a redução da SOD formando oxigênio, e a SOD reduzida reage novamente com outro O_2^- resultando no H_2O_2 , que na sequência sofre dismutação pela CAT ou outra peroxidase, dando origem a H_2O e O_2 (figura 5) (Karp, 2008). Atividades mais elevadas de SOD são encontradas geralmente no fígado, baço e rins (Novelli, 2005).

A GST, por sua vez, é uma família de proteínas multifuncionais envolvida em processos de destoxificação celular de compostos xenobióticos. Esta enzima catalisa a conjugação da GSH com espécies químicas tóxicas, como o mercúrio por exemplo, tornando-o menos reativo, mais solúvel em água e consequentemente mais fácil de ser excretado (Carletti *et al.*, 2008; Huber e Almeida, 2008).

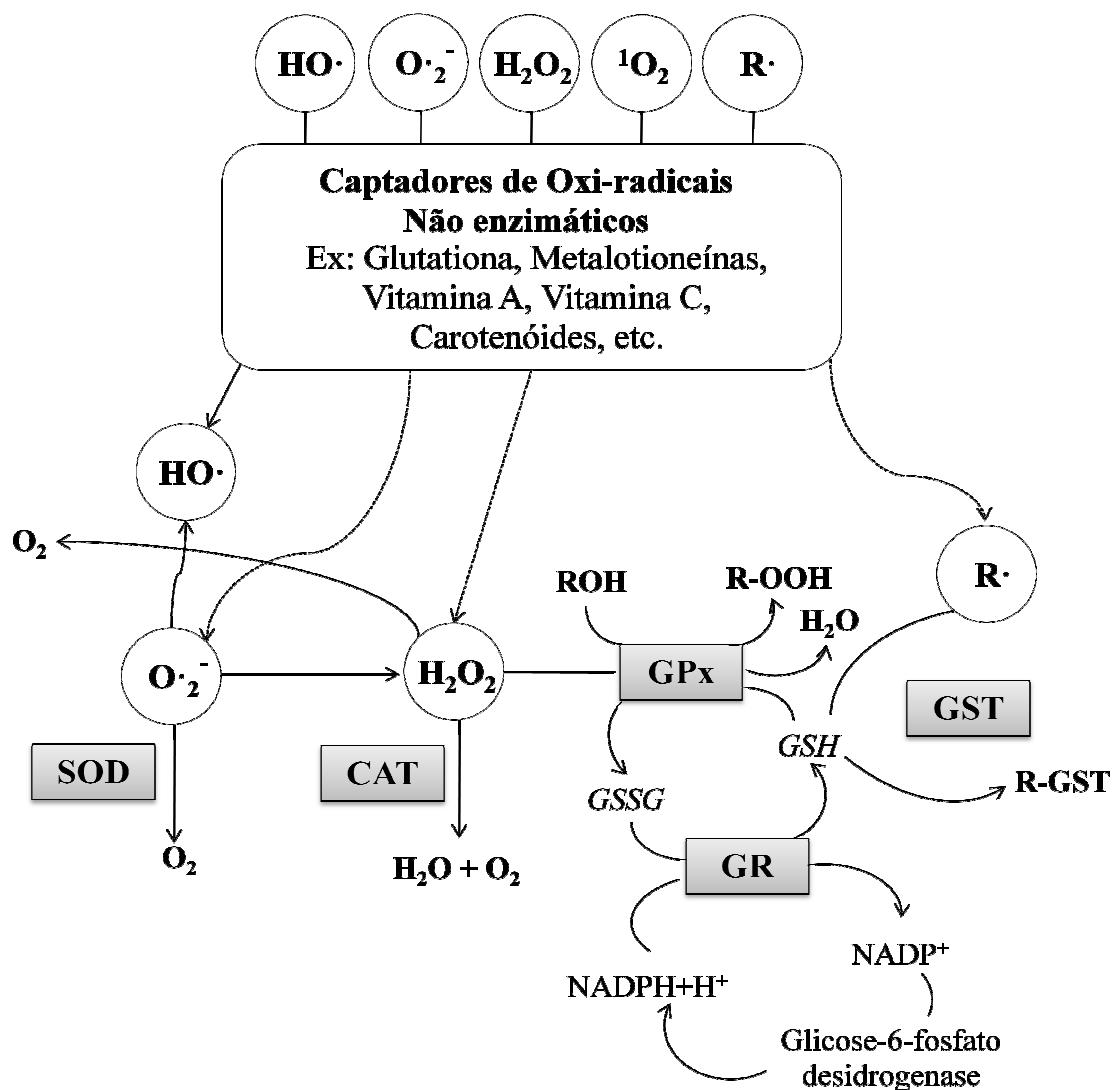


Figura 5. Papel das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa-S-transferase (GST), glutationa redutase (GR) e outros antioxidantes primários na defesa contra as espécies reativas de oxigênio (ERO). GSH = glutationa reduzida, GSSG = glutationa oxidada. Adaptado de Cajaraville *et al.*, 2003.

2.6.3. Contaminação Ambiental e o Estresse Oxidativo

O desbalanço entre a produção de oxidantes e a concentração atuante de antioxidantes no organismo, com prevalência para os oxiradicalis, leva a uma condição chamada de estresse oxidativo (Novelli, 2005). A exposição a agentes xenobióticos lançados no ambiente pode levar a este desbalanço, uma vez que alguns agentes tóxicos podem proporcionar o aumento da atividade de algumas enzimas relacionadas ao sistema de defesa antioxidante do organismo, ou ainda inibir sua ação por desnaturação das mesmas, bem como atuar no aumento da produção das ERO (Cajaraville *et al.*,

2003; Cogo *et al.*, 2009). No entanto, os resultados dos estudos relacionando as atividades destas enzimas e a contaminação ambiental ainda são controversos, não se estabelecendo um padrão quanto ao aumento ou a redução da atividade destas enzimas.

Ambas as espécies de mercúrio, inorgânico e orgânico, podem produzir ERO (como, O_2^- , H_2O_2 e OH^-) (Sarafian, 1999) e induzir a peroxidação lipídica (Farina *et al.*, 2009). E o dano oxidativo inicial provocado pelo MeHg no organismo ocorre através de sua alta reatividade com os grupos tiol (-SH) e/ou com os grupos selenol (-SeH) de proteínas e/ou enzimas, a formação da ligação S-Hg ou Se-Hg, pode prejudicar a função das mesmas (Schurz *et al.*, 2000; Farina *et al.*, 2009).

A GSH é o principal antioxidante endógeno do organismo e o mais abundante tiol celular livre (Dringen, 2000), responsável pelo estado redox normal das células, age como defesa primária nas situações de contaminação por mercúrio (Ou *et al.*, 1999). A GSH forma um conjugado com este metal tóxico por meio de ligações covalentes aos grupos sulfidrila e também a resíduos de cisteína, e aparentemente um íon de mercúrio pode causar a excreção irreversível de duas moléculas de GSH (Franco *et al.*, 2009). Este mecanismo mediado pela GHS para evitar os efeitos deletérios do mercúrio pode levar a depleção dos níveis deste tiol.

Conhecendo esta interação entre o mercúrio e as defesas antioxidantes, enzimas que fazem parte de um grupo de proteínas multifuncionais envolvidas no processo de detoxificação celular de compostos endógenos ou exógenos, tem sido investigadas como biomarcadores de contaminação ambiental em diversos estudos (Bainy *et al.*, 1996; Anandraj *et al.*, 2002; Ventura *et al.*, 2002; Chandran *et al.*, 2005; Nicholson e Lam, 2005; Atli e Canli, 2007; Bocchetti *et al.*, 2008; Zanette *et al.*, 2008; Cogo *et al.*, 2009).

Um exemplo da utilização da atividade enzimática como forma de monitoramento ambiental foi a utilização do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* para avaliar a contaminação com compostos químicos provenientes de operações de drenagem e deposição em área portuária (Bocchetti *et al.*, 2008). A resuspensão de poluentes do sedimento ocasionou aumento na atividade das GST e CAT. Com o cessar dos procedimentos de remobilização de fundo houve redução da atividade destas enzimas à níveis iniciais, apontando redução do estresse em função da precipitação dos contaminantes.

As enzimas, principalmente aquelas envolvidas no sistema antioxidante, podem ter atuação importante no monitoramento da qualidade ambiental como biomarcadoras de estresse oxidativo. Contudo, o mecanismo de defesa de cada organismo frente a exposição a compostos tóxicos, depende tanto da resposta das enzimas frente aos diferentes contaminantes, como da capacidade de cada tecido (Cogo *et al.*, 2009). Logo, estudos precisam ser aprimorados, novas técnicas desenvolvidas e mecanismos esclarecidos.

2.7. Proteômica e Metaloproteômica

A proteômica está relacionada com o estudo das proteínas sintetizadas nas células e tecidos. E as duas principais razões para existência deste ramo de estudo são que, primeiramente, muitos genes não tem função definida, ou seja, não se pode prever a lista completa de proteínas a partir da expressão do gene; e, ainda que as proteínas codificadas pelo RNAm sejam conhecidas e o RNAm tenha sido quantificado, as correlações entre RNAm e concentrações de proteínas são fracas (Hill *et al.*, 2012).

A análise proteômica possui diversos campos de pesquisa, que podem envolver a identificação de proteínas expressas por um organismo numa determinada condição (proteômica descritiva), identificação de alterações de expressão das proteínas associadas com alterações nas condições dos organismos (proteômica comparativa), identificação de grupos funcionais de proteínas, ou grupos de proteínas que operam em mútua interação (proteômica funcional) e identificação de proteínas que formam uma organela (desenvolvimento de um mapa metabólico) (Vispo, 2004).

As proteínas são uma parte do fenótipo das células, logo, a proteômica é um ramo de estudo de fenótipos bioquímicos, e dentro desta área de estudo há outra vertente, mais específica ainda, conhecida como metalômica. Essa linha de pesquisa busca informações sobre as interações e conexões funcionais de espécies metálicas com os genes, proteínas, metabólitos e outras biomoléculas do organismo (Mounicou *et al.*, 2009). Ou seja, procura elucidar o papel biológico dos íons metálicos ligados à essas biomoléculas e sua dinâmica no organismo, podendo ser então uma ferramenta de grande valia nos estudos de toxicologia ambiental envolvendo tanto o mercúrio como outros metais tóxicos.

Como método analítico para o estudo do proteoma, e do metaloproteoma consequentemente, temos a eletroforese, que se refere a migração de proteínas, por meio de corrente elétrica, em um determinado meio. Esta técnica é especialmente interessante, pois permite a separação e visualização destas proteínas, e consequentemente, a análise da heterogeneidade proteica de uma amostra (Peralta, 2003). Pontos isoelétricos e massas moleculares das proteínas também podem ser determinados por esta técnica, além de permitir a seleção específicas de pontos proteicos (*spots*) para posterior identificação (Silva, 2001; Peralta, 2003).

De forma simplificada, as amostras são colocadas sobre um suporte, no qual é aplicado uma corrente elétrica pré-definida, que permite que as moléculas/proteínas se movam pelos poros de um gel de poliacrilamida. O gel é o produto da polimerização conjunta da acrilamida e da N,N metileno-bis acrilamida, que por meio de catalisador fotoquímico ou químico (por ex. riboflavina e persulfato de amônio, respectivamente) formam uma cadeia linear com ligações cruzadas, originando uma espécie de rede onde as proteínas podem migrar. A relação acrilamida/bis-acrilamida é que irão determinar propriedades como a densidade, elasticidade e tamanho dos poros do gel (Peralta, 2003).

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilmida-dodecilsulfato de sódio, também chamada de SDS-PAGE, é um procedimento que separa as proteínas com base nos seus pesos moleculares. O SDS ($[CH_3-(CH_2)_{10}-CH_2-O-SO_3^-]Na^+$) liga-se as porções hidrofóbicas das proteínas, desenovelando-as e permitindo a conformação estendida. Como resultado, o tamanho do complexo proteína-SDS é proporcional ao seu peso molecular (Silva, 2001; Peralta, 2003).

Anteriormente a separação por SDS-PAGE, as amostras proteicas podem passar por um processo de focalização isoelétrica, sendo incorporadas em fitas de gel de poliacrilmida que contem anfólitos de pH imobilizados (moléculas que contém em suas estruturas vários grupos ionizáveis tais como carboxilas e aminas substituídas, cujos valores de pKa cobrem uma ampla faixa de pH). Nessa técnica, as proteínas migram até encontrar um pH que seja correspondente ao seu ponto isoelétrico. Assim, proteínas de diferentes pI distribuem-se de forma diferente ao longo do gel (Berkman e Stenstedt, 1998). Para aliar esta técnica àquela descrita acima, essas fitas contendo as proteínas separadas pelo pI são então incorporadas aos geis de poliacrilmida para

migração vertical das proteínas de acordo com sua massa molecular, resultando então, em um gel de eletroforese bidimensional (2D-PAGE).

3. REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.H.; SONNE, C.; BASU, N.; DIETZ, R.; NAM, D.-H.; LEIFSSON, P.S.; JENSEN, A.L. Mercury contamination in spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*: An assessment of liver, kidney, blood, and nervous system health. **Science of the Total Environment**, v. 23, p. 5808-5816, 2010.
- AMORIM, M.I.M.; MERGLER, D.; BAHIA, M.O.; DUBEAU, H.; MIRANDA, D.; LEBEL, J.; BURBANO, R.R.; LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 72, n. 4, p. 497-507, 2000.
- ANANDRAJ, A.; MARSHALL, D.J.; GREGORY, M.A.; MCCLURG, T.P. Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 132, p. 355-363, 2002.
- ARAÚJO-LIMA, C.A.R.; GOULDING, E.M.. **Os frutos do Tambaqui**: Ecologia, Conservação e cultivo na Amazônia. Tefé: Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, Brasília, DF, Brasil, 1998.
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 61-72, 2007.
- ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 145, p. 282-287, 2007.
- AZEVEDO-SILVA, C.E.; ALMEIDA, R.; CARVALHO, D.P.; OMETTO, J.P.H.B.; CAMARGO, P.B.; DORNELES, P.R.; AZEREDO, A.; BASTOS, W.R.; MALM, O.; TORRES, J.P.M. Mercury biomagnification and the trophic structure of the ichthyofauna from a remote lake in the Brazilian Amazon, **Environmental Research**, v. 151, p. 286-296, 2016.
- BARBER, A.D.; HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **American Pharmacy**, v. 34, p. 26-35, 1994.
- BAINY, A.C.D.; SAITO, E.; CARVALHO, P.S.M.; JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, p. 151-162, 1996.
- BAIRD, C.; CANN, M. Metais, Solos, Sedimentos e Disposição de Resíduos. In: **Química Ambiental**. 4 Ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. p. 683-823.
- BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. Biliary secretion of glutathione and glutathione-metal complexes. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 5, p. 816-831, 1985.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, 113-126, 2006.

BARRETT, J.C.; VAINIO, H.; PEAKALL, D. & GOLDSTEIN, B.D. Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemical: susceptibility to environmental hazards. **Environmental Health Perspective**, v. 105, p. 699-737, 1997.

BARTH, E.; ALBUSZIES, G.; BAUMGART, K.; MATEJOVIC, M.; WACHTER, U.; VOGT, J.; RADERMACHER, P.; CALZIA, E. Glucose metabolism and catecholamines. **Critical Care Medicine**, v.35, p.508-518, 2007.

BASTOS, W.R.; LACERDA, L.D. A contaminação por Mercúrio na bacia do Rio Madeira: Uma breve revisão. **Geochimica Brasiliensis**, v. 18, p. 99-114, 2004.

BASTOS, W.R.; GOMES, J.P.O.; OLIVEIRA, R.C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E.L.; LACERDA, L.D.; SILVEIRA, E.G.; PFEIFFER, W.C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 368, p. 344-351, 2006.

BASTOS, W.R.; DÓREA, J.G.; BERNARDI, J.V.E.; LAUTHARTTE, L.C.; MUSSY, M.H.; LACERDA, L.D.; MALM, O. Mercury in fish of the Madeira river (temporal and spatial assessment), Brazilian Amazon. **Environmental Research**, v. 140, p. 191-197, 2015.

BERGER, P.; KARPEL, N.; LEITNER, V.; DORÉ, M.; LEGUBE, B. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine. **Water Research**, v. 33, p. 433-441, 1999.

BERKLMAN, T.; STENSTEDT, T. **2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods**. Uppsala: Amersham Biosciences, 1998.

BERNTSEN, M.H.G.; AATLAND, A.; HANDY, R.D. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. **Aquatic Toxicology**, v. 65, p. 55-72, 2003.

BOCCHETTI, R.; FATTORINI, D.; PISANELLI, B.; MACCHIA, S.; OLIVIERO, L.; PILATO, F.; PELLEGRINI, D.; REGOLI, F. 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. **Aquatic Toxicology**, v. 89, p. 257-266, 2008.

BONE, Q.; MOORE, R.H. The Immune System. In: **Biology of Fishes**. 3^aEd. New York: Taylor & Francis Group, 2008. p. 386-405.

BOSCH, A.C.; O'NEILL, B.; SIGGE, G.O.; KERWATH, S.E.; HOFFMAN, L.C. Mercury accumulation in Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) with regards to muscle type, muscle position and fish size. **Food Chemistry**, v. 190, p. 351-356, 2016.

BRAY, T.M. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. **Nutrition**, v.16, n.7-8, p.578-581, 2000.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 951-965, 1999.

CABALLERO, M.J.; LÓPEZ-CABALERO, G.; SOCORRO, J.; ROO, F.J.; IZQUIERDO, M.S.; FERNANDEZ, A.J. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 179, p. 277-290, 1999.

CAJARAVILLE, M.P.; HAUSER, L.; CARVALHO, G.; HYLLAND, K.; OLABARRIETA, I.; LAWRENCE, A.J.; LOWE, D.; GOKSØYR, A. Genetic Damage and the Molecular/Cellular Response to Pollution. In: Lawrence, A.J.; Hemingway, K.L. [Ed.] **Effects of pollution on fish: molecular effects and population responses**. Oxford: Blackwell Science Ltda Blackwell Publishing Company, 2003. p. 14-62.

CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BOCCIARELLI, T.; BOCCIO, P.D.; FEDERICI, L.; DI ILIO, C. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v. 90, p. 48-57, 2008.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A.A.; MOHANDASS, S.; ARUCHAMI ,M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and physiology**, Part C, v. 140, p. 422-426, 2005.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: MARKERT, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G. **Bioindicators and biomonitor**s. Oxford: Gulf Professional Publishing, 2003. p. 639-676.

CLARKSON, T.W. The Three Modern Faces of Mercury. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 11-23, 2002.

CLARKSON, T.W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, p. 609-662, 2006.

COGO, A.J.D.; SIQUEIRA, A.F.; RAMOS, A.C.; CRUZ, Z.M.A.; SILVA, A.G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza On Line**, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.

CONNOR, K.M. Manganese superoxide dismutase enhances the invasive and migratory activity of tumor cells. **Cancer Research**, v. 67, n.21, p. 10260-10267, 2007.

DELFINO-VIEIRA, C.E.; COSTA, P.G.; LUNARDELLI, B.; OLEIVEIRA, L.F.; CABRERA, L.C.; RISSO, W.E.; PRIMEL, E.G.; MELETTI, P.C.; FILLMANN, G.;

MARTINEZ, C.B.R. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 542, p. 44-56, 2016.

DELFINO-VIEIRA, C.E.; COSTA, P.G.; CABRERA, L.C.; PRIMEL, E.G.; FILLMANN, G.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C.B.R. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. **Science of The Total Environment**, v. 586, p. 598-609, 2017.

DREVNICK, P.E.; SANDHEINRICH, M.B. Effects of dietary methylmercury on reproductive endocrinology of fathead minnows. **Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 4390-4396, 2003.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p. 649-671, 2000.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, n.1, p.47-95, 2002.

DURRIEU, G.; MAURY-BRACHET, R.; BOUDOU, A. Goldmining and mercury contamination of the piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana (Amazon basin). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 315-323, 2005.

DUTCZAK, W.J.; BALLATORI, N. Transport of the glutathionemethyl mercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 9746-9751, 1994.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 529-539, 2001.

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

FARINA, M.; CAMPOS, F.; VENDRELL, I.; BERENGUER, J.; BARZI, M.; PONS, S.; SUÑOL, C. Probucole increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. **Toxicological sciences**, v. 112, p. 416-426, 2009.

FEARNSIDE, P.M. Impacts of Brazil's Madeira River Dams: Unlearned lessons for hydroelectric development in Amazonia. **Environmental Science & Policy**, v. 38, p. 164-172, 2014.

FERREIRA, E.J.G.; ZUANON, J.A.S.; SANTOS, G.M. **Peixes comerciais do médio Amazonas:** Região de Santarém-PA. Brasília: IBAMA, Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, 211 p., 1998.

FITZGERALD, W.F. Is Mercury Increasing in the Atmosphere? The Need for an Atmospheric Mercury Network (AMNET). **Water Air and Soil Pollution**, v. 80, p. 245-254, 1995.

FRANCO, J.L.; POSSER, T.; DUNKLEY, P.R.; DICKSON, P.W.; MATTOS, J.J.; MARTINS, R.; BAINY, A.C.; MARQUES, M.R.; DAFRE, A.L.; FARINA, M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 449-457, 2009.

FREADMAN, M.A. Role partitioning of swimming musculature of striped Bass *Morone saxatilis* Walbaum and Bluefish, *Pomatomus saltatrix* L. **Journal Fish Biology**, v. 15, p. 417-423, 2006.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, 1995.

GALLAGHER, C.J. et al. Association between haplotypes of manganese superoxide dismutase (SOD2), smoking, and lung cancer risk. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, n. 1, p. 20-24, 2009.

GOULDING, M.; CARVALHO, M.L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 2, p. 107-133, 1982.

GUILHERME, S.; VÁLEGA, M.; PEREIRA, M.; SANTOS, M.; PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 411-421, 2008.

GUIMARÃES, J.R.D.; FORTI, M.C. Mercury in human and environmental samples from two lakes in Amapá, Brazilian Amazon. **Ambio**, v. 28, p. 296-301, 1999.

GUIMARÃES, J.R.D.; FOSTIER, A.H.; FORTI, M.C.; MELFI, A.J.; ARAUJO, I.; COSTA, L.S.; MAURO, J.N. Mercury in human and environmental samples from two lakes in Amapá, Brazilian Amazon: Natural background and anthropogenic contamination. **Ambio**, v. 28, p. 296-301, 1999.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 601-617 , 1995.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M.V.; LONG, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters**, v. 486, p. 10-13, 2000.

HERSHKO ,C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v. 26, p. 277-285, 1989.

HILL, R.W.; WYSE, G.A.; ANDERSON, M. Genômica, Proteômica e Abordagens Fisiológicas Afins. In: **Fisiologia Animal**. 2^a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 68-77.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutationa e enzimas relacionas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

HUSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, 2489-2491, 1987.

HYLLAND, K.; FEIST, S.; THAIN, J.; FÖRLIN, L. Molecular/Cellular Processes and the Health of the Individual. In: **Effects of Pollution on Fish: Molecular Effects and Population Responses**. LAWRENCE, A.J.; HEMINGWAY, K.L. [Ed.]. Oxford: Blackwell, 2003. p. 134-162.

INDULSKI, J.A.; LUTZ, W. Biological markers of early health effects in the assessment of the risk of cancer in people exposed to environmental carcinogens. In: **Advances in Environmental Control Technology**, p. 53-65, 1997.

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

KARP, G. The Chemical Basis of Life. In: **Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments**. 5^aEd. Nova York: John Wiley & Sons, 2008. p 33-80.

KATOH, F.; COZZI, R.R.; MARSHALL, W.S.; GOSS, G.G. Distinct Na^+/K^+ /2 Cl^- cotransporter localization in kidneys and gills of two euryhaline species, rainbow trout and killifish. **Cell and Tissue Research**, v. 334, p. 265-281, 2008.

KENNEDY, C.J. Toxicology. In: **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**. V. 3. FARRELL, A.P. [Ed.]. Elsevier: London, 2011. p. 2061-2068

KEHRIG, H.A.; HOWARD, B.M.; MALM, O. Methylmercury in a predatory fish (*Cichla* spp.) inhabiting the Brazilian Amazon. **Environmental Pollution**, v. 154, p. 68-76, 2008.

KERPER, L.E.; BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. R761-R765, 1992.

KHOSHNAMVAND, M.; KABOODVANDPOUR, S.; GHIASI, F. A comparative study of accumulated total mercury among white muscle, red muscle and liver tissues of common carp and silver carp from the Sanandaj Gheshlagh Reservoir in Iran. **Chemosphere**, v. 90, p. 1236-1241, 2013.

LACERDA, L. D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, 2008.

LAROSE, C.; CANUEL, R.; LUCOTTE, M.; DI GIULIO, R.T. Toxicological effects of methylmercury on walleye (*Sander vitreus*) and perch (*Perca flavescens*) from lakes of the boreal forest. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Parte C, v. 147, p. 139-149, 2008.

LATRUBESSE, E.M.; STEVAUX, J.C.; SINHA, R. Tropical rivers. **Geomorphology**, v. 70, p. 187-206, 2005.

LECH, J.J.; VODICNIK, M.J. Biotransformation. In: Rand, G.M.; Petrocelli, S.R.. (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. New York: Hemisphere Publishing Corporation, 1985. p. 526-557.

LECHLER, P.J.; MILLER, J.R.; LACERDA, L.D.; VINSON, D.; BONZONGO, J.C.; LYONS, W.B.; WARWICK, J.J. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? **Science of the Total Environment**, v. 260, p. 87-96, 2000.

LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M.; CORREIA, A. C.; ESTEVES, A. C. Proteins in ecotoxicology - how, why and why not? **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 873-887, 2010.

LUO, J. Manganese superoxide dismutase. **Free Radical and Radiation Biology Program**, p. 2-10, 2001.

MALM, O.; PFEIFFER, W.C.; SOUZA, C.M.M.; REUTHER, R. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira river basin, Brazil. **AMBIO**, v. 19, p. 11-15, 1990.

MALM, O.; CASTRO, M.B.; BASTOS, W.R.; BRANCHES, F.P.J.; GUIMARÃES, J. R.D.; ZUFFO, C.E.; PFEIFFER, W.C. An assessment of Hg pollution in different gold mining areas, Amazon Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 175, p. 127-140, 1995.

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

MAURICE-BOURGOIN, L.; QUIROGA, I.; CHINCHEROS, J. COURAU, P. Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira rivers and mercury exposure in riparian Amazonian populations. **Science of The Total Environment**, v. 260, p. 73-86, 2000.

MCMILLAN, D.B. Histology of the Kidney. In: **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**. V. 2. FARRELL, A.P. [Ed.]. Elsevier: London, 2011. p. 1395-1410.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.

MELA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicologia e Segurança Ambiental**, v. 68, p. 426-435, 2007.

MÉRONA, B.; JURAS, A.A.; SANTOS, G.M.; CINTRA, I.H.A. **Os peixes e a pesca no baixo Rio Tocantins:** vinte anos depois da UHE Tucuruí. Brasília: Centrais Elétricas do Norte do Brasil S.A – Eletrobras Eletronorte, 2010. 208p.

MIEIRO, C.M.; PEREIRA, M.E.; DUARTE, A.C.; PACHECO, M. Antioxidant system breakdown in brain of feral golden grey mullet (*Liza aurata*) as an effect of mercury exposure. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1034-1045, 2010.

MIEIRO, C.L.; DUARTE, A.C.; PEREIRA, M.E.; PACHECO, M. Mercury accumulation patterns and biochemical endpoints in wild fish (*Liza aurata*): A multi-organ approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2225-2232, 2011.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol_bra.pdf. [Acesso em: 28/11/2016].

MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M.G.; PINHO, G.L.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative biochemistry and physiology: Pharmacology, toxicology and endocrinology**, 146: 221-234, 2007.

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

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce:** desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM, 378 p., 2001.

NEVADO, J.J.B.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R.C.R.; BERNARDO, F.J.G.; MORENO, M.J. Mercury in the Tapajós river basin, Brazilian Amazon: A review. **Environment International**, v. 36, p. 598-608, 2010.

NICHOLSON, S.; LAM, P.K.S. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarker in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). **Environment International**, v. 31, p. 121-132, 2005.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.J.A. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.

NOVELLI, E.L.B. Estresse Oxidativo. In: **Nutrição e Vida Saudável:** estresse oxidativo e metabolismo energético. São Paulo: Tecmedd, 2005. p. 91-283.

OU, Y.C.; THOMPSON, S.A; PONCE, R.A; SCHROEDER, J.; KAVANAGH, T.J.; FAUSTMAN, E.M. Induction of the Cell Cycle Regulatory Gene p21 (Waf1, Cip1) Following Methylmercury Exposure *in Vitro* and *in Vivo*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 157, p. 203-212, 1999.

PARFITT, V.J.; RUBBA, P.; BOLTON, C.; MAROTTA, G.; HARTOG, M.; MANCINI, M. A comparison of antioxidant status and free radical peroxidation of plasma lipoproteins in healthy young persons from Naples and Bristol. **European Heart Journal**, v. 15, p. 871-876, 1994.

PERALTA, R.M. Procedimentos de isolamento e fracionamento de proteínas. In: BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. [Editores]. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. Barueri: Manole, 2003. p.193-226.

PERRY, S.F. The Kidney. In: **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**. V. 2. FARRELL, A.P. [Ed.]. Elsevier: London, 2011. p. 1411-1418.

PFEIFFER, W.C.; LACERDA, L.D. Mercury inputs into the Amazon region, Brazil. **Environmental Technology Letters**, v. 9, p. 325-330, 1988.

PFEIFFER, W.C.; MALM, O.; SOUZA, C.M.M.; LACERDA, L.D.; SILVEIRA, E.G.; BASTOS, W.R. Mercury in the Madeira River ecosystem, Rondônia, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 38, p. 239-245, 1991.

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

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PORCELA, D.B. Mercury in the Environment: Biogeochemistry. In: WATRAS, C.J.; HUCKABEE, J.W. [Ed.]. **Mercury pollution: integration and synthesis**. Florida: Lewis Publishers, 1994. p.2-7.

PORVARI, P. Mercury levels of fish in Tucuruí hydroelectric reservoir and in River Mojú in Amazonia, in the state of Pará, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 175, p. 109-117, 1995.

POWERS, S.K.; JI, L.L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 31, p. 987-97, 1999.

REGOLI, F.; GORBI, S.; FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; CORSI, I.; FOCARDI, S.; WINSTON, G. W. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual

antioxidants to a more integrated approach. **Marine Environmental Research**, v.54, n.3-5, p.419-423. 2002.

REISCHL, E.; DAFRE, A.L.; FRANCO, J.L.; WILHELM FILHO, D. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 22-53. 2007.

ROLO, A.P.; TEODORO, J.S.; PALMEIRA, C.M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, p. 59-69, 2012.

ROULET, M.; LUCOTTE, M. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferralitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 80, p. 1079-1088, 1995.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; FARELLA, N.; SERIQUE, G.; COELHO, H.; SOUSA PASSOS, C.J.; JESUS DA SILVA, E.; ANDRADE, P.S.; MERGLER, D.; GUIMARÃES, J.R.D.; AMORIM, M. Effects of Recent Human Colonization on the Presence of Mercury in Amazonian Ecosystems. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 112, p. 297-313, 1999.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; GUIMARÃES, J.R.D.; RHEAULT, I. Methylmercury in water, seston and epiphyton of an Amazonian river and its floodplain, Tapajos River, Brazil. **The Science of the total environment**, v. 261, p. 43-48, 2000.

RUST, M.B. Nutritional Physiology. In: Halver, J.E.; Hardy, R.W. [Ed.]. **Fish Nutrition**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 367-505.

RYAN, T. P.; AUST, S. D. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, p. 119-141, 1992.

SAMPAIO DA SILVA, D.; LUCOTTE, M.; PAQUET, S.; DAVIDSON, R. Influence of ecological factors and of land use on mercury levels in fish in the Tapajós River basin, Amazon. **Environmental Research**, v. 109, p. 432-446, 2009.

SANTOS, G.M.; FERREIRA, E.J.G.; ZUANON, J.A.S. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, 2006.144 p.

SARAFIAN, T.A. Methylmercury-induced generation of free radical: biological implications. **Metal Ions in Biological Systems**, p. 36, p. 415-444, 1999.

SIOLI, H. Hydrochemistry and Geology in the Brazilian Amazon Region. **Amazoniana**, v., n. 3, p. 267-277, 1968.

SCOTT, M.D.; WAGNER, C.T.; CHIU, D.T.Y. Decreased catalase activity is the underlying mechanism of oxidant susceptibility in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1181, p. 163-168, 1993.

SCHURZ, F.; SABATER-VILAR, M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defense: the role of metal-binding proteins. **Mutagenesis**, v. 15, p. 525-530, 2000.

SFAKIANAKIS, D.G.; RENIERI, E.; KENTOURI, M.; TSATSAKIS, A.M. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. **Environmental Research**, v. 137, p. 246-255, 2015.

SILVA, J. G. **Eletroforese de proteínas:** guia teórico-prático. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2001. 126p.

SOHAL, R.S.; KU, H.H.; AGARWAL, S.; FORSTER, M.J.; LAL, H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 74, p. 121-133, 1994.

SOARES, M.G.M.; COSTA, E.L.; SIQUEIRA-SOUZA, F.K.; ANJOS, H.D.B.; YAMAMOTO, K.C.; FREITAS, C.E.C. [Org.]. **Peixes de Lagos do Médio Rio Solimões**. 2^a Ed. Manaus: Instituto I-Piatam, 2008. 160 p.

STAGG, R.M.; RUSIN, J.; BROWN, F. Na⁺,K⁺-ATPase activity in the gills of the flounder (*Platichthys flesus*) in relation to mercury contamination in the Firth of Forth. **Marine Environmental Research**, v. 33, p. 255-266, 1992.

STIEN, X.; PERCIC, P.; GNASSIA-BARELLI, M.; ROMÉO, M.; LAFAURIE, M. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. **Environmental Pollution**, v. 99, p. 339-345, 1998.

THOMPSON, D.R. Metal levels in marine vertebrates In: Furness, R.W.; Rainbow, P.S. [Eds.]. **Biology of Heavy Metals in the Marine Environment**, Florida: Boca Raton, 1990. p. 144-175.

URSINI, F.; BINDOLI, A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 44, p. 255-276, 1987.

UYDAL, K.; EMRE, Y.; KÖSE, E. The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey). **Microchemical Journal**, v. 90, p. 67-70, 2008.

VANDER OOS, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAUCHEL, P.; SANTINI, W.; GUYOT, J.L.; MOQUET, J.S.; MARTINEZ, J.M.; ESPINOZA, J.C.; BABY, P.; FUERTES, O.; NORIEGA, L.; PUITA, O.; SONDAG,

- F.; FRAIZY, P.; ARMIJOS, E.; COCHONNEAU, G.; TIMOUK, F.; OLIVEIRA, E.; FILIZOLA, N.; MOLINA, J.; RONCHAIL, J. A reassessment of the suspended sediment load in the Madeira River Basin from the Andes of Peru and Bolivia to the Amazon River in Brazil, based on 10 years of data from the HYBAM monitoring programme. **Journal of Hydrology**, 2017.
- VENTURA, E.C.; GAELZER, L.R.; ZANETTE, J.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis rubber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 775-779, 2002.
- VIEIRA, E.F.; LSAAC, V.J.; FABRÉ, N.N. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Teleostei: Serrasalmidae), no Baixo Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 29, p. 625-638, 1999.
- VIEIRA, H.C.; BORDALO, M.D.; MORGADO, F.; SOARES, A.M.V.M.; ABREU, S.N. Mercury content in the white and dark muscle of Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) along the canning process: Implications to the consumers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 56, p. 67-72, 2017.
- VISPO, N.S. Proteómica. In: **Combinatoria Molecular**. Cuba: Elfos Scientiae, 2004. p. 367-404.
- WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor & Francis, 1996. 321p.
- WINSTON, G. W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 100, p. 173-176, 1991.
- YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 139-162, 1994.
- ZANETTE, J.; NUNES, F.F.; MEDEIROS, I.D.; SIEBERT, M.N.; MATTOS, J.J.; LÜCHMANN, K.H.; MELO, C.M.R.; BAINY, A.C.D. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, p. 196-198, 2008.
- ZELKO, I. N.; MARIANI, J. T.; FOLZ, J. R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.

CAPÍTULO II

Biomarcadores moleculares e bioquímicos da toxicidade do mercúrio no tecido hepático e renal de peixes da Amazônia

BIOMARCADORES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO HEPÁTICO E RENAL DE PEIXES DA AMAZÔNIA

RESUMO

Considerando a importância do mercúrio como elemento tóxico e amplamente difundido, o presente estudo teve por objetivo compreender e avaliar possíveis biomarcadores proteicos/enzimáticos da contaminação de mercúrio em peixes da região amazônica. Os tecidos hepático e renal das espécies de peixes do rio Madeira, o *Plagioscion squamosissimus* (corvina) e *Colossoma macropomum* (tambaqui), foram avaliados por meio de fracionamento de proteínas por 2D-PAGE, do mapeamento do mercúrio nos *spots* proteicos por GFAAS, da avaliação da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST) e da peroxidação lipídica (HPL). Foram realizadas identificações dos *spots* protéicos contendo mercúrio por meio da espectrometria de massas (MS). Os resultados demonstram que as maiores concentrações de mercúrio total foram encontradas na espécie carnívora (*P. squamosissimus*) e que o padrão de acúmulo deste metal foi maior no tecido hepático que no renal, para ambas espécies. Foi observado tendência para maior atividade enzimática nos tecidos hepático e renal da espécie com maior concentração de mercúrio total nos tecidos, o *P. squamosissimus*. Somente a atividade da GPx no rim e GST no fígado, foi inferior para esta espécie, fato que pode ser explicado pela interação do mercúrio com essas enzimas. Os dados obtidos por MS possibilitaram a identificação dos *spots* proteicos associados ao mercúrio, revelando proteínas envolvidas no metabolismo energético, transporte de biomoléculas, síntese e degradação de proteínas, diferenciação celular, regulação gênica e sistema antioxidante. Contribuindo assim para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à toxicidade do mercúrio e fornecendo novas perspectivas sobre possíveis candidatos a biomarcadores de monitoramento ambiental.

Palavras-chave: Contaminação ambiental, enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, metabolismo de peixes, proteômica.

MOLECULAR AND BIOCHEMICAL BIOMARKERS OF MERCURY TOXICITY IN HEPATIC AND RENAL TISSUE OF THE AMAZON FISH

ABSTRACT

Considering the importance of mercury as a toxic and widely disseminated element, the present study aimed to evaluate the protein/enzymatic biomarkers of mercury contamination in fish from the Amazon region. The hepatic and renal tissues of the Madeira river fish species, *Plagioscion squamosissimus* (corvina) and *Colossoma macropomum* (tambaqui), were evaluated by means of protein fractionation by 2D-PAGE, mapping of mercury in protein spots by GFAAS, evaluation of the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx and GST) and lipid peroxidation (HPL). Identification of mercury - containing protein spots was carried out using mass spectrometry (MS). The results showed that the highest concentrations of total mercury were found in the carnivorous specie (*P. squamosissimus*) and that the accumulation pattern of this metal was higher in the hepatic tissue than in the renal tissue, for both species. A trend was observed for increased enzymatic activity in the hepatic and renal tissues of the specie with the highest concentration of total mercury in the tissues, the *P. squamosissimus*. Only GPx activity in the kidney and GST in the liver was lower for this species, a fact that can be explained by the interaction of mercury with these enzymes. The data obtained by MS allowed the identification of the protein spots associated with mercury, revealing proteins involved with the energetic metabolism, biomolecule transport, protein synthesis and degradation, cell differentiation, gene regulation and antioxidant system. Contributing to the understanding of the molecular mechanisms underlying mercury toxicity and providing new insights into potential biomarker candidates for environmental monitoring.

Keywords: Environmental contamination, antioxidant enzymes, oxidative stress, fish metabolism, proteomics.

1. INTRODUÇÃO

Existe constante preocupação com os níveis de mercúrio na região amazônica, tanto pelos problemas de saúde pública que podem advir do consumo de pescado contaminado, quanto pelos possíveis riscos aos ecossistemas. Esta temática tem sido amplamente trabalhada pela comunidade científica, resultando em diversos estudos (Pfeiffer *et al.*, 1991; Malm *et al.*, 1995; Malm, 1998; Maurice-Bourgoïn *et al.*, 2000; Lechler *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2006; Lacerda e Malm, 2008; Sampaio da Silva *et al.*, 2009; Bastos *et al.*, 2015; Azevedo-Silva *et al.*, 2016).

Inicialmente, o grande aporte de mercúrio no ambiente era atribuído a atividade de mineração de ouro, que durante o processo de amalgamação perdia grandes quantidades deste metal para a atmosfera (vapor) e para os rios. Mesmo com redução considerável, comparado a corrida de ouro nos anos de 1980 a 1990, onde se estima que foram liberadas de 2 a 3 mil toneladas de mercúrio no ambiente amazônico (Malm, 1998), diversas dragas ainda são encontradas ao longo de rios como o Madeira, um dos afluentes do rio Amazonas. Concomitante à mineração, pesquisas têm demonstrado que o solo e sedimentos desta região são grandes reservatórios naturais de mercúrio (Roulet e Lucotte, 1995), e por meio de ações naturais e/ou antrópicas é liberado para os cursos d'água. Atividades como desmatamento, agricultura e queimadas, que facilitam os processos de erosão do solo, tem figurado nas listas de preocupações relacionadas ao contínuo fornecimento de mercúrio para o ambiente aquático (Lacerda *et al.*, 2004).

Outra preocupação se refere ao barramento do rio Madeira para construção das usinas hidrelétricas (UHE), e de como essa modificação do ambiente poderia contribuir para a remobilização e transformação das espécies mercuriais. A princípio o revolvimento dos sedimentos, a desaceleração do fluxo de água, a geração de ambientes anóxicos, e outros fatores associados a construção das hidrelétricas, contribuiriam para o processo de metilação do mercúrio, transformando-o da forma inorgânica pra forma orgânica, o metilmercúrio (MeHg) (Fearnside, 2014). Como o metilmercúrio possui alta afinidade com os grupos sulfidrila e hidroxila das proteínas (Schurz *et al.*, 2000; Clarkson e Magos, 2006), este se difunde facilmente pelas membranas biológicas, podendo se distribuir e acumular no organismo (Baird e Cann, 2011). Com altas taxas de captação e baixas taxas de eliminação, pode atingir altas concentrações em níveis

tróficos elevados, apresentando-se em maior concentração em espécies predadoras, fenômeno conhecido como biomagnificação (Malm, 1998; Bastos *et al.*, 2006; Azevedo-Silva *et al.*, 2016).

Os efeitos tóxicos desencadeados pelo mercúrio no organismos são explicados por diversos mecanismos que atuam de forma conjunta, e acredita-se que o estabelecimento do estresse oxidativo esteja envolvido na toxicidade (Farina *et al.*, 2009). O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, promovido pelo mercúrio, e sua interação com macromoléculas biológicas suscetíveis, podem levar a peroxidação lipídica (danos as membranas citoplasmática), danos ao DNA (mutagênese) e oxidação de proteínas (Farina *et al.*, 2009).

Considerando então a maior biodisponibilidade do mercúrio para a biota aquática, medidas de monitoramento e avaliação do ambiente são de extrema importância. Por tanto, os peixes das espécies *Plagioscion squamosissimus* (corvina) e *Collossoma macropomum* (tambaqui) foram selecionados para este estudo por sua abundância populacional e posição na cadeia trófica (carnívoro e onívoro, respectivamente). Na tentativa de integrar os dados de acumulação e toxicidade, e considerando o papel dos órgãos na toxicocinética e toxicodinâmica do mercúrio, fígado e rim foram selecionados para demonstrar os padrões de acumulação e respostas bioquímicas e moleculares em um sistema ambiental contaminado e impactado pela construção de hidrelétricas, o rio Madeira-RO.

As descobertas de biomarcadores sensíveis às alterações das concentrações de mercúrio no organismo poderão indicar de forma precoce efeitos subletais, e contribuir para tomada de decisões de forma a mitigar danos ao ecossistema (Arias *et al.*, 2007). Neste contexto, tanto o estudo das metaloproteínas, com a possível identificação de proteínas que podem se associar ao mercúrio, quanto a avaliação do estresse oxidativo, são ferramentas interessantes no esclarecimento dos mecanismos de toxicidade do mercúrio. Uma vez identificada a proteína associada ao mercúrio pode-se fazer a combinação de anotações funcionais e análise de sua via metabólica, dispondo-se assim de informações sobre as funções e processos em que estão envolvidas, e possíveis consequências relacionadas a sua perda de função.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e Preparo das Amostras

As coletas foram feitas com redes de espera, de malhas entre 1,5 e 10 cm (entre nós), distribuídas em um raio de 500 m dos pontos explicitados no mapa (figura 1), no período de cheia do rio Madeira (março/2016). Foram capturados nove peixes da espécie *P. squamosissimus* e dez peixes da espécie *C. macropomum*, que foram eutanasiados no local, por mielotomia seguida de perfuração craniana (CCAC, 2005 e CONCEA, 2015); e realizada a retirada dos tecidos hepático e renal, que foram colocados individualmente em tubos *falcon* e imediatamente armazenados em nitrogênio líquido (-196°C). As amostras foram então encaminhadas para os laboratórios de estudos metalômicos do Instituto de Biociências (Departamento de Química e Bioquímica-UNESP), onde foram armazenadas em freezer a -80°C para os procedimentos analíticos. Tanto para as análises de separação de proteínas como para as análises de atividade das enzimas relacionadas ao sistema antioxidante, as amostras foram unidas e maceradas, derivando em um *pool* de cada espécie e tecido.

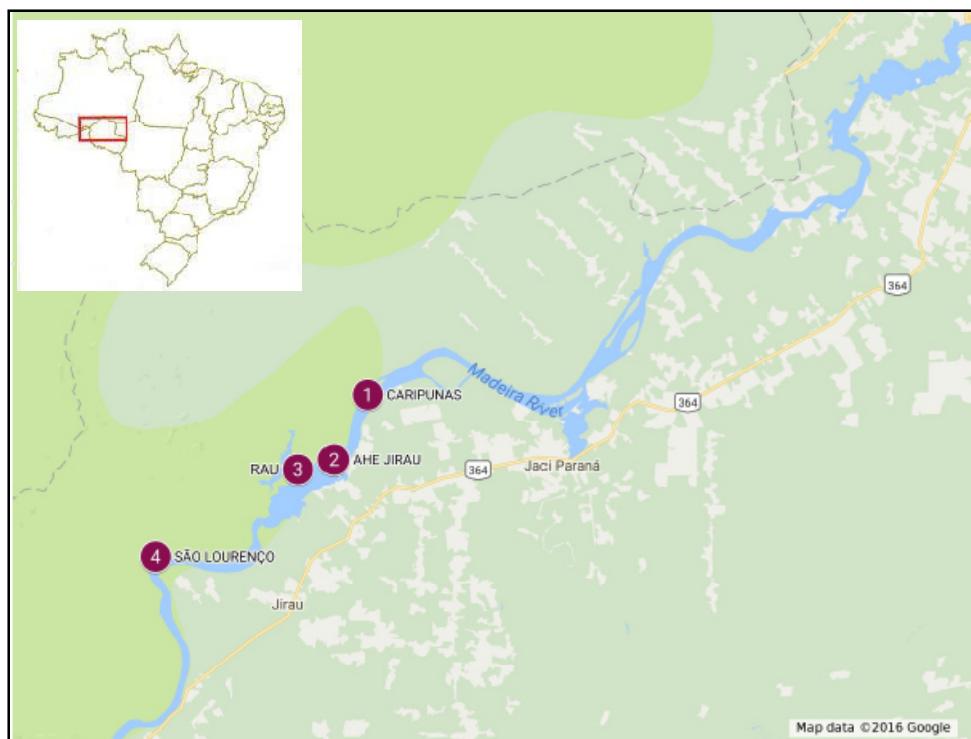


Figura 1. Mapa dos locais de coleta no rio Madeira, a jusante e a montante da área do UHE Jirau-RO. 1-Caripunas (09°11'16,98"S 064°36'44,53"W); 2-Área da represa; 3-Rau (09°16'12,8"S 064°41'14,1"W); 4-São Lourenço (09°23'26,5"S 064°53'05,7"W). Fonte: Google Maps.

2.2. Extração, Precipitação e Quantificação de Proteínas

No processo de extração da fração proteica, as amostras de cada tecido e espécie foram maceradas manualmente e de forma vigorosa, com auxílio de almofariz e pistilo, e na presença de nitrogênio líquido. Durante a maceração foi adicionado água ultrapura na proporção de 1 g de tecido para 2 mL de água, formando um homogenado ou extrato bruto que foi transferido para microtubos graduados. Esses extratos foram então centrifugados a 4656,47 g por 30 minutos (a 4°C). O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e submetido a centrifugação a 18625,88 g por 10 minutos (a 4°C). O sobrenadante foi novamente retirado e o passo anterior repetido por mais duas vezes para obtenção de um extrato límpido (livre de gordura, tecido conjuntivo, ou outros possíveis interferentes).

Na fase de precipitação das proteínas, foi utilizado a acetona 80% (v/v). Para tanto, o extrato proteico foi dividido em alíquotas de 200 µL e adicionado acetona gelada na proporção de 1:4 (200 µL de amostra para 800 µL de acetona). As amostras foram então armazenadas a 2°C por duas horas, sendo posteriormente centrifugadas a 18625,88 g por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado restando, aderido ao fundo do microtubo, o precipitado proteico de cada tecido e espécie.

Parte dos precipitados de cada amostra foi utilizado para quantificação da proteína total, pelo método do biureto (Doumas *et al.* 1981). O precipitado proteico foi ressolvabilizado em 200 µL de hidróxido de sódio (NaOH 500 mM). Uma alíquota de 50 µL da amostra foi transferida para um tubo contendo 2,5 mL de reativo de biureto¹ que foi aquecido em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Após cinco minutos de descanso, em temperatura ambiente, as leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro, utilizando curva analítica previamente construída com concentrações de 10 a 100 g L⁻¹ a partir de solução padrão estoque de albumina bovina (100 g L⁻¹) para determinação das concentrações de proteína total nos extratos dos precipitados proteicos.

2.3. Eletroforese Bidimensional

¹ Hidróxido de sódio 1,86 M, tartarato de sódio e potássio 320 mM, sulfato de cobre 120 mM e iodeto de potássio 300 mM.

Após a precipitação, cada amostra foi ressolubilizada em 200 µL de tampão Tris-HCl² (1 M). A este tampão também foi adicionado 1,4-ditiotreitol (DDT), na proporção de 2,8 mg de DDT para cada 1 mL de tampão. Com os valores de concentração de proteína conhecidos previamente, foram feitas diluições no mesmo tampão Tris-HCl com DDT, de maneira que a concentração de proteínas de todas as amostras fosse de 1,5 µg µL⁻¹. Um volume de 250 µL da amostra ressolubilizada e corrigida quanto a concentração de proteínas foi aplicado nas canaletas de uma bandeja de reidratação, onde foram também colocadas fitas pré-fabricadas de gel de poliacrilamida de 13 cm, contendo anfólitos imobilizados de pH com gradiente de 3 a 10. As fitas com as respectivas amostras foram então recobertas com óleo mineral (para minimizar evaporação e possível cristalização de sólidos) e deixadas em temperatura ambiente por 14 horas para completa reidratação das fitas com a solução contendo a amostra.

As fitas reidratadas, para a etapa de separação das proteínas por ponto isoelétrico (primeira dimensão), foram então colocadas no sistema de isoeletrofocalização (IEF) do modelo EttanTM IPGphorTM3. A programação de tensão elétrica utilizada para separação obedeceu os seguintes estágios: a) Estágio 1, voltagem 500 V, tempo de 1 h e acúmulo de voltagem 0,5 kWh; b) Estágio 2, voltagem 1000 V, tempo de 1 h e acúmulo de voltagem 0,8 kWh; c) Estágio 3, voltagem 8000 V, tempo de 2,5 h e acúmulo de voltagem 11,3 kWh; e d) Estágio 4, voltagem 8000 V, tempo de 0,5 h e acúmulo de voltagem 5,4 kWh (condição de corrida: temperatura de 20°C; corrente de 50 µA por fita; programação e condições estabelecidas por protocolo do sistema Ettan IPGphor 3).

Finalizado o último estágio da focalização isoelétrica e antes do procedimento de separação das proteínas pela massa molecular (SDS-PAGE), as fitas passaram por duas etapas de equilíbrio. A primeira etapa foi a de redução, na presença do DDT, que atua no rompimento das pontes dissulfeto presentes nas proteínas; e a segunda etapa foi a de alquilação, onde a iodocetamida age evitando a reoxidação dos grupos tiois. Para tanto, cada uma das fitas foi mergulhada em 5 mL de solução de equilíbrio³, onde primeiramente foi acrescido DTT 1% (m/v), e deixado sob agitação leve por 15

² Ureia (7 M), tioureia (2 M), 3-[3-cloroamidopropil]dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) a 2% (m/v), anfólitos de pH na faixa de 3 a 10 a 0,5% (v/v) e azul de bromofenol a 0,002%.

³ Ureia 6 M, dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mM (pH 8,8) e azul de bromofenol 0,002% (m/v).

minutos. Após essa etapa, as fitas foram novamente mergulhadas em 5 mL da mesma solução contendo iodocetamida 2,5% (m/v) no lugar do DTT, e deixadas por mais 15 minutos sob agitação.

Na sequência, foi dado início a eletroforese de segunda dimensão, onde as fitas foram colocadas sobre geis de poliacrilamida a 12,5%⁴, previamente preparados entre placas de vidro com as dimensões de 180x160x1,5 mm. Um padrão conhecido de proteínas com peso molecular entre 14,4 e 97 kDa foi aplicado em papeis filtro (8 µL) colocados ao lado de cada fita, que foram então cobertos com solução de agarose 0,5% (m/v).

A corrida foi feita em cuba SE 600 Ruby (Amersham Biosciences), com a programação de tensão de 100 V por 30 minutos, seguida de 250 V por 2 horas e 5 minutos. Os geis foram então retirados das placas e imersos em solução de fixação de proteínas⁵ pelo período de 1 hora, e então colocados em solução corante de coomassie coloidal⁶ por 48 horas, sob agitação leve.

Após retirada do corante dos geis com água ultrapura, os mesmos foram digitalizados em *scanner* apropriado (GE Healthcare) e as imagens obtidas foram analisadas pelo programa de tratamento de imagens *ImageMaster Platinum* versão 7.0.

Foram confeccionados oito geis de cada amostra, divididos entre duas corridas eletroforéticas realizadas em tempos distintos, para verificação da equivalência ou *matching* entre os *spots* dos geis (pontos sinalizados no gel pelo corante e que representam uma ou mais proteínas e/ou suas isoformas) e a repetibilidade da técnica. Os geis da primeira corrida foram direcionados para o mapeamento e quantificação do mercúrio nos *spots* proteicos, enquanto os geis subsequentes foram encaminhados para caracterização das proteínas.

2.4. Determinação de Mercúrio Total

Como estudos anteriores indicaram que a maior quantidade de *spots* proteicos contendo mercúrio encontrava-se na faixa de menor massa molecular (Moraes *et al.*,

⁴ Acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, tris-hidroximetil amino metano, dodecil sulfato de sódio (SDS), N,N',N,N'-tetrametilenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio.

⁵ Ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v).

⁶ Sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), azul de coomassie G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v).

2012; Braga *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2015), padronizou-se, neste estudo, o mapeamento apenas na faixa de separação das proteínas de aproximadamente 14,4 kDa.

A quantificação do mercúrio total nas amostras *in natura* de tecido hepático e renal, nos precipitados proteicos e nos *spots* recortados dos geis, foi feita por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), após mineralização ácida das amostras. Para tanto, as amostras dos tecidos (aproximadamente 0,1 g), os precipitados proteicos (ambos em duplicata) e os *spots* provenientes de quatro geis, foram transferidos para tubos de digestão, onde foi adicionado 300 µL de ácido sulfúrico concentrado e 200 µL de peróxido de hidrogênio, e os mesmos foram aquecidos em bloco digestor (temperatura inferior a 100°C). O extrato ácido obtido foi então avolumado para 5 mL com água ultrapura. A leitura foi feita em espectrômetro de absorção atômica (Shimadzu modelo AA-6800) e modificador químico zircônio e nitrato de paládio (1:2) foi utilizado. A validação dessas determinações foi feita por meio da análise de padrão certificado de proteína de peixe (*Fish Protein DORM 4 - NRC*).

2.5. Preparo e Identificação dos *Spots* Proteicos

Os *spots* proteicos, na faixa mapeada (14,4 kDa), que apresentaram mercúrio, foram extraídos dos géis, cortados em frações (aproximadamente 1 mm³), transferidos para microtubos e submetidos as etapas de remoção do corante, redução e alquilação das proteínas, digestão tríptica e eluição dos peptídeos, descritas detalhadamente abaixo, e que seguem os procedimentos desenvolvidos por Shevchenko *et al.* (2006).

Remoção do corante: Solução descorante⁷ foi adicionada aos microtubos de forma a cobrir os *spots* particulados, sendo deixada por 10 minutos. O descorante foi retirado e o procedimento repetido por mais três vezes até que o gel dos *spots* estivesse completamente transparente. A solução descorante foi removida e acetonitrila 100% foi adicionada aos microtubos, também por 10 minutos (procedimento repetido por mais duas vezes), até que os fragmentos de gel estivessem completamente desidratados (branco opaco). A acetonitrila foi removida e os microtubos permaneceram abertos para

⁷ Acetonitrila 50% (v/v) e AmBic 100 mM 25% (v/v).

evaporação completa do reagente (30 minutos). Sendo então guardados em freezer até o próximo passo.

Redução e alquilação: 200 µL de solução de redução⁸ foi adicionada aos microtubos para reidratação dos fragmentos de gel, que foram então incubados em banho-maria a 56°C por 40 minutos. A solução de redução foi removida e adicionados 200 µL de solução de alquilação⁹, sendo posteriormente incubados em temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. A solução de alquilação foi removida e os fragmentos foram lavados em AmBic 25 mM por três minutos. Novamente foi repetido o procedimentos de desidratação dos fragmentos com acetonitrila 100% (dois banhos de 10 minutos), evaporação e armazenamento em freezer.

Digestão tríptica: Foi transferido para os microtubos 15 µL de solução digestora¹⁰ que foi deixado em repouso por 15 minutos. Foi então adicionado AmBic 25 mM até completa cobertura dos fragmentos de gel e os microtubos foram incubados a 37°C em banho-maria por 14 horas.

Eluição dos peptídeos: Os microtubos foram retirados do banho-maria e foi adicionado 15 µL de solução bloqueadora¹¹ e 100 µL do eluente A¹², sendo então colocados em banho ultrassom a 40°C por 15 minutos. Posteriormente, com auxílio de uma pipeta acoplada a uma ponteira de microcapilaridade, a solução foi transferida para outro microtubo vazio que abrigariam os peptídeos extraídos. Nos microtubos com os fragmentos de gel foi repetido esse procedimento com o eluente A mais uma vez, acrescendo-se o sobrenadante novamente aos microtubos dos peptídeos. Aos fragmentos foi então adicionado 100 µL do eluente B¹³ que foram então transferidos para o banho ultrassom por 15 minutos a 40°C. O sobrenadante foi transferido para os microtubos dos peptídeos. O mesmo procedimento foi repetido adicionando-se acetonitrila 100% no lugar do eluente B e novamente o sobrenadante foi direcionado para os microtubos dos peptídeos. A solução contendo os peptídeos extraídos foi então submetida a secagem em concentrador a vácuo sob temperatura ambiente até restar aproximadamente 1 µL no microtubo. Sendo então armazenados em freezer até a etapa de caracterização.

⁸ 10 mL de AmBic 50 mM e 30,88 mg de DTT.

⁹ 10 mL de AmBic 50 mM e 101,75 mg de iodoacetamida.

¹⁰ Tripsina a 10 ng µL⁻¹: 10 µL de tripsina em 90 µL de AmBic 25 mM gelado.

¹¹ Acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 5% (v/v).

¹² Acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 1% (v/v).

¹³ Metanol grau HPLC 60% (v/v) e ácido fórmico 1% (v/v).

A solução peptídica foi então analisada para obtenção dos espectros de massas, por meio do sistema nanoAcquity UPLC acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Machester, UK). Os dados obtidos foram processados utilizando-se o *software* PLGS (Protein Lynx Global Server), e a identificação das proteínas foi realizada por meio do algoritmo de contagem de íons, com busca no banco de dados *UniProt* (www.uniprot.org), por homologia com dados referentes a classe Actinopterygii, a qual pertence as duas espécies de peixe estudadas.

Com a identificação das proteínas de interesse, foram obtidas as sequências *fasta* das mesmas, que foram transferidas para o *software* Blast2GO (B2G). Por meio deste programa foi realizada a análise funcional das proteínas associadas ao mercúrio, permitindo sua categorização segundo os processos biológicos em que estão envolvidas, e sua função molecular ou atividade bioquímica (Conesa *et al.*, 2005).

2.6. Análise da Atividade das Enzimas do Sistema Antioxidante

Com o intuito de avaliar a influência dos níveis de mercúrio presentes no organismo sobre um possível estado de estresse oxidativo, foi mensurada a atividade das enzimas glutationa peroxidase (GPx), glutationa-S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), bem como a concentração do hidroperóxido de lipídeo (HPL). Para isso, o *pool* de cada um dos tecidos, de cada espécie, foi vigorosamente macerado em almofariz com pistilo e auxílio de nitrogênio líquido, e com a adição de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 (a aproximadamente 4°C) na proporção de 5 mL de tampão para 1 g de tecido. Estes extratos foram então centrifugados a 9503 g por 40 minutos (a 4°C) até obtenção de um extrato límpido. Todas as atividades enzimáticas foram mensuradas através de *kits* de ensaio Sigma.

A atividade da GPx foi feita por determinação indireta, que baseia-se na oxidação da glutationa reduzida (GSH) a glutationa oxidada (GSSG) catalisada pela GPx, que é depois acoplado à reciclagem de volta de GSSG para GSH utilizando glutationa redutase (GR) e NADPH (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, reduzida). A redução da absorbância do NADPH medida a 340 nm durante a oxidação de NADPH a NADP⁺ é indicadora de atividade da GPx, uma vez que é da GPx o fator limitante da velocidade das reações acopladas. A reação foi realizada a 25°C e o pH do

tampão de reação foi ajustado a 7,0 com HCl, pois o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 0,3 mM) foi utilizado como substrato para início da reação no lugar do hidroperóxido de terc-butilo (t-Bu-OOH), uma vez que este último é também substrato para a GST. A catalase foi bloqueada pela adição de NaN_3 1 mM (azida de sódio) na mistura de reação (Flohe e Gunzler, 1984). Por definição, uma unidade de GPx causará a formação de 1,0 μmol de $NADP^+$ a partir de NADPH por minuto a pH 7,0 a 25°C em uma reação de acoplamento na presença de glutationa reduzida, glutationa redutase e H_2O_2 .

No ensaio da GST foi mensurado a atividade total, ou seja, de todas as isoformas da enzima. Esta metodologia utiliza o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato que se conjuga ao grupo tiol da glutationa, promovendo um aumento na absorbância a 340 nm.

A atividade da CAT foi mensurada pela observação espectrofotométrica do decréscimo na absorbância do H_2O_2 a 240 nm com um programa cinético. Por definição, uma unidade de CAT irá decompor 1,0 μmol de H_2O_2 à oxigênio e água por minuto a pH 7,0 e 25°C a uma concentração de substrato de 10 mM de peróxido de hidrogênio.

O ensaio da SOD utiliza o sal de tetrazólio de Dojindo WST-1 (2- (4-iodofenil) - 3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-dissulfofenil) - 2H - tetrazólio, sal monossódico) que produz um corante formazano solúvel em água mediante redução com um ânion superóxido. A taxa de redução com O_2 está linearmente relacionada com a atividade da xantina oxidase, e é inibida pela SOD. Por conseguinte, o IC₅₀ (50% de inibição da atividade da SOD) pode ser determinada por um método colorimétrico. Uma vez que a absorbância a 440 nm, é proporcional à quantidade do ânion superóxido, a atividade da SOD como uma atividade de inibição pode ser quantificada medindo a diminuição dos valores de absorbância.

Todos os valores de atividade enzimática foram expressos em atividade específica, ou seja, a atividade da enzima por mg de proteína no extrato proteico. Dosagem de proteínas foi feito pelo método de biureto (descrito anteriormente).

A determinação do hidroperóxido de lipídeo foi feita com base na oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} , em meio ácido, pelos hidroperóxidos, na presença do indicador alaranjado de xilenol. O alaranjado de xilenol se liga aos íons férricos produzindo cromóforo azul-arroxeadoo que absorve radiação do comprimento de onda de 560 nm (Jiang *et al.* 1991).

Para tanto, 100 µL da amostra foi acrescida de 900 µL da mistura reativa¹⁴ e após um período de incubação de 30 minutos em temperatura ambiente a leitura foi feita a 560 nm. Os resultados foram convertidos para µmol g⁻¹ tecido utilizando valor da literatura de absorvividade molar (ϵ) de $4,3 \times 104\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Jiang *et al.* 1991).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de concentração de mercúrio encontrados em *P. squamosissimus*, nos tecidos estudados, foram maiores que os apresentados pelo *C. macropomum* (tabela 1). Este resultado já era esperado em se tratando de uma espécie carnívora e onívora, respectivamente, reafirmando a relação da distribuição deste metal com os hábitos alimentares das espécies de peixe e sua tendência de biomagnificação na cadeia trófica, como demonstrado por outros autores em estudos com peixes da região amazônica (Maurice-Bourgoin *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2006; Bastos *et al.*, 2015).

A distribuição do mercúrio entre os tecidos seguiu o mesmo padrão para as duas espécies, com a concentração mais elevada no fígado, seguido do rim (tabela 1). Alguns estudos com peixes de ambientes contaminados relataram maior concentração de mercúrio no rim em comparação ao fígado (Navarro *et al.*, 2009; Mieiro *et al.*, 2009), e essa inversão pode ser explicada pela forma em que o mercúrio se apresenta (orgânica ou inorgânica). Estudos experimentais com MeHg e mercúrio inorgânico demonstram que há um padrão de acúmulo do MeHg maior para o fígado, enquanto a forma inorgânica tem o rim como órgão alvo (Ribeiro *et al.*, 1999; Berntssen *et al.*, 2003).

De maneira geral, os metais tóxicos se acumulam de forma significativa em órgãos com taxas metabólicas superiores, como fígado, rim e brânquias (Filazi *et al.*, 2003). A maior quantidade de proteínas que apresentam grupos sulfidrilas (grupos que apresentam grande afinidade por espécies mercuriais), nestes órgãos também facilita a bioacumulação (Marijić e Raspot, 2007). O metilmercúrio passa, no organismo, por vários ciclos entero-hepáticos, sendo secretado na bile e novamente reabsorvido em parte na circulação portal, retornando ao fígado (Ballatori e Clarkson, 1985; Dutczak e Ballatori, 1994; Clarkson, 2002).

¹⁴ 100 µM xilenol laranja, 250 µM sulfato ferroso amoniacial, 25 mM H₂SO₄ e 4 mM BHT em metanol 90% (v/v); pH final de ~2.

As concentrações de mercúrio total determinadas nos precipitados proteicos (tabela 1) demonstraram que em média 75% do mercúrio presente nos tecidos está associado as proteínas extraídas no processo de precipitação total com acetona 80% (v/v). O restante pode estar ligado a fração lipídica ou outros compostos extraídos durante os processos de extração e precipitação das proteínas.

Tabela 1. Determinação de mercúrio total nos tecidos e precipitados proteicos de fígado e rim de *Plagioscion squamosissimus* e *Collossoma macropomum*.

	<i>P. squamosissimus</i>	<i>C. macropomum</i>
Tecido	Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Fígado	279±4,41	198±3,11
Rim	115±2,13	88±1,52
Precipitado Proteico		
Fígado	206±3,54	145±2,43
Rim	81±1,41	65±0,94
Padrão certificado*		403±0,12

*Padrão certificado DORM 4 - NRC contendo 410±55 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio total.

Com relação a análise de separação das proteínas por 2D-PAGE, a correlação entre os *spots* proteicos das repetições dos geis de cada amostra demonstrou *matching* de 86±3 e 91±4% para o tecido hepático de *P. squamosissimus* e *C. macropomum*, respectivamente; de 91±2 e 93±5% para o tecido renal de *P. squamosissimus* e *C. macropomum*, respectivamente. Significando, que em média, mais de 90% dos *spots* proteicos estavam presentes em todos os geis, das diferentes amostras, e apresentaram desvio padrão menor que 5%, demonstrando eficiência nas condições adotadas para a 2D-PAGE, assim como demonstrado em outros estudos (Moraes *et al.*, 2012; Braga *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2015).

O mercúrio foi mapeado em 77 *spots* do tecido hepático de *P. squamosissimus*, dos quais, 29 apresentaram concentrações deste elemento. Já em *C. macropomum*, foram recortados 81 *spots*, e em 06 havia a presença de mercúrio (figura 2 A e B). No proteoma renal, foram mapeados 46 e 81 *spots* em *P. squamosissimus* e *C. macropomum*, respectivamente, dos quais foi encontrado mercúrio em 05 *spots* de *P. squamosissimus* e em 19 *spots* de *C. macropomum* (figura 3 A e B).

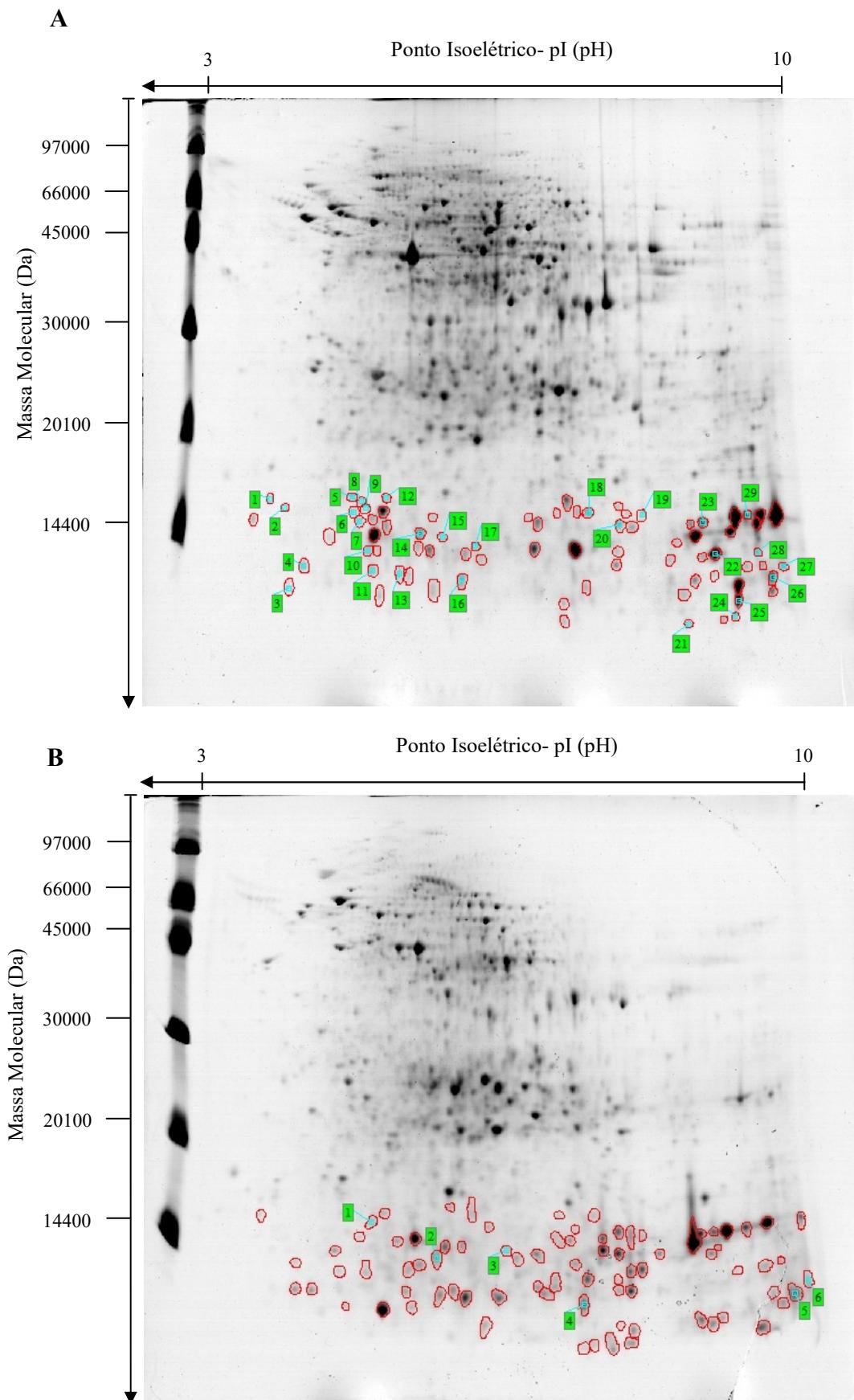


Figura 2. Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por eletroforese 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido hepático de *Plagioscion squamosissimus* (A) e *Collossoma macropomum* (B). Os círculos em vermelho indicam os spots recortados e digeridos para determinação de mercúrio total. Os números indicam os spots onde o mercúrio foi detectado e quantificado, e a referência para as respectivas proteínas identificadas por LC- MS/MS (tabela 2).

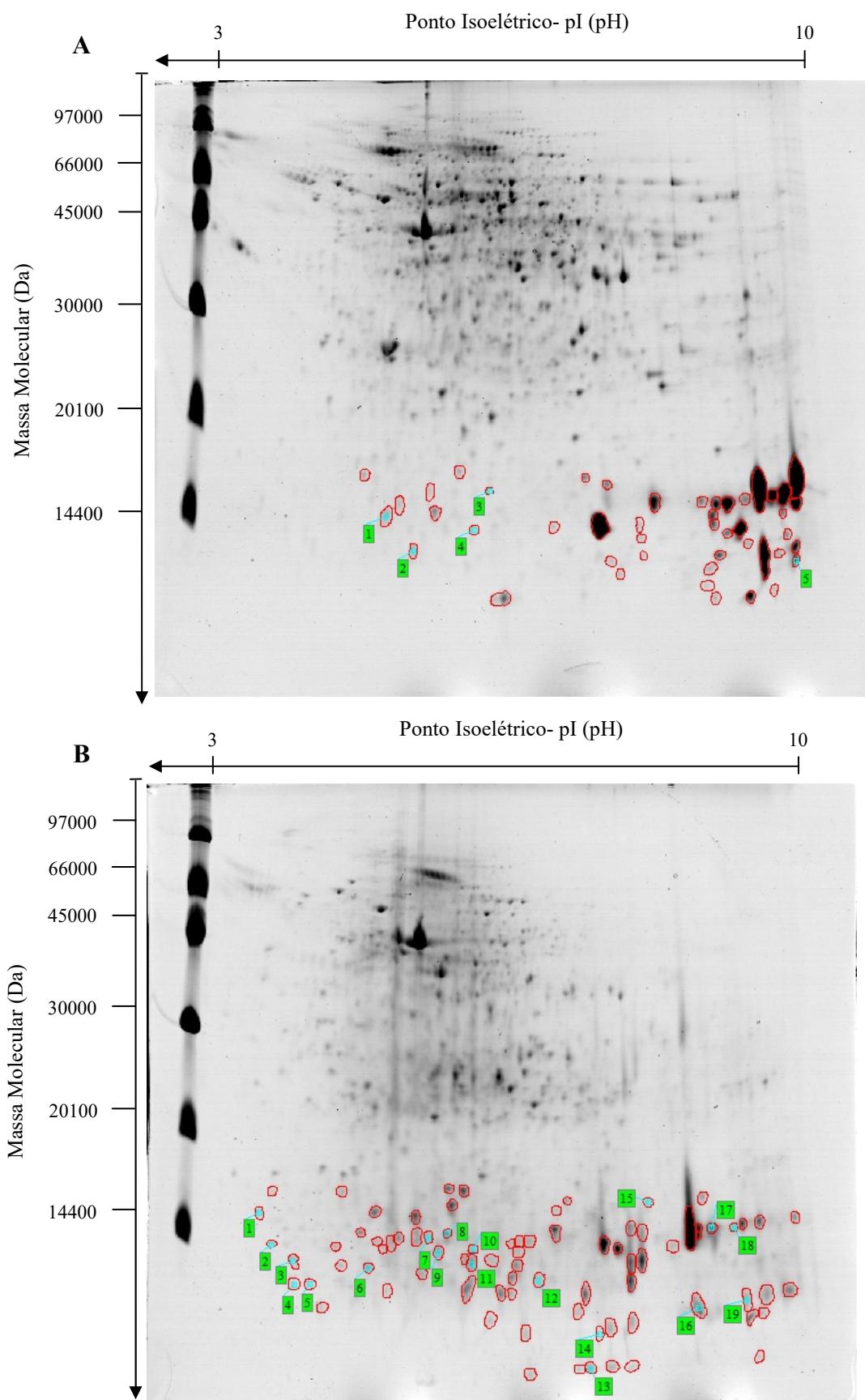


Figura 3. Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por eletroforese 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido renal de *Plagioscion squamosissimus* (C) e *Collossoma macropomum* (D). Os círculos em vermelho indicam os *spots* recortados e digeridos para determinação de mercúrio total. Os números indicam os *spots* onde o mercúrio foi detectado e quantificado, e referência para as respectivas proteínas identificadas por LC- MS/MS (tabela 3).

Já em relação a análise de caracterização dos *spots* proteicos, é comum encontrar mais de uma proteína ao se realizar a busca no banco de dados (Beranova-Giorgianni, 2003). Assim, padronizou-se considerar o maior *score* e a maior cobertura para o fechamento da classe de proteína. Também foram considerados os dados de massa molecular (Mm) e pI obtidos experimentalmente, em relação à Mm e pI teóricos obtidos no banco de dados Uniprot. Logo, foi possível caracterizar 19 *spots* do proteoma hepático do *P. squamosissimus* e 06 *spots* do *C. macropomum* (tabela 2), entre os que apresentavam mercúrio. Entre as proteínas identificadas, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*spot* 19) do *P. squamosissimus*, e a glutationa-S-transferase classe Mu (GST Mu) e hemoglobina subunidade β (*spot* 01 e 03) pertencentes ao *C. macropomum*, encontravam-se nos *spots* de maior concentração de mercúrio (32,75; 18,22 e 18,05 µg g⁻¹ de Hg, respectivamente).

No proteoma renal foi feita a identificação de 05 e 14 *spots*, para as espécies *P. squamosissimus* e *C. macropomum*, respectivamente (tabela 3). As enzimas superóxido dismutase (SOD) (*spot* 04) e glutationa peroxidase (GPx) (*spot* 03) estavam presentes nos *spots* de maior concentração de mercúrio de *P. squamosissimus* (178, 23 e 122,92 µg g⁻¹ de Hg, respectivamente). Enquanto que em *C. macropomum*, a enzima glutationa-S-transferase Pi (GST Pi) (*spot* 07) foi identificada no *spot* de maior concentração de mercúrio do tecido renal (244,61 µg g⁻¹ de Hg). Este também foi o *spot* com maior concentração de mercúrio em comparação a todos os *spots* mapeados de ambas espécies e tecidos.

Tabela 2. Proteínas identificadas por espectrometria de massa, a partir da identificação e quantificação do mercúrio por GFAAS, no tecido hepático de *Plagioscion squamosissimus* e *Collossoma macropomum*.

Nº Spot	Proteína	Acesso	Score	pI/Mm (Da) Experimental	pI/Mm (Da) teórica (Uniprot)	Cobertura (%)	Massa de Proteína (µg) no spot	Hg no Spot (µg g ⁻¹)	Sequência de Peptídeos
<i>Plagioscion squamosissimus</i>									
1	Não identificada	-	-	3,78/15.735	-	-	2,89	20,97	-
2	Aldéido desidrogenase 9 (Fragmento)	Q4JHZ3	589	3,96/15.231	4,66/13.158	12,82	2,37	15,22	ANNTFFGLASGVFTR
3	Não identificada	-	-	4,01/11.584	-	-	4,58	1,20	-
4	Não identificada	-	-	4,19/12.475	-	-	6,97	6,89	-
5	FABP - adipócito	D2KMP3	396	4,78/15.818	5,27/ 15.116	6,72	3,60	3,20	ALGVGFATR ALGVGFATR WDGGKETSLVR
6	FABP 3b	I0BWI1	783	4,79/15.003	5,39/14.845	14,29	3,91	12,28	ETSLVR SLVR
7	FABP 3a	I0BWI0	6,111	4,86/14.534	5,68/14.794	18,05	3,99	7,52	ETSLVR WDGGKETSLVR ETSLVR WDGGKETSLVR
8	FABP - adipócito	D2KMP3	3,392	4,89/15.534	5,40/15.077	8,89	2,34	10,25	ALGVGFATR
9	FABP - adipócito	D2KMP3	511	4,95/15.219	5,27/15.116	6,72	2,82	14,91	ALGVGFATR
10	FABP 3a	I0BWI0	726	4,97/13.104	5,68/14.794	7,52	4,88	3,59	ETSLVR WDGGKETSLVR
11	FABP (Fragmento)	W5U4P2	2,095	5,02/12.269	5,61/9.743	15,91	7,53	6,37	LGEEFDETTADDRK
12	GST Mu (Fragmento)	G7Z079	216	5,19/15.712	4,77/16.504	8,45	2,91	18,9	VDILENOAMDFR VDILENQAMDFR NAQWVEVVR
13	Pterina-4-<i>o</i>-carbinolamina desidratase	I3JVT6	929	5,35/12.157	6,18/13.745	36,89	6,73	8,10	VQTLSLTHDCGGLSQR AHILPLLR DFNOAFGFMSR
14	Não identificada	-	-	5,60/13.962	-	-	12,56	19,12	-
15	Catalase (Fragmento)	A8BT77	238	5,87/13.764	5,70/ 12.293	8,49	2,92	1,89	NLPVEEADR
16	Não identificada	-	-	6,11/11.912	-	-	11,04	3,80	ADDIFATR TLSTFR ALDIDFATR ALDIDFATR VIVQNGDKFETK VQNGDKFETK DIDFATR IVQNGDKFETK LSTFR
17	Proteína de ligação ao retinol celular II	Q8UVVG6	512	6,28/13.312	6,09/15.806	20,74	3,86	18,77	

Nº Spot	Proteína	Acesso	Score	pI/Mm (Da) Experimental	pI/Mm (Da) teórica (Uniprot)	Cobertura (%)	Massa de Proteína (μg) no spot	Hg no Spot ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Sequência de Peptídeos
18	Hemoglobina β	B2BP38	178	7,64/15.014	6,89/16.176	7,48	8,39	10,85	FIAVVVSALGR
19	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Fragmento)	A0A1C917Z7	16.832	8,29/14.812	9,07/13.127	37,6	3,14	32,75	GASONIPASTGAAK VIPELNGKLTGMAFR VPTPNVSVVDLTVR DGRGASQNIPASTGAAK LTGMAFR
20	Não identificada	-	-	8,02/14.413	-	-	6,60	8,26	-
21	Não identificada	-	-	8,86/10.217	-	-	4,41	8,17	-
22	Não identificada	-	-	9,18/12.976	-	-	38,82	2,03	-
23	FABP fígado b	B3FQTS	2.118	9,02/14.437	8,89/14.150	15,08	16,78	1,04	TVTNSFTIGKLEGGK TPGKTIVTNSTIGK
24	Hemoglobina β	P14521	612	9,44/10.444	8,94/15.779	6,80	5,25	5,71	LLIVYPWTQRL LLIVYPWTQRL
25	Hemoglobina β	D0VWS2	796	9,47/11.046	8,64/15.958	6,85	30,76	0,37	LLIVYPWTQRL
26	Enolase	W5KGK9	992	9,88/11.995	9,97/10.011	19,35	18,70	3,88	AAVPSGASTGVHEALELR
27	Não identificada	-	-	9,98/12.495	-	-	5,76	7,30	-
28	Não identificada	-	-	9,70/13.055	-	-	5,24	6,87	-
29	Ran GTPase (Fragmento)	Q1WCD2	184	9,57/14.757	9,68/16.348	15,28	12,60	3,81	LVLVGDGGTGTGK YNNWWDTAGQEK
<i>Colosoma macropomum</i>									
1	GST Mu (Fragmento)	G7Z079	186	4,94/14.423	4,77/16.504	8,45	5,32	18,22	VDILENQAMDFFR VDILENQAMDFFR
2	FABP a	I0BWI0	19.961	5,70/12.685	5,68/14.794	22,56	13,76	2,18	ETSLVRWDGKETSLVR ETSLVRWDGKETSLVR
3	Hemoglobina β (Fragmento)	G9DBN5	415	6,51/13.068	7,07/11.613	9,52	3,35	18,05	LLIVFPWTQRL
4	Hemoglobina α (Fragmento)	A0A0U2S7K2	2.147	7,41/10.813	7,15/10.118	9,68	21,29	2,25	VDPANFKLRVDPANFK
5	Ribossoma 40S S24	Q6TEN7	333	9,88/11.088	10,00/12.169	11,43	30,11	2,41	TIPDVVFVGFKF ISGIYEETRVFLENVIR
6	Histona H4	A4VAK6	343	9,99/11.585	11,36/11.397	27,18	15,96	6,45	DAVTYTEHAK

Tabela 3. Proteínas identificadas por espectrometria de massa, a partir da identificação e quantificação do mercúrio por GFAAS, no tecido renal de *Plagioscion squamosissimus* e *Collossoma macropomum*.

Nº Spot	Proteína	Acesso	Score	pI/Mm (Da) Experimental	pI/Mm (Da) teórica (Uniprot)	Cobertura (%)	Massa de Proteína (μg) no spot	Hg no Spot (μg g ⁻¹)	Sequência de Peptídeos
<i>Plagioscion squamosissimus</i>									
1	Fator de aprimoramento de células natural killer (Fragmento)	C1JCA3	1.103	5,06/13.961	5,55/14.058	28,35	4,71	1,17	QITINDLPVGR GLFVIDDK LVQAFQHTDK SVDETLR
2	FABP - adipócito	D2KMP3	264	5,39/12.402	5,40/15.077	15,44	2,84	4,05	ALGVGFATR
3	Glutatona peroxidase - GPx4 (Fragmento)	C4NXS5	208	6,29/15.260	8,33/18.772	16,27	0,84	122,92	DIDGNEVSLEK SYEFSAK AEFDLFSK
4	Superóxido dismutase [Cu-Zn]	W5KMP5	221	6,10/13.328	5,87/15.683	6,54	0,92	178,23	LACGVIGAQ
5	Hemoglobina β	P14521	727	9,94/11.997	8,94/15.779	9,91	7,93	5,30	LLIVYPWTQR
<i>Collossoma macropomum</i>									
1	Não identificada	-	-	3,59/15.122	-	-	4,18	29,06	-
2	Não identificada	-	-	3,74/13.676	-	-	2,55	6,86	-
3	Não identificada	-	-	4,00/12.953	-	-	6,79	6,18	-
4	Malato desidrogenase 1Aa	H0WE86	123	4,01/12.006	4,59/12.126	11,50	4,82	69,60	DLDAAILVGSMPR
5	Não identificada	-	-	4,21/12.157	-	-	1,76	65,74	-
6	Nucleosídeo difosfato quinase	A0A0N4STV7	87	4,90/12.676	4,75/9.331	20,00	7,57	16,85	VMLGETNPADSKPGTIR
7	GST pi (Fragmento)	V5N4K6	780	5,62/14.078	5,60/18.712	9,85	3,44	244,61	LIYQEYETGK
8	FABP cérebro	Q918N9	99	5,86/14.163	5,43/14.917	6,02	7,99	17,51	LGEEFDETTADDR
9	Não identificada	-	-	5,75/13.334	-	-	8,52	4,93	-
10	Hemoglobina β	Q7ZZY5	283	6,16/13.404	6,81/11.958	8,41	3,60	45,74	LHVPDNR
11	Hemoglobina β (Fragmento)	G9DBN5	421	6,14/12.789	7,07/11.613	9,52	15,03	2,79	LLIVFPWTQR

Nº Spot	Proteína	Acesso	Score	pI/Mm (Da) Experimental	pI/Mm (Da) teórica (Uniprot)	Cobertura (%)	Massa de Proteína (μg) no spot	Hg no Spot ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Sequência de Peptídeos
12	Ubiquitina e ribossomal S27a (Fragmento)	Q2II93	7.328	6,93 /12.167	10,19/12.897	51,75			TITLEVEPSDTIENVK TLSDDYNIQKESTLHLVLR IQDKEGIPPDQQR LIFAGK
13	Hemoglobina β	F6NT71	2.696	7,55/8.842	6,89/9.480	10,23	6,09	10,92	MQIFVK TLSDYNIQKESTLHLVLR EGIPPDQQR
14	Hemoglobina β (Fragmento)	G9DBN1	2.554	7,67/10.027	8,18/11.582	9,52	5,43	18,97	LHVDPDNFR LLIVFPWTQRL FLQNLAWCLAAER
15	Hemoglobina α	W5LAQ5	2.268	8,26/15.637	8,69/15.521	37,06	3,57	8,41	ADDIGAEALGR TIMGAVTAAYASIDDLPGAMSQ LSELHAYK
16	GTPase Rab8 (Fragmento)	B2BWH5	148	8,87/11.063	8,50/15.663	8,09	34,41	2,11	LQIWDTAGQER
17	L-lactato desidrogenase B-B (Fragmento)	E9QH54	144	9,02/14.461	9,73/14.727	5,97	13,97	3,44	HIPQIVK
18	Hemoglobina α	Q5BJC7	119	9,30/14.580	9,16/15.402	6,29	3,14	19,28	MLTVYPQTK MLTVYPQTK
19	Histona H4	P62796	409	9,45/11.456	11,36/11.367	17,48	13,50	5,85	VFLENVIR DAVYYTEHAK

A análise funcional das proteínas identificadas no proteoma hepático e renal de ambas espécies estudadas (quadro 1) demonstra os possíveis impactos do mercúrio em vias metabólicas importantes, incluindo processos como o transporte de oxigênio, lipídeos e ácidos graxos, ligação de íons metálicos, proteção antioxidante, metabolismo energético, regulação gênica, hemopoiese e síntese e degradação de proteínas. Genericamente, os metais tóxicos, por meio de diversos mecanismos, podem afetar a atividade das proteínas. Eles podem deslocar íons metálicos essenciais, que desempenham papel na fisiologia da proteína; ligar-se a grupos sulfidrila, com avidez, e, em menor grau, grupos hidroxila, carboxila e fosforila, provocando rearranjos estéricos e possível perda de função; catalisar a oxidação de cadeias laterais de aminoácidos; ou ainda interferir com a dobra de proteínas na estrutura tridimensional (Schurz *et al.*, 2000; Ayensu e Tchounwou, 2006; Jan *et al.*, 2015).

Embora os mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade do mercúrio ainda não estejam totalmente elucidados, a via glicolítica tem sido estudada como um dos alvos de compostos de mercúrio, e o acúmulo de intermediários da glicólise, tem sido relatado como um efeito em casos de exposição aguda a este metal, o que poderia indicar a inibição de enzimas do final da cadeia glicolítica (Berg *et al.*, 2010). Neste estudo conseguimos identificar, no proteoma hepático de *P. squamosissimus*, duas enzimas diretamente relacionadas ao metabolismo energético, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e uma isoforma da enolase. No tecido renal de *C. macropomum* também foram identificadas duas enzimas com participação no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs).

Proteína	Espécie	Tecido	Função Molecular	Processo Biológico
Aldeído desidrogenase	<i>P. squamosissimus</i>	Fígado	Atividade de oxidoreductase, atuando sobre o grupo aldeído ou oxo de doadores, tendo NAD ou NADP como aceitador	Processo de oxiredução
FABP e Proteína de ligação ao retinol celular	<i>P. squamosissimus</i> <i>C. macropomum</i>	Fígado Fígado e Rim	Atividade de transporte; ligação de lípideos, ácidos graxos, retinol e ácido biliar	Transporte; processo metabólico da vitamina A; desenvolvimento embrionário em cordados;
Glutationa-S-transferase Mu e Pi	<i>P. squamosissimus</i> <i>C. macropomum</i>	Fígado Fígado e Rim	Atividade de glutatona transferase	Resposta celular ao estímulo xenobiótico e a substâncias tóxicas; processo metabólico
Pterina-4- α -carbinolamina	<i>P. squamosissimus</i>	Fígado	Regeneração da tetrahidrobiopterina	Síntese da tetrahidrobiopterina (cofator na síntese de óxido nítrico e essencial na conversão da fenilalanina em tirosina)
Catalase	<i>P. squamosissimus</i>	Fígado	Ligação de íons metálicos e grupamento heme	Desintoxicção de oxidante celular, processo de oxiredução; resposta ao peróxido de hidrogênio e íons cobre; processo catabólico do peróxido de hidrogênio
Hemoglobina β e Hemoglobina α	<i>P. squamosissimus</i> <i>C. macropomum</i>	Fígado Fígado e Rim	Atividade de ligação e transporte de oxigênio; ligação ao grupamento heme (íons ferro)	Transporte de oxigênio; citólise
Gliceradeído-3-fosfato desidrogenase	<i>P. squamosissimus</i>	Fígado	Fosforilação de gliceradeído-3-fosfato; ligação a NAD, NADP e microtúbulos; atividade da peptidil-cisteína-S-nitrosilase	Glicólise; processo de oxiredução; estabilização de proteínas; processo metabólico da glicose; organização do citoesqueleto dos microtúbulos; processo apoptótico do neurônio
Enolase	<i>P. squamosissimus</i>	Fígado	Ligação à íons magnésio; atividade de hidratase de fosfopiruvato	Glicólise
Ran GTPase Rab8 GTPase	<i>P. squamosissimus</i> <i>C. macropomum</i>	Fígado Rim	Ligação ao GTP e proteínas	Desenvolvimento da retina neural; importação de proteínas no núcleo; exportação de subunidades ribossômicas do núcleo; transdução de sinal; resposta celular ao estímulo de insulina; fusão de vesícula de Golgi com a membrana alvo; transporte melanossomas; acoplamento de vesículas envolvidas na exocitose
Ribosomal 40S S24	<i>C. macropomum</i>	Fígado	Constituinte estrutural do ribossoma; ligação a nucleotídeos	Tradução (formação de proteínas); hemopoiese primitiva e definitiva

Proteína	Espécie	Tecido	Função Molecular	Processo Biológico
Histona H4	<i>C. macropomum</i>	Fígado Rim	Ligação ao DNA e histonas; ligação específica à dominância protéica, atividade de heterodimerização proteica	Cobertura de telômeros; heterotetramerização de proteínas; processo metabólico de proteínas celulares; regulação positiva da expressão gênica (epigenética); silenciamento de genes por RNA; transcrição com modelos de DNA (iniciação); montagem de nucleossomas dependentes de replicação de DNA; silenciamento de cromatina no rDNA
Fator de aprimoramento de células <i>natural killer</i>	<i>P. squamosissimus</i>	Rim	Atividade de peroxiredoxina	Desintoxicacão de oxidantes celulares; homeostase redox celular; processos de oxiredução
Glutationa peroxidase - GPx4	<i>P. squamosissimus</i>	Rim	Atividade de glutationa peroxidase	Resposta ao estresse oxidativo; desintoxicacão de oxidantes celulares
Superóxido dismutase [Cu-Zn]	<i>P. squamosissimus</i>	Rim	Superóxido dismutase; ligação a íons cobre e zinco	Remoção de radicais superóxido; resposta ao estímulo de xenobióticos e ao metilmercúrio; processos de oxiredução
Malato desidrogenase	<i>C. macropomum</i>	Rim	Atividade da L-malato desidrogenase	Processo metabólico de carboidratos, de NAPH , do malato e do oxalacetato; ciclo dos ácidos tricarboxílicos
Nucleosídeo difosfato quinase	<i>C. macropomum</i>	Rim	Atividade de nucleosídeo difosfato quinase; ligação de ATP e íons metálicos	Diferenciação celular; biossíntese de GTP, UTP e CTP; endocitose; desenvolvimento do sistema nervoso; fosforilação de difosfato de nucleosídeos; regulação da angiogênese e de processos apoptóticos
Ubiquitina e ribossomal S27a	<i>C. macropomum</i>	Rim	Componente estrutural do ribossoma; ligação a protease	Processo de biossíntese de glicogênio, processo catabólico, dependente de complexos, que promove anafase; transporte de íons transmembrana; regulação da estabilidade do RNAm detecção e resposta do dano ao DNA; transporte endossomal; via de sinalização do receptor de fator de crescimento de fibroblastos; resposta imune inata; regulação positiva e negativa de processos apoptóticos; ubiquitinacão de proteínas, entre outros
L-lactato desidrogenase	<i>C. macropomum</i>	Rim	Atividade da L-lactato desidrogenase	Processo metabólico de carboidratos e do ácido carboxílico; processos de oxiredução

Quadro 1. Categorizacão das proteinas identificadas nos spots contendo mercúrio do proteoma hepático e renal de *Plagioscion squamosissimus* e *Colossoma macropomum*, de acordo com a função molecular que desempenha e o processo biológico com o qual contribui. Análise funcional por Blast2GO.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (*EC 1.2.1.12*), identificada no proteoma hepático do *P. squamosissimus*, em um dos *spots* deste tecido com maior concentração de mercúrio, é uma enzima importante da via glicolítica, que atua catalisando a conversão do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 1,3-bifosfoglicerato, na presença de NAD⁺ e fosfato inorgânico (Harris e Waters, 1976). Têm sido atribuído outras funções a GAPDH além de seu papel no metabolismo energético, demonstrando se tratar de enzima de múltiplas funções (Sirover, 1999). O acúmulo de GAPDH dentro do núcleo está envolvido na indução da apoptose, com associação à síntese de proteínas pró-apoptóticas (Berry e Boulton, 2000). Também está envolvida na regulação da transcrição gênica (Craig *et al.*, 2012). Pode atuar como via alternativa na recepção de transferrina em casos de depleção de ferro (Kumar *et al.*, 2012). E ainda, está envolvida em mecanismos para manter o estado redox do organismo. Em tentativa de reverter o estresse oxidativo, ocorre a inativação natural da GAPDH, para reencaminhar o fluxo de glicose para o ciclo das pentoses fosfato, permitindo assim a geração de mais NADPH (Ralser *et al.*, 2007). Alguns sistemas antioxidantes se utilizam do NADPH em situações de estresse, como o é o caso do ciclo de reciclagem da glutationa, por exemplo. GAPDH é uma enzima abundante no organismo, encontrada principalmente como tetrâmero, composto por quatro subunidades idênticas que contêm um grupo tiol cada, e que são essenciais para a função catalítica da enzima (Sirover, 1999). Estes resíduos de cisteína presentes nesta enzima tiol são alvos moleculares de importância toxicológica, pois reagem facilmente com compostos de mercúrio e outros metais tóxicos, ocasionando perda das propriedades catalíticas da enzima (Woenckhaus e Duchmann, 1975, Wai *et al.*, 2013). Baixas concentrações de mercúrio demonstraram elevar a atividade da GAPDH, como um sistema compensatório, enquanto que concentrações mais elevadas causam a inibição total da atividade enzimática (Wolf e Baynes, 2007). Yadetie *et al.* (2016), em análise do proteoma hepático da espécie *Gadus Morhua* (Bacalhau do Atlântico), constataram diferença na regulação desta enzima, com redução da abundância de GAPDH em indivíduos expostos ao metilmercúrio em laboratório. Os autores também sugeriram supressão das vias metabólicas geradoras de energia, uma vez que há a presença de resíduos de cisteína reativos em muitas enzimas destas vias, tornando-as alvo da oxidação induzida pelo mercúrio.

Outra enzima envolvida na geração de energia, e identificada neste estudo também no proteoma hepático do *P. squamosissimus*, é a enolase (2-fosfo-D-glicerato hidrolase) (*EC 4.2.1.11*), cuja função principal é catalisar a desidratação reversível de 2-fosfo-D-glicerato em fosfoenolpiruvato, participando assim das vias glicolítica e gliconeogênica (Reed *et al.*, 1996). Também são consideradas enzimas multifuncionais, pois tem se encontrado evidências de sua capacidade de servir como receptor de plasminogênio na superfície de uma variedade de células, de funcionar como proteína de choque térmico e de se ligar as estruturas do citoesqueleto e da cromatina (Pancholi, 2001). Apresenta-se na forma de homodímeros e é classificada como enzima ativada por metal, tendo o magnésio como cofator natural, com o qual expressa sua maior atividade (Brewer, 1985). No entanto, outros íons metálicos divalentes, como o manganês, o zinco, o cádmio, o cobalto e o níquel, também podem se ligar a enolase e ativar sua função, mas em menor grau (Brewer e Ellis, 1983). Já íons como cálcio (Ca^{2+}), chumbo (Pb^{2+}) e mercúrio (Hg^{2+}) tem a capacidade de se ligar ao sítio ativo da enzima, mas não favorecem a conformação necessária à sua atividade (Brewer, 1985). A associação do mercúrio ao *spot* onde esta proteína foi identificada pode sugerir um possível prejuízo na função desta enzima e consequentemente nas vias metabólica em que está envolvida, podendo então ser uma possível proteína biomarcadora da toxicidade deste elemento.

A malato desidrogenase (MDH) (*EC 1.1.1.37*) e L-lactato desidrogenase (LDH) (*EC 1.1.1.27*) também são enzimas do metabolismo energético. A MDH catalisa a interconversão de malato a oxalacetato, na presença da coenzima NAD^+ como acceptor de elétrons (Goward e Nicholls, 1994). Pode ser citósica, com papel na gliconeogênese e lipogênese; ou mitocondrial, participando no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Basaglia, 1989). Já a LDH catalisa a oxidação reversível do lactato a piruvato, também dependente de NAD^+ , no último passo da glicólise anaeróbia (Read *et al.*, 2001). O mecanismo de catálise das duas enzimas é semelhante, compartilham estrutura tridimensional similar, (homodímeros) e a substituição de um único resíduo de aminoácido da L-lactato altera a enzima para malato desidrogenase (Goward e Nicholls, 1994). Em peixes, enzimas como a LDH, tem sido reconhecidas como fornecedoras de energia em ocasiões onde a atividade glicolítica é reduzida por exposição ao mercúrio, ou em condições extremas de estresse (Kramer *et al.*, 1992). Com relação a interferência

do mercúrio na atividade enzimática, a forma de MDH encontrada neste estudo é a citosólica, e embora apresente vários grupos sulfidrila livres, estes parecem não possuir atividade catalítica, o que confere maior estabilidade a está enzima em relação a ligantes, ocorrendo a perda de função somente em condições onde ocorra mudança na conformação da proteína (Guha *et al.*, 1968; Skilleter *et al.*, 1970). Por outro lado, a LDH tem grupos sulfidrila envolvidos na atividade catalítica e que podem se ligar a compostos mercuriais, pelo menos em condições *in vitro* (Di Sabato e Kaplan, 1963). A LDH têm sido investigadas como biomarcador da toxicidade ocasionada pela presença de metais tóxicos em organismos aquáticos, mas sem apresentar relação clara entre a contaminação e a atividade enzimática (Kroon *et al.*, 2017).

A interação do mercúrio com biomoléculas que contém grupos reativos, influencia em seu transporte e deposição no organismo, ou mesmo em determinadas organelas (Clarkson e Magos, 2006; Carvalho *et al.*, 2008). As subunidades de hemoglobina, α e β , e várias isoformas das proteínas de ligação a ácidos graxos (FABP), ambas proteínas com função molecular de transporte, foram encontradas associadas a spots contendo mercúrio, em todas as espécies e tecidos analisados.

Com a função de ligação e transporte de oxigênio, a hemoglobina apresenta-se como tetrâmero, composto de quatro cadeias de globinas, duas α e duas β . São metaloproteínas, onde cada globina contém um grupo prostético heme, com um átomo de ferro no centro de um anel de porfirina, que permite a ligação com quatro moléculas de oxigênio, de forma reversível (Perutz, 1978). Algumas espécies de peixes podem apresentar assimetria na formação dos tetrâmeros de hemoglobina, com pelo menos três cadeias de globina diferentes em uma única molécula de hemoglobina (Souza e Bonilla-Rodriguez, 2007). Podendo ser encontrado também, espécies com hemoglobinas simétricas e assimétricas concomitantes, de maior ou menor afinidade com o oxigênio, com alterações nas quantidades relativas de cada tipo de hemoglobina moduladas pelas condições ambientais (Fago *et al.*, 2002). São portanto, proteínas particularmente importantes no sistema adaptativo dos peixes, que passam por grandes variações na disponibilidade de oxigênio no ambiente durante a vida. Ao ser ingerido, o mercúrio, é absorvido no intestino, penetra na membrana celular dos eritrócitos, e torna-se associado com as hemoglobinas, em função de sua elevada afinidade pelos grupos sulfidrila destas moléculas, distribuindo-se assim do sangue para outros tecidos (Doi e

Tagawa, 1983; Ancora *et al.*, 2002; Zayas *et al.*, 2014). O número de grupos sulfidrila em hemoglobinas tetraméricas de vertebrados varia entre diferentes espécies animais, de 2 a 18 grupos por tetrâmero (Kleinschmidt e Sgouros, 1987). Zayas *et al.* (2014), encontraram evidência de que a hemoglobina presente no tecido hepático de golfinhos brancos (*Lagenorhynchus acutus*) era a principal proteína de ligação ao metilmercúrio, e que esta ligação se dava através dos resíduos de cisteína presentes na subunidade β , enquanto que a cadeia α parecia contribuir com menos de 10% das ligações ao mercúrio.

Outra proteína de transporte caracterizada neste estudo foi a proteína de ligação a ácidos graxos (FABP), em suas diversas isoformas, que atuam no transporte intracelular de metabólitos intermediários hidrofóbicos e como transportadores de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) entre membranas (Ockner, 1990). São proteínas citoplasmáticas, altamente conservadas, e de baixo peso molecular (entre 14 e 15 kDa), que pertencem a família multigene de proteínas de ligação de lipídeos intracelulares, que inclui as proteínas de ligação ao retinol celular (absorção, transporte e metabolismo da vitamina A) (Schulz, 2008; Storch e Corsico, 2008). LFABP (*Liver*) possui ainda papel antioxidante importante perante o estresse oxidativo no fígado, onde se apresenta em maior abundância, tem a capacidade de se ligar a hemes livres (limitando sua capacidade de gerar espécies reativas), e também a AGCL e seus metabólitos oxidativos, além de outras moléculas que quando não vinculadas podem causar citotoxicidade (Wang *et al.*, 2015). Embora existam variações entre as diferentes formas desta proteína, todas possuem pelo menos um resíduo de cisteína e vários resíduos de metionina (Bernier e Jollès, 1987; Wilton, 1989; Buelt e Bernlohr, 1990; Wang *et al.*, 2015). E, embora, até o recente momento, não haja na literatura estudos relacionando a ligação do mercúrio a esta proteína de transporte, estes resíduos reativos presentes podem ser alvo de ligação para este metal, facilitando assim sua passagem no meio intracelular. Ainda, Wang *et al.* (2013), constataram que o declínio da expressão gênica de FABP3, ocasionado pela intoxicação induzida por mercúrio, causa defeitos no desenvolvimento embrionário do zebrafish (*Danio rerio*), incluindo atraso no desenvolvimento e edema no pericárdico. E que este efeito está provavelmente relacionado ao papel desta proteína na regulação da sinalização do ácido retinóico.

Outra classe de proteínas relacionadas ao transporte é a da superfamília das pequenas GTPases (*EC 3.6.5.2*), da qual participam a Ran e Rab8 GTPases, que foram identificadas no proteoma hepático de *P. squamosissimus* e no proteoma renal de *C. macropomum*, respectivamente. A Ran (proteína nuclear de ligação ao GTP) é membro da família Ras, que relaciona-se a enzimas hidrolases, que podem se ligar e hidrolisar o trifosfato de guanosina (GTP) (Scheffzek e Ahmadian, 2005). Trata-se de proteína envolvida no transporte nucleocitoplasmático, realizando a translocação de RNA e outras proteínas através dos poros nucleares durante a interfase (ciclo celular) (Moore e Blobel, 1993). Já Rab8 está envolvida na hidrólise do GTP e transporte vesicular (Scheffzek e Ahmadian, 2005). De maneira geral, todas as proteínas GTPase mostram arquitetura modular comum, com resíduos de cisteína na região carboxiterminal (Takai *et al.*, 2001). E embora não se tenha conhecimento de estudos associando o mercúrio e outros metais tóxicos a estas proteínas, os resíduos de cisteína podem ser alvo de ligação a metais. Uma vez que estas proteínas estão envolvida em diversos processos celulares, perturbações em seu sistema de ação podem resultar em problemas na replicação do DNA e exportação do RNA, estrutura da cromatina, crescimento e estrutura do envelope nuclear, e progressão do ciclo celular (Sazer, 1996; Sazer e Dasso, 2000).

Outra enzima encontrada neste estudo e envolvida em processos de diferenciação celular foi a nucleosídeo difosfato quinase (NDK) (*EC 2.7.4.6*), envolvida na síntese de nucleosídeos trifosfato (NTP). As NDKs são fornecedores de NTP para a síntese de ácido nucléico, de lipídeos, de polissacarídeos e de GTP para o alongamento proteico, transdução de sinal e polimerização de microtúbulos (Takács-Vellai *et al.*, 2015). Possuem um resíduo de histidina conservado em todas as isoformas, que está envolvido no ciclo catalítico (Gilles *et al.*, 1991). Apresenta-se com estrutura hexamérica na maioria dos organismos, com exceção de algumas bactérias (Lascu *et al.*, 2000) e precisam de um complexo nucleotídeo - Mg²⁺ como substrato enzimático no segundo passo da reação, onde a enzima transfere o fosfato para um aceitador difosfato de nucleosídeo (Williams *et al.*, 1993). Não há estudos sobre a ligação desta enzima a íons mercúrio, no entanto, como acontece com a enolase, possivelmente outros íons metálicos divalentes, também podem se ligar a esta enzima (Brewer e Ellis, 1983), interferindo em sua atividade.

Ainda, foram identificadas, neste estudo, duas proteínas relacionadas a regulação gênica, a pterina-4-alfa-carbinolamina desidratase do proteoma hepático de *P. squamosissimus*, e a histona H4 do proteoma hepático e renal de *C. macropomum*.

A pterina-4-alfa-carbinolamina desidratase (PHS) (*EC 4.2.1.96*), apresenta-se na forma de dímeros ou tetrâmeros de acordo com o compartimento celular onde se encontra, e é proteína de funções mecanisticamente distintas, combinando papel na regulação de genes à nível de transcrição e função enzima aparentemente não relacionada (Strandmann *et al.*, 2001). Atua, no citoplasma, na regeneração da tetrahidrobiopterina (BH4), que é um cofator na síntese de óxido nítrico e para monooxigenases de aminoácidos aromáticos, além de catalisar o primeiro passo da síntese de dopamina e serotonina (Thöny *et al.*, 2000); já no núcleo funciona como um cofator de dimerização do fator nuclear de hepatócitos 1 (HNF1), aumentando sua atividade transcrecional (Kaufman, 1970; Johnen e Kaufman, 1997; Lei e Kaufman, 2004). Dímeros ou tetrâmeros são espécies não covalentemente ligadas, e aparentemente contêm grupos sulfidrila cisteína livres (Hauer *et al.*, 1993) que podem se ligar ao mercúrio. Deficiências na atividade desta enzima, e consequentemente na regeneração da BH4, causam distúrbio reconhecido em humanos como hiperfenilalaninemia, com redução da formação de tirosina, que é o precursor de catecolaminas e melanina (Thöny *et al.*, 1998).

Já a histona H4, em conjunto com outras histonas (dois pares de H2A/H2B e dois de H3/H4), formam um complexo proteína-DNA que compõem o nucleossoma, que é o elemento estrutural da cromatina (Luger *et al.*, 1997). As histonas eram tratadas como componentes puramente estruturais da cromatina, mas recentemente surgiram evidências de sua participação da regulação da expressão gênica (Vidanes *et al.*, 2005). H4 e H3 formam um tetrâmero central no componente proteico da cromatina, com dois monômeros de cada proteína. H4 possui um N-terminal que contém quatro resíduos de lisina, que são os locais de acetilação e desacetilação das histonas, e faz parte do mecanismo de regulação gênica (Hong *et al.*, 1993). Contém ainda um resíduo de histidina relacionado a ligação ao DNA (Ebralidse *et al.*, 1988). As histonas possuem poucas cisteína naturais, sendo a H3 a única proteína desta família com um resíduo Cys na posição 110 (Hake e Allis, 2006). Adamczyk *et al.* (2007) demonstraram que sítios do tipo "dedos de zinco" são encontrados no sítio H3/H3 do tetrâmero (H3-H4)₂ do

nucleossoma, e que estes podem ser alvo para a íons de metais tóxicos como o mercúrio.

Também foram identificadas neste estudo duas proteínas relacionadas ao metabolismo proteico, a proteína ribossomal 40S S24 e a ubiquitina ribossomal S27a. A primeira é componente do ribossoma, e faz parte de um grande complexo de ribonucleoproteínas responsáveis pela síntese proteica na célula (Ramakrishnan e White, 1998). A proteína ribossomal 40S S24, citoplasmática, é componente da subunidade 40S, pertencente a família S24E. Participa também da regulação da transcrição de genes e da regulação de células de proliferação e apoptose, através de funções extra-ribossômicas (Hsu *et al.*, 2014). Syversen e Kaur (2012) sugerem que alterações conformacionais em proteínas ribossômicas ocasionadas pela ligação ao mercúrio, podem estar envolvidas no papel deste metal de interferir na síntese de proteínas.

Já a ubiquitina, fundamental na homeostase proteica, é essencialmente uma molécula marcadora que visa proteínas para uma variedade de destinos metabólicos (Wong *et al.*, 1993). A ubiquitina atua por meio de sua ligação pós-tradução a outras proteínas (ubiquitinação), alterando a função, localização ou tráfego da proteína, ou aponta-a para a destruição pelo proteassoma 26S (Ross e Pickart, 2004; Burger e Seth, 2004). A ubiquitinação é importante ferramenta reguladora que controla a concentração das principais proteínas de sinalização, como as envolvidas no controle do ciclo celular por exemplo, bem como a remoção de proteínas danificadas ou mutantes que podem ser prejudiciais à célula (Ross e Pickart, 2004). Defeitos na regulação desta proteína pode levar a manifestação de doenças neurodegenerativas, desenvolvimento anormal e câncer (Weissman, 2001). Pode se fundir as proteínas ribossômicas L40 e S27a para a biogênese ribossômica (Finley *et al.*, 1989). Todas as proteínas da família ubiquitina compartilham um mecanismo bioquímico comum: uma ligação isopeptídica é formada entre a glicina terminal do modificador e um grupo amino da proteína alvo, e geralmente, este grupo amino possui resíduos de lisina. Falini *et al.* (2008) demonstraram a capacidade da ubiquitina humana de ligar ao Zn (II), Cd (II) e Hg (II), que apresentam preferência para os mesmo pontos de ancoragem, sendo o resíduo de histidina His68 o local preferencial, seguido de um segundo e terceiro pontos próximos ao N-terminal, que quando ligados aos metais promovem transição polimórfica da

forma da proteína. A ubiquitina ribossomal S27a, também já foi encontrada em *spots* contendo mercúrio, do proteoma de diferentes espécies de peixes amazônicos, estudadas por nosso grupo de pesquisa (Vieira *et al.*, 2015; Braga *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2017).

As espécies reativas de oxigênio são conhecidas por induzir uma série de danos a componentes biológicos, causando a oxidação de proteínas, induzindo mutações gênicas e a peroxidação de lipídeos de membrana (Sohal *et al.*, 1994). Para a defesa celular, o organismo requer a expressão de enzimas antioxidantes como a catalase, a superóxido dismutase e a glutationa peroxidase, que desempenham papel fundamental na desintoxicação de espécies reativas. O mercúrio é conhecido por desencadear o estresse oxidativo, que tem papel central na sua toxicidade (Berntssen *et al.*, 2003). E, além de contribuir na geração de espécies reativas de oxigênio e de induzir a peroxidação lipídica (Sarafian, 1999; Farina *et al.*, 2009), sua alta reatividade por grupos tiol e selenol de proteínas (Schurz *et al.*, 2000), torna as enzimas do sistema antioxidante alvos potenciais para este metal. Identificamos neste estudo algumas enzimas com função antioxidante, e que contribuem para o equilíbrio redox celular, em *spots* contendo mercúrio. Glutationa-S-transferase foi identificada no tecido hepático de ambas as espécies, e também no tecido renal de *C. macropomum*. Glutationa peroxidase e superóxido dismutase foram encontradas no proteoma renal de *P. squamosissimus*, e a catalase no tecido hepático desta espécie. Todas estas enzimas compõem a linha de frente da desintoxicação orgânica de espécies reativas. Além disso, aldeído desidrogenase, que atua na desintoxicação de aldeídos tóxicos, endógenos e exógenos, e o fator de aprimoramento de células *natural killer*, que além de atuar nas defesas imunitárias, também possui função de antioxidante como enzima peroxiredoxina (que atua na degradação de peróxidos), também foram identificadas no proteoma hepático e renal, respectivamente, de *P. squamosissimus*.

A glutationa-S-transferase (GST) (*EC 2.5.1.18*) é uma família de enzimas multifuncionais, implicadas na fase II da desintoxicação do organismo, e envolvidas na conjugação da glutationa (GSH) a uma série de compostos eletrofílicos, desde subprodutos endógenos, até produtos químicos ambientais, incluindo metais tóxicos, afim de torná-los menos reativos e de mais fácil eliminação (Ballatori e Clarkson, 1985; Carletti *et al.*, 2008). Além disso, ainda atuam na biossíntese de hormônios (prostaglandinas, esteróides e leucotrienos), degradação de tirosina e de peróxidos

(Hayes *et al.*, 2005). Existem, em organismos superiores, pelo menos cinco classes diferentes de GST (alfa, mu, pi, teta e zeta) (Strange *et al.*, 2000). Apresentam-se na forma ativa como dímeros, e cada subunidade possui um sítio catalítico independente, formado por um local de ligação da GSH (sítio G), conservado em todas as classes, e formado por um domínio do tipo tiorredoxina; e um sítio de ligação para o substrato hidrofóbico (sítio H), variável entre as classes, e que pode usar resíduos de tirosina, serina ou cisteína para a interação, dependendo da isoforma da enzima (Atkinson e Babbitt, 2009). O mercúrio interage diretamente com a GSH, assim como com a GST, podendo se ligar e levar a inibição enzimática em determinadas condições, como a baixa disponibilidade de glutationa; espécie de mercúrio, dose e duração; exposições a outros compostos reativos ou a grupos tiol (Dierickx, 1982; Goodrich e Basu, 2012). Também, as GSTs, estão entre os genes regulados de forma mais consistente pelo metilmercúrio, em ensaio *in vivo* com a espécie de peixe *Gadus morhua* (Yadetie *et al.*, 2013), foi encontrado que indivíduos expostos ao metilmercúrio apresentam *up-regulation* dos genes envolvidos na transcrição da GST das classes Mu e Pi. Almar e Dierickx, (1990), constataram que metais tóxicos interagem com a GST Pi por ligação direta a esta proteína, e que esta ligação poderia ter função protetora contra os metais tóxicos.

Já a glutationa peroxidase (GPx) (*EC 1.11.1.9*) é uma superfamília de enzimas antioxidantes que catalisam a redução de hidroperóxidos livres ou ligados a membrana (Yu, 1994). As proteínas dentro de GPx diferem entre si em estrutura, especificidade de substrato e localização celular (Margis *et al.*, 2008). A isoforma GPx4, encontrada neste estudo, contém SeCys, sua forma funcional é como monômero, e distribuí-se em compartimentos celulares como núcleo, citosol, mitocôndria, e aderido a membrana (Ursini *et al.*, 1985; Herbette *et al.*, 2007). O principal substrato para a GPx4 é o hidroperóxido de fosfolipídeo, o que indicaria um papel essencial desta enzima na contenção da peroxidação lipídica das biomembranas (Brigelius-Flohe, 2006). Os grupos selenol presentes nestas e outras selenoenzimas tem alta afinidade para compostos eletrofilicos fortes, como o mercúrio, quando comparados aos grupos tiol de outras proteínas (Sugiura *et al.*, 1976), por isso vários autores tem relacionado o mercúrio a ação inibitória da atividade enzimática da GPx, em diversos organismos (Diaconescu *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Branco *et al.*, 2012), assim como a redução da expressão de diferentes isoformas desta proteína (Zemolin *et al.*, 2012).

Ao que se refere a superóxido dismutase (SOD) (*EC 1.15.1.1*), é uma família de metaloenzimas responsáveis pela dismutação do radical superóxido à oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Ryan e Aust, 1992). A isoforma encontrada neste estudo necessita de cobre (Cu) e zinco (Zn) como cofator, é homodimérica, apresenta seis resíduos de histidina e uma ligação de aspartato ao Cu e Zn, que estão presentes na forma de dois átomos de cada por molécula (Tainer *et al.*, 1983). O Zn parece exercer papel estrutural na proteína, conferindo estabilidade, enquanto o Cu está diretamente envolvido no ciclo catalítico (Forman e Fridovich, 1973). Homma-Takeda *et al.* (1996), em estudo buscando a detecção direta de metaloproteínas ligadas ao mercúrio por meio da combinação de eletroforese unidimensional e análise de fluorescência de raio-X de radiação sincrotron, encontrou o metal firmemente ligado a SOD (Cu/Zn) e com a atividade enzimática drasticamente suprimida. Kumagai *et al.* (1996), em estudo *in vitro*, também encontraram inibição desta enzima, com alteração estrutural, ocasionada pela ligação covalente ao mercúrio e possível liberação dos íons Cu e Zn. Ainda, García-Sevillano *et al.* (2014b) encontraram redução nos níveis de SOD (Cu/Zn), após quantificação absoluta da enzima na fração citosólica e mitocondrial de células hepáticas de ratos expostos ao mercúrio por período de dez dias, indicando resposta fisiológica ao estresse oxidativo provocado por este metal.

A catalase (CAT) (*EC 1.11.1.6*) atua na degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular (O_2) (Clarkson e Magos, 2006). Apresenta-se na forma tetramérica, composta por quatro subunidades idênticas, com um grupo heme e NAPH no sítio ativo, sendo a estrutura e a forma como se conectam as subunidades essencial para o seu funcionamento (Scibior e Czeczot, 2006). Chen *et al.* (2015), estudaram a interação molecular do mercúrio inorgânico, Hg (II), com a CAT em condições fisiológicas simuladas. Os resultados indicaram que o mercúrio pode interagir com a CAT para formar um complexo por meio de forças eletrostáticas e de Van der Waals, e que dependendo da concentração, pode induzir diferentes alterações conformacionais na enzima, prejudicando assim sua atividade.

A aldeído desidrogenase é uma família de enzimas, dependentes de NAD(P)⁺, que têm o papel de catalisar a oxidação de vários aldeídos, alifáticos e aromáticos, eliminando aqueles tóxicos, derivados do metabolismo de xenobióticos e da peroxidação de lipídeos (Lin *et al.*, 1996; Vasiliou *et al.*, 2000). São consideradas

enzimas desintoxicantes do organismo, uma vez que altas concentrações de determinados aldeídos são potencialmente tóxicas, devido à sua extrema reatividade com compostos nucleofílicos presentes em vários compartimentos celulares (ácidos nucléicos, proteínas, lipídeos) (Marchitti *et al.*, 2008). A isoenzima desta família encontrada neste estudo é a aldeído desidrogenase da família 9 (ALDH9), também descrita como 4-trimetilaminobutiraldeído desidrogenase (*EC 1.2.1.47*), e ela está envolvida, especificadamente, na desidrogenação do gama-aminobutiraldeído em ácido gama-aminobutírico (GABA), também demonstrou-se recentemente estar envolvida na biossíntese da carnitina em via alternativa (Vasiliou *et al.*, 2000; Vaz *et al.*, 2000). ALDH9 apresenta-se como tetrâmero citosólico, com um resíduo de cisteína que atua como nucleófilo, que ataca o carbono carbonílico do aldeído para formar um intermediário. Um hidreto é então transferido para NAD(P)⁺ para produzir um intermediário tioacil-enzima (Zhao *et al.*, 2015). Tem sido sugerido que algumas ALDHs, como a ALDH3, podem desempenhar um papel crítico na manutenção do equilíbrio redox celular, por mecanismos como a captação de radicais hidroxila através dos grupos sulfidrila de resíduos de Cys e Met, ou pela contribuição através da geração de NADPH, contribuindo para a capacidade antioxidante da célula (NADPH está ligado à regeneração de glutationa reduzida) (Uma *et al.*, 1996; Vasiliou e Nebert, 2005). Embora não existam na literatura estudos a respeito da ligação do mercúrio especificadamente à ALDH9, por sua alta afinidade aos grupos sulfidrila, em hipótese, este metal tem o potencial de se ligar diretamente aos resíduos de cisteína presentes no sítio ativo desta enzima, podendo alterar assim sua capacidade catalítica.

O fator de aprimoramento de células *Natural killer* (NKEF), como o próprio nome sugere, é fator imunomodulador que aumenta a ação de células *Natural killer* (Shau e Golub, 1988), que por sua vez são componentes importantes na defesa imunitária do organismo. Além de aumentar a citotoxicidade, NKEF tem sido incluído na família de enzimas antioxidantas peroxiredoxina (Prx) (*EC 1.11.1.15*) (Zhang *et al.*, 2001), que estão amplamente distribuídas nos tecidos (Sauri *et al.*, 1995). Atuam no aumento da resistência celular ao dano oxidativo pelo peróxido de hidrogênio e grande variedade de hidroperóxidos orgânicos (ROOH), também protegem as células de metais tóxicos, como o metilmercúrio (Kim *et al.*, 1997). Existem três classes de Prxs: típicos 2 Cys, atípicos 2 Cys e 1 Cys, que possuem o mesmo mecanismo catalítico, no qual a

cisteína do sítio ativo, chamada de cisteína peroxidativa, é oxidada pelo substrato de peróxido à ácido sulfênico, a forma de reciclagem deste produto de volta a tiol é que difere as três classes (Wood *et al.*, 2003). A Prx humana se apresenta como dímero com dois domínios discretos, um N-terminal com dobra de tiorredoxina, e um C-terminal usado para a dimerização. O sítio ativo de cisteína fica em Cys 47, e aparentemente todas as Prxs conservam um resíduo de arginina em local ativo, que tem o papel de reduzir o pKa da cisteína peroxidativa, estabilizando assim sua forma de tiolato (Choi *et al.*, 1998). Yadetie *et al.* (2016), observaram a redução da abundância da peroxiredoxina-2 do proteoma hepático de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) exposto a metilmercúrio, provavelmente ocasionado pela oxidação induzida pelo mercúrio nos resíduos de cisteína desta enzima.

Na análise de atividade das enzimas envolvidas no sistema antioxidante, os resultados demonstraram, que embora se tratem de espécies diferentes, há tendência para maior atividade enzimática nos tecidos hepático e renal da espécie com maior concentração de mercúrio total nos tecidos, o *P. squamosissimus*. O mesmo ocorrendo para as concentrações de HPL (tabela 4). Somente a atividade da GPx no rim e da GST no fígado, foi inferior para esta espécie.

Tabela 4. Atividade enzimática e concentração de hidroperóxido de lipídeos e mercúrio total no tecido hepático e renal de *Plagioscion squamosissimus* e *Collossoma macropomum*.

Variável	Tecido	Espécie			
		Corvina	CV (%)	Tambaqui	CV (%)
GPx (nmol minuto mg ⁻¹ de proteína)	Hepático	13,54	5,67	5,51	6,67
	Renal	15,41	0,01	34,41	8,14
GST (nmol minuto mg ⁻¹ de proteína)	Hepático	93,48	6,60	110,37	4,89
	Renal	76,21	1,05	33,05	9,14
CAT (μmol minuto mg ⁻¹ de proteína)	Hepático	46,35	1,97	12,28	5,18
	Renal	40,27	5,79	30,02	4,26
SOD (U de SOD mg ⁻¹ de proteína)	Hepático	6,83	1,03	3,23	0,23
	Renal	5,93	0,21	4,86	1,05
HPL (μmol g ⁻¹ de tecido)	Hepático	0,38	8,86	0,17	6,98
	Renal	0,37	1,07	0,29	3,30
Hg Total (μg kg ⁻¹ de tecido)	Hepático	272,21	8,10	196,89	5,62
	Renal	112,03	1,32	87,01	6,06

Além da alta afinidade do mercúrio com os grupos tiol (R-S-H) das proteínas, também foi relatado grupos selenol (R-Se-H) como alvos críticos na mediação da toxicidade induzida por mercúrio (Branco *et al.*, 2012; García-Sevillano *et al.*, (2014a). Logo, selenoproteínas como a GPx (a selenoenzima mais abundante no organismo) podem ter sua atividade comprometida frente a exposição a este metal, conduzindo a aumento nos níveis celulares de H₂O₂ e HPL (Farina *et al.*, 2013). Já foi demonstrado acima, na análise de caracterização de proteínas, uma isoforma de GPx (GPx4) presente em um *spot* contendo mercúrio do proteoma renal de *P. squamosissimus*, o que pode ter ocasionado a menor atividade desta enzima. Cappello *et al.* (2016) e Brandão *et al.* (2015), em estudos com o peixe da espécie *L. aurata* provenientes do mesmo ambiente contaminado, em brânquias e fígado, respectivamente, constataram queda na atividade da GPx. Ghizoni *et al.* (2017), também relataram inibição da GPx em experimento *in vitro* com células endoteliais tratadas com baixas concentrações de MeHg, e que este evento precedeu a diminuição dos níveis de GHS. Um estudo *in vitro*, com células neuronais, tem demonstrado que a GPx parece ser afetada antes, pelo metilmercúrio em baixas doses, que outras proteínas contendo tiol (Farina *et al.*, 2009), e que a inibição foi direta e provavelmente relacionada a interação mercúrio-selenol (Farina *et al.*, 2011). No entanto, sabe-se que a ação de uma enzima antioxidante pode ser substituída pela atividade de outros antioxidantes (Bagnyukova *et al.*, 2005). Assim, a inibição de GPx poderia ser parcialmente compensada por aumento na atividade de CAT, pois ambas enzimas tem a mesma função no catabolismo do H₂O₂ (Powers *et al.*, 1999).

A GST, além de catalisar a ligação do mercúrio com a GSH para então transportá-lo para fora da célula, e ser excretado nas fezes e na urina (Ballatori, 2002), exibem também atividade de peroxidase em relação aos HPL (Brandão *et al.*, 2015). O Hg tem sido descrito como inibidor fraco da atividade da GST (Fu *et al.* 1991; Tuvikene *et al.*, 1999), porém seu papel na desintoxicação de xenobióticos o torna bom indicador da presença de contaminantes no ambiente. Foi identificada uma isoformas de GST no fígado do *P. squamosissimus* e *C. macropomum* (GST Mu), e outra no rim de *C. macropomum* (GST Pi). A atividade desta enzima, nestes órgãos, seguiu a mesma dinâmica da concentração de mercúrio nos *spots*, ou seja, GST do rim de *C. macropomum* > fígado de *P. squamosissimus* > fígado de *C. macropomum*. O *spot* de maior concentração de mercúrio, em comparação a todos os *spots* mapeados de ambas

espécies e tecidos, foi o da GST Pi, do tecido renal *C. macropomum* ($244,61 \mu\text{g g}^{-1}$ de Hg, tabela 3). Esta isoforma tem afinidade maior para se ligar diretamente ao mercúrio e promover sua eliminação (Almar e Dierickx, 1990).

P. squamosissimus demonstrou maiores atividades enzimáticas no fígado em relação ao rim, no entanto, o *C. macropomum* não demonstrou um padrão claro, apresentando maiores atividade e concentração de HPL no rim, com exceção apenas da GST que foi maior no fígado (tabela 4). Oliveira *et al.* (2008) declararam que a susceptibilidade ao estresse oxidativo de um determinado órgão depende de vários fatores, tais como a propensão para acumular os xenobióticos, os níveis basais específicos de antioxidantes, a capacidade de adaptação e ativação das defesas antioxidantes, e as taxas metabólicas do órgão.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia utilizada no fracionamento das proteínas (2D-PAGE) mostrou-se eficiente, separando com eficácia vasta quantidade de *spots* proteicos por gel e dos diferentes tecidos de cada espécie estudada. A espectrometria de absorção atômica em forno de grafite também demonstrou ser técnica robusta e permitiu quantificações do mercúrio total presente nas amostras de tecido, precipitados e *spots* proteicos.

Através das análises de quantificação do mercúrio, o presente estudo confirmou o fenômeno da biomagnificação deste elemento na cadeia trófica. Também foi possível definir um padrão de acúmulo deste metal maior para o fígado, seguido do rim e do músculo, para ambas as espécies estudadas.

Já a análise das enzimas envolvidas no sistema antioxidante demonstraram, que embora se tratem de espécies diferentes, há uma tendência para uma maior atividade enzimática nos tecidos hepático e renal da espécie com maior concentração de mercúrio total nos tecidos, o que reforça o papel do mercúrio na geração de espécies oxidativas e no possível desencadeamento do estresse oxidativo. E como as propriedades pró oxidantes deste metal são exacerbadas pelos seus efeitos inibitórios sobre processos antioxidantes, as enzimas relacionadas a proteção do organismo do estresse oxidativo podem ser interessantes candidatas a biomarcadores de toxicidade.

Também, partindo do pressuposto que os aspectos comuns entre organismos diferentes podem se acentuar a níveis mais baixos de organização, como ao nível molecular, proteínas como a Ubiquitina ribossomal S27a, que tem sido encontradas em *spots* contendo mercúrio, do proteoma de diferentes espécies de peixes amazônicos, ou ainda, enzimas como glutationa-S-transferase, proteínas FABP e hemoglobinas, que foram identificadas em ambas as espécies e tecidos estudados, se apresentam como opções interessantes de biomarcadores, uma vez que podem ser verificadas em mais de uma espécie de peixe do ambiente.

Algumas das proteínas encontradas associadas ao mercúrio neste estudo, e que possuem funções críticas em processos biológicos específicos, não tem relatos prévios de ligação com este metal e precisam ter seu papel no metabolismo e toxicidade elucidados. São necessários mais estudos para vincular a concentração de mercúrio presente no organismo e nos *spots* proteicos, contendo as proteínas caracterizadas, com as alterações moleculares, bioquímicas e fisiológica, e possíveis efeitos como o crescimento alterado, problemas reprodutivos e sobrevida. Também é preciso levantar possíveis mecanismos adaptativos desenvolvidos por organismos em condições de exposição crônica.

Por fim, os resultados do presente estudo contribuirão na compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à toxicidade ao mercúrio, além de fornecer novas perspectivas sobre possíveis candidatos a biomarcadores para o monitoramento ambiental aquático.

5. REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, M.; POZNAŃSKI, J.; KOPERA, E.; BAL, W. A zinc-finger like metal binding site in the nucleosome. **FEBS Letters**, v. 581, p. 1409-1416, 2007.
- AFSAR, S.; KAMBLE, B.S.; MALI, R.P. Lactate dehydrogenase post exposure recovery from Lead intoxicated freshwater fish *Anabas testudineus*. **International Journal of Basic and Applied**, v. 02, p. 101-105, 2012.
- ALMAR, M.M.; DIERICKX, P.J. *In vitro* interaction of mercury, copper (II) and cadmium with human glutathione transferase Pi. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 69, p. 99-102, 1990.
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 61-72, 2007.
- AYENSU, W.K.; TCHOUNWOU, P.B. Microarray Analysis of Mercury-Induced Changes in Gene Expression in Human Liver Carcinoma (HepG₂) Cells: Importance in Immune Responses. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 3, p. 141-173, 2006.
- ATKINSON, H.J.; BABBITT, P.C. Glutathione Transferases Are Structural and Functional Outliers in the Thioredoxin Fold. **Biochemistry**, v. 48, p. 11108-11116, 2009.
- AZEVEDO-SILVA, C.E.; ALMEIDA, R.; CARVALHO, D.P.; OMETTO, J.P.H.B.; CAMARGO, P.B.; DORNELES, P.R.; AZEREDO, A.; BASTOS, W.R.; MALM, O.; TORRES, J.P.M. Mercury biomagnification and the trophic structure of the ichthyofauna from a remote lake in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, v. 151, p. 286-296, 2016.
- BAGNYUKOVA, T.V.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, p. 335-341, 2005.
- BAIRD, C.; CANN, M. Metais, Solos, Sedimentos e Disposição de Resíduos. In: **Química Ambiental**. 4 Ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. p. 683-823.
- BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. Biliary secretion of glutathione and glutathione-metal complexes. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 5, p. 816-831, 1985.
- BALLATORI, N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 689-694, 2002.

BASAGLIA, F. Some aspects of isozymes of lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glucosephosphate isomerase in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 92, p. 213-226, 1989.

BASTOS, W.R.; GOMES, J.P.O.; OLIVEIRA, R.C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E.L.; LACERDA, L.D.; SILVEIRA, E.G.; PFEIFFER, W.C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 368, p. 344-351, 2006.

BASTOS, W.R.; DÓREA, J.G.; BERNARDI, J.V.E.; LAUTHARTTE, L.C.; MUSSY, M.H.; LACERDA, L.D.; MALM, O. Mercury in fish of the Madeira river (temporal and spatial assessment), Brazilian Amazon. **Environmental Research**, v. 140, p. 191-197, 2015.

BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 273-281, 2003.

BERG, K.; PUNTERVOLL, P.; VALDERSNES, S.; GOKSØYR, A. Responses in the brain proteome of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to methylmercury. **Aquatic Toxicology**, v. 100, p. 51-65, 2010.

BERRY, M.D.; BOULTON, A.A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and apoptosis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 60, p. 150-154, 2000.

BERNIER, I.; JOLLÈS, P. A survey on cytosolic non-enzymic proteins involved in the metabolism of lipophilic compounds: from organic anion binders to new protein families. **Biochimie**, v. 69, p. 1127-1152, 1987.

BERNTSEN, M.H.G.; AATLAND, A.; HANDY, R.D. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. **Aquatic Toxicology**, v. 65, p. 55-72, 2003.

BRAGA, C.P.; BITTARELLO, A.C.; PADILHA, C.C.F.; LEITE, A.L.; MORAES, P.M.; BUZALAF, M.A.R.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.M.. Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. **Talanta**, v. 132, p. 239-244, 2015.

BRANCO, V.; CANÁRIO, J.; LU, J.; HOLMGREN, A.; CARVALHO, C. Mercury and selenium interaction in vivo: effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, p. 781-793, 2012.

BRANDÃO, F.; CAPPELLO, T.; RAIMUNDO, J.; SANTOS, M.A.; MAISANO, M.; MAUCERI, A.; PACHECO, M.; PEREIRA, P. Unravelling the mechanisms of mercury hepatotoxicity in wild fish (*Liza aurata*) through a triad approach: bioaccumulation, metabolomic profiles and oxidative stress. **Metallomics**, v. 7, p. 1352-1363, 2015.

BREWER J. M. AND ELLIS P. D. ³¹P-NMR studies of the effect of various metals on substrate binding to yeast enolase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 18, p. 71-82, 1983.

BREWER, J.M. Specificity and mechanism of action of metal ions in yeast enolase. **FEBS Letters**, v. 182, p. 8-14, 1985.

BRIGELIUS-FLOHE, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 387, p. 1329-1335, 2006.

BUELTER, M.K.; BERNLOHR, D.A. Modification of the Adipocyte Lipid Binding Protein by Sulfhydryl Reagents and Analysis of the Fatty Acid Binding Domain. **Biochemistry**, v. 29, p. 7408-7413, 1990.

BURGER, A.M.; SETH, A.K. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 2217-2229, 2004.

CAJARAVILLE, M.P.; HAUSER, L.; CARVALHO, G.; HYLLAND, K.; OLABARRIETA, I.; LAWRENCE, A.J.; LOWE, D.; GOKSØYR, A. Genetic Damage and the Molecular/Cellular Response to Pollution. In: Lawrence, A.J.; Hemingway, K.L. [Ed.] **Effects of pollution on fish: molecular effects and population responses**. Oxford: Blackwell Science Ltda Blackwell Publishing Company, 2003. p. 14-62.

CCAC, CANADIAN COUNCIL OF ANIMAL CARE. **CCAC Guidelines on:** the care and use of fish in research, teaching and testing. Canadá, 2005. 87 p. Disponível em: <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>. [Acesso em: 10/02/2015].

CAPPELLO, T.; BRANDÃO, F.; GUILHERME, S.; SANTOS, M.A.; MAÍSANO, M.; MAUCERI, A.; CANÁRIO, J.; PACHECO, M.; PEREIRA, P. Insights into the mechanisms underlying mercury-induced oxidative stress in gills of wild fish (*Liza aurata*) combining ¹H NMR metabolomics and conventional biochemical assays. **Science of The Total Environment**, v. 548–549, p. 13-24, 2016.

CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BOCCIARELLI, T.; BOCCIO, P.D.; FEDERICI, L.; DI ILIO, C. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v. 90, p. 48-57, 2008.

CARVALHO, C.M.L.; CHEW, E.; HASHEMY, S.I.; LU, J.; HOLMGREN, A. Inhibition of the Human Thioredoxin System: A molecular mechanism of mercury toxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 11913-11923, 2008.

CHEN, L.; ZHANG, J.; ZHU, Y.; ZHANG, Y. Molecular interaction of inorganic mercury(II) with catalase: a spectroscopic study in combination with molecular docking. **RSC Advances**, v. 5, p. 79874-79881, 2015.

CHOI, H.J.; KANG, S.W.; YANG, C.H.; RHEE, S.G.; RYU, S.E. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. **Nature Structure Biology**, v. 5, p. 400-406, 1998.

CLARKSON, T.W. The Three Modern Faces of Mercury. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 11-23, 2002.

CLARKSON, T.W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, p. 609-662, 2006.

CONCEA, CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA**. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2015. 54 p. Disponível em: <www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238014.doc>. [Acesso em: 10/02/2015].

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3674-3676, 2005.

CRAIG, N.; LI, H.; LIU, J-P. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, p. 674-679, 2012.

DI SABATO, G.; KAPLAN, N.O. The Role of the Sulphydryl Groups of Lactic Dehydrogenases. **Biochemistry**, v. 2, p. 776-781, 1963.

DIACONESCU, C.; URDES, L.; MARIUS, H.; IANITCHI, D.; POPA, D. The influence of heavy metal content on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the fish meat originated from different areas of Danube river. **Roumanian Biotechnological Letters**, v. 13, p. 3859-3862, 2008.

DIERICKX PJ. *In vitro* inhibition of the soluble glutathione S-transferases from rat liver by heavy metals. **Enzyme**, v. 27, p. 25-32, 1982.

DOUMAS, B.T.; BAYSE, D.B.; BORNER, K.; CARTER, R.J.; ELEVITCH, F.; GARBER, C.C.; GRABY, R.A.; HAUSE, L.L.; MATHER, A.; PETERS, T.JR.; RAND, R.N.; REEDER, D.J.; RUSSELL, S.M.; CHAFFER, R.; WESTGARD, J.O. A candidate reference method for determination of total protein in serum. II. Test for transferability. **Clinical Chemistry**, v. 27, p. 1651-1654, 1981.

DUTCZAK, W.J.; BALLATORI, N. Transport of the glutathionemethyl mercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 9746-9751, 1994.

EBRALIDSE, K.K.; GRACHEV, S.A.; MIRZABEKOV, A.D. A highly basic histone H4 domain bound to the sharply bent region of nucleosomal DNA. **Nature**, v. 331 (615), p. 365-367, 1988.

FALINI, G.; FERMANI, S.; TOSI, G.; ARNESANO, F.; NATILE, G. Structural probing of Zn (II), Cd (II) and Hg (II) binding to human ubiquitin. **Chemical Communications**, i. 45, p. 5960-5962, 2008.

FARINA, M.; CAMPOS, F.; VENDRELL, I.; BERENGUER, J.; BARZI, M.; PONS, S.; SUÑOL, C. Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. **Toxicological sciences**, v. 112, p. 416-426, 2009.

FARINA, M.; AVILA, D.S.; ROCHA, J.B.T.; ASCHNER, M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 575-594, 2013.

FEARNSIDE, P.M. Impacts of Brazil's Madeira River Dams: Unlearned lessons for hydroelectric development in Amazonia. **Environmental Science & Policy**, v. 38, p. 164-172, 2014.

FILAZI, A.; BASKAYA, R.; KUM, C.; HISMIOGULLARI, S.E. Metal concentration in tissues of the Black sea fish *Mugil auratus* from Sinop-Icliman, Turkey. **Human and Experimental Toxicology**, v. 22, p. 85-87, 2003.

FINLEY, D.; BARTEL, B.; VARSHAVSKY, A. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. **Nature**, v. 338, p. 394-401, 1989.

FLOHE, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FORMAN, H.J.; FRIDOVICH, I. On the Stability of Bovine Superoxide Dismutase: The effects of metals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p. 2645-2649, 1973.

FRANCO, J.L.; POSSER, T.; DUNKLEY, P.R.; DICKSON, P.W.; MATTOS, J.J.; MARTINS, R.; BAINY, A.C.; MARQUES, M.R.; DAFRE, A.L.; FARINA, M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 449-457, 2009.

FU, J.H.; ROSE, J.; CHUNG, Y.J.; TAM, M.F.; WANG, B.C. Crystals of isoenzyme 3-3 of rat liver glutathione-S-transferase with and without inhibitor. **Acta Crystallographica Section B**, v. 47, p. 813-814, 1991.

GARCÍA-SEVILLANO, M.A.; GARCÍA-BARRERA, T.; NAVARRO, F.; GAILER, J.; GÓMEZ-ARIZA, J.L. Use of elemental and molecular-mass spectrometry to assess the toxicological effects of inorganic mercury in the mouse *Mus musculus*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 5853-5865, 2014^a.

GARCÍA-SEVILLANO, M.A.; GARCÍA-BARRERA, T.; NAVARRO, F.; GÓMEZ-ARIZA, J.L. Absolute quantification of superoxide dismutase in cytosol and

mitochondria of mice hepatic cells exposed to mercury by a novel metallomic approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 842, p. 42-50, 2014^b.

GHIZONI, H.; SOUZA, V.; STRALIOTTO, M.R.; BEM, A.F.; FARINA, M.; HORT, M.A. Superoxide anion generation and oxidative stress in methylmercury-induced endothelial toxicity *in vitro*. **Toxicology In Vitro**, v. 38, p. 19-26, 2017.

GILLES, A.M.; PRESECAN, E.; VONICA, A.; LASCU, I. Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains responsible for heterogeneity of the hexameric enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 8784-8789, 1991.

GOODRICH, J.M.; BASU, N. Variants of glutathione s-transferase pi 1 exhibit differential enzymatic activity and inhibition by heavy metals. **Toxicology In Vitro**, v. 26, p. 630-635, 2012.

GOWARD, C.R.; NICHOLLS, D.J. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. **Protein Science**, v. 3, p. 1883-1888, 1994.

GUHA, A.; ENGLARD, S.; LISTOWSKY, I. Beef Heart Malic Dehydrogenases: VII. Reactivity of sulfhydryl groups and conformation of the supernatant enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 609-615, 1968.

HAKE, S.B.; ALLIS, C.D. Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: The “H3 barcode hypothesis”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, p. 6428-6435, 2006.

HARRIS, J.I.; WATERS, M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. P.D. Boyer (Ed.). **The Enzymes** (3 Ed.). Academic Press: New York, p. 1-49, 1976.

HAUER, C.R.; REBRINE, I.; THONY, B.; NEUHEISERS, F.; CURTIUS, H.; HUNZIKERLL, P.; BLAUS, N.; GHISLAJJ, S.; HEIZMANN, C.W. Phenylalanine Hydroxylase-stimulating Protein/Pterin-4acarbinolamine Dehydratase from Rat and Human Liver: Purification, characterization, and complete amino acid sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 4828-4831, 1993.

HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 51-88, 2005.

HERBETTE, S.; ROECKEL-DREVET, P.; DREVET, J.R. Seleno-independent glutathione peroxidases: More than simple antioxidant scavengers. **The FEBS Journal**, v. 274, p. 2163-2180, 2007.

HOMMA-TAKEDA, S.; SHINYASHIKI, M.; NAKAI, I.; TOHYAMA, C.; KUMAGAI, Y.; SHIMOJO, N. Direct detection of mercury-bound metalloproteins (metallothionein and Cu,Zn-superoxide dismutase) using a combination of gel electrophoresis and one dimensional synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis. **Analytical Letters**, v. 29, p.601-611, 1996.

HONG, L.; SCHROTH, G.P.; MATTHEWS, H.R.; YAU, P.; BRADBURY, E.M. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 305-314, 1993.

HSU, H.H.; KUO, W.W.; JU, D.T.; YEH, Y.L.; TU, C.C.; TSAI, Y.L.; SHEN, C.Y.; CHANG, S.H.; CHUNG, L.C.; HUANG, C.Y. Estradiol agonists inhibit human LoVo colorectal-cancer cell proliferation and migration through p53. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, p. 16665-16673, 2014.

JAN, A.T.; AZAM, M.; SIDDIQUI, K.; ALI, A.; CHOI, I.; RIZWANUL HAQ, Q.M. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. **International Journal of Molecular Science**, v. 16, p. 29592-29630, 2015.

JIANG, Z.Y.; WOOLARD, A.C.S.; WOLF, S.P. Lipid hydroperoxidaes measurement by oxidation of Fe²⁺ in the of xylenol orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. **Lipids**, n. 10, v.24, p. 861-869, 1991.

JOHNEN, G.; KAUFMAN, S. Studies on the enzymatic and transcriptional activity of the dimerization cofactor for hepatocyte nuclear factor 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 94, p. 13469-13474, 1997.

KAUFMAN, S. A protein that stimulates rat liver phenylalanine hydroxylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, p. 4751-4759, 1970.

KIM, A.T.; SARAFIAN, T.A.; SHAU, H. Characterization of antioxidant properties of natural killer-enhancing factor-B and induction of its expression by hydrogen peroxide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 147, p. 135-142, 1997.

KROON, F.; STRETN, C.; HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. **PLOS ONE**, v. 12, e0174762, 2017.

KUMAGAI, Y.; URANAKA, R.; MIZUKADO, S.; HOMMA-TAKEDA, S.; SHIMOJO, N. Oxidative Modification of Cu,Zn-Superoxide Dismutase by Mercury Compounds and Mechanism for the Metal-Promoted Enzyme Inhibition. **Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 42, p. 26, 1996.

KUMAR, S.; SHEOKAND, N.; MHADESHWAR, M.A.; RAJE, C.I.; RAJE, M. Characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel transferrin receptor. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, p. 189-199, 2012.

LACERDA, L. D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, 2008.

LACERDA, L.D.; RIBERIO, M.G.; SOUZA, M. The effects of land use change on mercury distribution in soils of Alta Floresta, Southern Amazon. **Environmental Pollution**, v. 129, p. 247-255, 2004.

LASCU, L.; GIARTOSIO, A.; RANSAC, S.; ERENT, M. Quaternary structure of nucleoside diphosphate kinases. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 32, p. 227-236, 2000.

LECHLER, P.J.; MILLER, J.R.; LACERDA, L.D.; VINSON, D.; BONZONGO, J.C.; LYONS, W.B.; WARWICK, J.J. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? **Science of the Total Environment**, v. 260, p. 87-96, 2000.

LIN, C.S.; CHEN, J.C.; HSU, L.C.; HSIEH, C.; YOSHIDA, A. Human γ -Aminobutyraldehyde Dehydrogenase (ALDH9): cDNA Sequence, Genomic Organization, Polymorphism, Chromosomal Localization, and Tissue Expression. **Genomics**, v. 34, p. 376-380, 1996.

LUGER, K.; MADER, A.W.; RICHMOND, R.K.; SARGENT, D.F.; RICHMOND, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, p. 251-260, 1997.

MALM, O.; CASTRO, M.B.; BASTOS, W.R.; BRANCHES, F.P.J.; GUIMARÃES, J. R.D.; ZUFFO, C.E.; PFEIFFER, W.C. An assessment of Hg pollution in different gold mining areas, Amazon Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 175, p. 127-140, 1995.

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

MARCHITTI, S.A.; BROCKER, C.; STAGOS, D.; VASILIOU, V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, p. 697-720, 2008.

MARIJIĆ, V.F.; RASPOR, B. Metal exposure assessment in native fish, *Mullus barbatus* L., from the Eastern Adriatic Sea. **Toxicology Letters**, v. 168, p. 292-301, 2007.

MARGIS, R.; DUNAND, C.; TEIXEIRA, F.K.; MARGIS-PINHEIRO, M. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. **The FEBS Journal**, v. 275, p. 3959-3970, 2008.

MAURICE-BOURGOIN, L.; QUIROGA, I.; CHINCHEROS, J. COURAU, P. Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira rivers and mercury exposure in riparian Amazonian populations. **Science of The Total Environment**, v. 260, p. 73-86, 2000.

MIEIRO, C.L.; PACHECO, M.; PEREIRA, M.E.; DUARTE, A.C. Mercury distribution in key tissues of fish (*Liza aurata*) inhabiting a contaminated estuary - implications for human and ecosystem health risk assessment. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 11, p. 1004-1012, 2009.

MOORE, M.S.; BLOBEL, G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. **Nature**, v. 365, p. 661-663, 1993.

MORAES, P.M.; SANTOS, F.A.; PADILHA, C.C.F.; VIEIRA, J.C.S.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.M. A preliminary and qualitative metallomics study of mercury in the muscle of fish from Amazonas, Brazil. **Biological Trace Element Research**, v. 150, n. 1-3, p. 195-199, 2012.

NAVARRO A.; QUIRÓS, L.; CASADO, M.; FARIA, M.; CARRASCO, L.; BENEJAM, L.; BENITO, J.; DÍEZ, S.; RALDÚA, D.; BARATA, C.; BAYONA, J.M.; PIÑA, B. Physiological responses to mercury in feral carp populations inhabiting the low Ebro River (NE Spain), a historically contaminated site. **Aquatic Toxicology**, n. 993, p. 150-157, 2009.

NILSSON, J.; WEIS, K.; KJEMS, J. The C-Terminal Extension of the Small GTPase Ran is Essential for Defining the GDP-Bound Form. **Journal of Molecular Biology**, v. 318, p. 583-593, 2002.

OCKNER, R.K. Historic overview of studies on fatty acid-binding proteins. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 98, p. 3-9, 1990.

OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. **Science of The Total Environment**, v. 396, p. 70-78, 2008.

PANCHOLI, V. Multifunctional α -enolase: Its role in diseases. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 902-920, 2001.

PFEIFFER, W.C.; MALM, O.; SOUZA, C.M.M.; LACERDA, L.D.; SILVEIRA, E.G.; BASTOS, W.R. Mercury in the Madeira River ecosystem, Rondônia, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 38, p. 239-245, 1991.

POWERS, S.K.; JI, L.L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 31, p. 987-97, 1999.

RALSER,M.; WAMELINK, M.M.; KOWALD, A.; GERISCH, B.; HEEREN, G.; STRUYS, E.A.; KLIPP, E.; JAKOBS, C.; BREITENBACH, M.; LEHRACH, H.; KROBITSCH, S. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. **Journal of Biology**, v. 6:10, 2007.

RAMAKRISHNAN, V.; WHITE, S.W. Ribosomal protein structures: insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 23, p.208-212, 1998.

READ, J.A.; WINTER, V.J.; ESZES, C.M.; SESSIONS, R.B.; BRADY, R.L. Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. **Proteins**, v. 43, p. 175-185, 2001.

REED, G.H.; POYNER, R.R.; LARSEN, T.M.; WEDEKIND, J.E.; RAYMENT, I. Structural and mechanistic studies of enolase. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, p. 736-743, 1996.

RIBEIRO, C.A.O.; ROULEAU, C.; PELLETIER, E.; AUDET, C.; TJÄLVE, H. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 902-907, 1999.

ROSS, C.A.; PICKART, C.M. The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. **Trends in Cell Biology**, v. 14, p. 703-711, 2004.

ROULET, M.; LUCOTTE, M. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferrallitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 80, p. 1079-1088, 1995.

RYAN, T. P.; AUST, S. D. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, p. 119-141, 1992.

SAMPAIO DA SILVA, D.; LUCOTTE, M.; PAQUET, S.; DAVIDSON, R. Influence of ecological factors and of land use on mercury levels in fish in the Tapajós River basin, Amazon. **Environmental Research**, v. 109, p. 432-446, 2009.

SARAFIAN, T.A. Methylmercury-induced generation of free radical: biological implications. **Metal Ions in Biological Systems**, p. 36, p. 415-444, 1999.

SAURI, H.; BUTTERFIELD, L.; KIM, A.; SHAU, H. Antioxidant function of recombinant human natural killer enhancing factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 208, p. 964-969, 1995.

SAZER, S. The search for the primary function of the Ran GTPase continues. **Trends Cell Biology**, v. 6, p. 81-85, 1996.

SAZER, S.; DASSO, M. The ran decathlon: multiple roles of Ran. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 1111-1118, 2000.

SCHEFFZEK, K.; AHMADIAN, MR. GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 3014-3038, 2005.

SCHURZ, F.; SABATER-VILAR, M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defense: the role of metal-binding proteins. **Mutagenesis**, v. 15, p. 525-530, 2000.

SCIBIOR, D.; CZECZOT, H .Catalase: structure, properties, functions. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 60, p. 170-80, 2006.

SHAU, H.; GOLUB, S.H. Modulation of natural killer-mediated lysis by red blood cells. **Cellular Immunology**, v. 116, p. 60-72, 1988.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, 1, p. 2856-2860, 2006.

SIROVER, M.A. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1432, p. 159-184, 1999.

SKILLETER, D.N.; LEE, N.M.; KUN, E. Malate dehydrogenase of Ox kidney. Comparison of the reactivity of sulphydryl groups and their relationship to activities of the mitochondrial and cytoplasmic enzymes. **European Journal of Biochemistry**, v. 12, p. 533-539, 1970.

STORCH, J.; CORSICO, B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. **Annual Review of Nutrition**, v. 28, p. 73-95, 2008.

STRANDMANN, E.P.V.; SENKEL, S.; RYFFEL, G.; HENGGE, U.R. Dimerization Co-Factor of Hepatocyte Nuclear Factor 1/Pterin-4 α -Carbinolamine Dehydratase Is Necessary for Pigmentation in Xenopus and Overexpressed in Primary Human Melanoma Lesions. **The American Journal of Pathology**, v. 158, p. 2021-2029, 2001.

STRANGE, R.C.; JONES, P.W.; FRYER, A.A. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. **Toxicology Letters**, v. 112–113, p. 357-363, 2000.

SUGIURA, Y.; HOJO, Y.; TAMAI, Y.; TANAKA, H. Letter: selenium protection against mercury toxicity. binding of methylmercury by the selenohydryl-containing ligand. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, p. 2339-2341, 1976.

SYVERSEN, T.; KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, p. 215-226, 2012.

TAINER, J.A.; GETZOFF, E.D.; RICHARDSON, J.S.; RICHARDSON, D.C. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. **Nature**, v. 306, p. 284-287, 1983.

TAKÁCS-VELLAI, K.; VELLAI, T.; FARKAS, Z.; MEHTA, A. Nucleoside diphosphate kinases (NDPKs) in animal development. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 1447-1462, 2015.

TAKAI, Y.; SASAKI, T.; MATOZAKI, T. Small GTP-binding proteins. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 153-208, 2001.

THÖNY, B.; NEUHEISER, F.; KIERAT, L.; BLASKOVICS, M.; ARN, P.H.; FERREIRA, P.; REBRIN, I.; AYLING, J.; BLAU, N. Hyperphenylalaninemia with high levels of 7-biopterin is associated with mutations in the PCBD gene encoding the bifunctional protein pterin-4 α -carbinolamine dehydratase and transcriptional coactivator (DCoH). **The American Journal of Human Genetics**, v. 62, p. 1302-1311, 1998.

THÖNY, B.; AUERBACH, G.; BLAU, N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. **Biochemical Journal**, v. 347, p. 1-16, 2000.

TUVIKENE, A.; HUUSKONEN, S.; KOPONEN, K.; RITOLA, O.; MAUER, Ü.; LINDSTRÖM-SEPPÄ, P. Oil shale processing as a source of aquatic pollution: monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. **Environmental Health Perspective**, v. 107, p. 745-752, 1999.

UMA, L.; HARIHARAN, J.; SHARMA, Y.; BALASUBRAMANIAN, D. Corneal aldehyde dehydrogenase displays antioxidant properties. **Experimental Eye Research**, v. 63, p. 117-120, 1996.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; GREGOLIN, C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 839, p. 62-70, 1985.

VASILIOU, V.; NEBERT, D.W. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. **Human Genomics**, v. 2, p. 138-143, 2005.

VASILIOU, V.; PAPPA, A.; PETERSEN, D.R. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 1-19, 2000.

VAZ, F.M.; FOUCHIER, S.W.; OFMAN, R.; SOMMER, M.; WANDERS, R.J.A. Molecular and Biochemical Characterization of Rat γ -Trimethylaminobutyraldehyde Dehydrogenase and Evidence for the Involvement of Human Aldehyde Dehydrogenase 9 in Carnitine Biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 7390-7394, 2000.

VIDANES, G.M.; BONILLA, C.Y.; TOCZYSKI, D.P.. Complicated tails: histone modifications and the DNA damage response. **Cell**, v. 121, p. 973-976, 2005.

VIEIRA, J.C.S.; BRAGA, C.P.; OLIVEIRA, G.; LEITE, A.L.; QUEIROZ, J.V.; CAVECCI, B.; BITTARELLO, A.C.; BUZALAF, M.A.R.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.M. Identification of protein biomarkers of mercury toxicity in fish. **Environmental Chemistry Letter**, p. 1-8, 2017.

VIEIRA, J.C.S.; CAVECCI, B.; QUEIROZ, J.V.; BRAGA, C.P.; PADILHA, C.C.F.; LEITE, A.L.; FIGUEIREDO, W.S.; BUZALAF, M.A.R.; ZARA, L.F.; PADILHA,

P.M. Determination of the Mercury Fraction Linked to Protein of Muscle and Liver Tissue of Tucunaré, (*Cichla* spp.) from the Amazon Region of Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, n. 4, p. 422-430, 2015.

WAI, I.; CHONG, K.; HO, W.S. Influence of heavy metals on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interactions in *Chironomus riparius* larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, p. 1882-1887, 2013.

WANG, M.; WANG, Y.; ZHANG, L.; WANG, J.; HONG, H.; WANG, D. Quantitative proteomic analysis reveals the mode-of-action for chronic mercury hepatotoxicity to marine medaka (*Oryzias melastigma*). **Aquatic Toxicology**, v. 130-131, p. 123-131, 2013.

WANG, G.; BONKOVSKY, H.L.; LEMOS, A.; BURCZYNSKI, F.J. Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. **The Journal of Lipid Research**, v. 56, p. 2238-2247, 2015.

WEISSMAN, A.M. Themes and variations on ubiquitylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 169-78, 2001.

WILLIAMS, R.L.; OREN, D.A.; MUÑOZ-DORADO, J.; INOUYE, S.; INOUYE M.; ARNOLD, E. Crystal structure of *Myxococcus xanthus* nucleoside diphosphate kinase and its interaction with a nucleotide substrate at 2.0 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, p. 1230-1247, 1993.

WILTON, D.C. Studies on fatty-acid-binding proteins. The purification of rat liver fatty-acid-binding protein and the role of cysteine-69 in fatty acid binding. **Biochemical Journal**, v. 261, p. 273-276, 1989.

WOOD, Z.A.; SCHRÖDER, E.; HARRIS, J.R.; POOLE, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, p. 32-40, 2003.

WOENCKHAUS, C.; DUCHMANN, H. Reactions of Essential Sulphydryl Residues of Dehydrogenases with Nicotinamide-(S-Methylmercury-Thioinosine) Dinucleotide. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 30, p. 562- 564, 1975.

WOLF, M.B.; BAYNES, J.W. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. **BioMetals**, v. 20, p. 73-81, 2007.

YADETIE, F.; BJØRNKELETT, S.; GARBERG, H.K.; OVELAND, E.; BERVEN, F.; GOKSØYR, A.; KARLSEN, O.A. Quantitative analyses of the hepatic proteome of methylmercury-exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*) suggest oxidative stress-mediated effects on cellular energy metabolism. **BMC Genomics**, v. 17:554, 2016.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 139-162, 1994.

ZEMOLIN, A.P.P.; MEINERZ, D.F.; PAULA, M.T.; MARIANO, D.O.C.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, A.B.; POSSER, T.; FRANCO, J.L. Evidences for a role of glutathione peroxidase 4 (GPx4) in methylmercury induced neurotoxicity *in vivo*. **Toxicology**, v. 302, p. 60-67, 2012.

ZHANG, H.; EVENHUIS, J.P.; THORGAARD, G.H.; RISTOW, S.S. Cloning, characterization and genomic structure of the natural killer cell enhancement factor (NKEF)-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, p. 25-35, 2001.

ZHAO, C.; WANG, D.; FENG, B.; GOU, M.; LIU, X.; LI, Q. Identification and characterization of aldehyde dehydrogenase 9 from *Lampetra japonica* and its protective role against cytotoxicity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 187, p. 102-109, 2015.

CAPÍTULO III

Biomarcadores moleculares da toxicidade do mercúrio no tecido muscular de peixes Amazônicos

BIOMARCADORES MOLECULARES DA TOXICIDADE DO MERCÚRIO NO TECIDO MUSCULAR DE PEIXES AMAZÔNICOS

RESUMO

O mercúrio tem a capacidade de se ligar a uma variedade de biomoléculas, podendo comprometer sua estrutura e funcionalidade, promovendo assim seus efeitos tóxicos. O objetivo deste estudo foi encontrar e avaliar possíveis biomarcadores proteicos da contaminação de mercúrio em peixes da região amazônica. O tecido muscular de duas espécies de peixes do rio Madeira, coletadas na área de influência da usina hidrelétrica de Jirau-RO, foi avaliado por meio do fracionamento de proteínas por eletroforese bidimensional e do mapeamento do mercúrio nos *spots* proteicos por GFAAS. A análise dos *spots* protéicos contendo mercúrio foi feita por meio da espectrometria de massas. Os resultados obtidos demonstram que as maiores concentrações de mercúrio total foram encontradas na espécie carnívora (*P. squamosissimus*). As concentrações de mercúrio determinadas nos precipitados proteicos demonstraram que, em média, 81% do mercúrio presente nos tecidos está associado as proteínas. Foram identificadas proteínas em dez *spots* do tecido muscular das espécies estudadas (três de *P. squamosissimus* e sete de *C. macropomum*). A fosfoglicerato mutase 2 (*P. squamosissimus*), a hemoglobina β e o citocromo P450scc (*C. macropomum*) apresentaram os maior valores de concentração de mercúrio por grama de proteína contida no *spot*, e podem ser consideradas possíveis biomarcadores da toxicidade do mercúrio.

Palavras-chave: Bioacumulação, espécies mercuriais, 2D PAGE, xenobiótico.

MOLECULAR BIOMARKERS OF MERCURY TOXICITY IN MUSCULAR TISSUE OF AMAZON FISHES

ABSTRACT

Mercury has the ability to bind to a variety of biomolecules, which can compromise its structure and functionality, thus promoting its toxic effects. The objective of this study was to find and evaluate possible biomarker proteins of mercury contamination in fish from the Amazon region. The muscle tissue of two species of fish from the Madeira river, collected in the area of influence of the Jirau-RO hydroelectric power plant, were evaluated through the fractionation of proteins by two-dimensional electrophoresis and mapping of mercury in protein spots by GFAAS. The analysis of the protein spots containing mercury was done by means of mass spectrometry. The results obtained demonstrate that the highest concentrations of total mercury were found in the carnivorous specie (*P. squamosissimus*). Mercury concentrations determined on protein precipitates have shown that, on average, 81% of the mercury in tissues is associated with proteins. Proteins were identified in ten spots of the muscular tissue of the species studied (three of *P. squamosissimus* and seven of *C. macropomum*). Phosphoglycerate mutase 2 (*P. squamosissimus*), hemoglobin β and cytochrome P450scc (*C. macropomum*) showed the highest values of mercury concentration per gram of protein contained in the spot, and may be considered possible biomarkers of mercury toxicity.

Key words: Bioaccumulation, mercurial species, 2D PAGE, xenobiotic.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação por mercúrio é de preocupação global, devido ao poder de difusão deste metal no ambiente e de seu complexo ciclo biogeoquímico. A região amazônica, rica em diversidade de fauna e flora, e extremamente abundante em cursos d'água, passou por intensa extração de ouro nas décadas de 1980 e 1990 (Malm, 1998) o que culminou com a liberação de grandes quantidades de mercúrio para o ambiente, proveniente do processo de amalgamação. Desde então, diversos estudos foram e tem sido conduzidos com intuito de mensurar a concentração de mercúrio na biota aquática nesta região, bem como em relação ao potencial bioacumulativo e biomagnificador deste elemento (Pfeiffer *et al.*, 1991; Malm *et al.*, 1995; Malm, 1998; Maurice-Bourgoin *et al.*, 2000; Lechler *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2006; Lacerda e Malm, 2008; Sampaio da Silva *et al.*, 2009; Bastos *et al.*, 2015; Azevedo-Silva *et al.*, 2016).

Aliado a problemática da mineração, estudos tem ainda apontado para processos naturais, como a solubilização de rochas contendo mercúrio, lixiviação de solos naturalmente ricos neste elemento e emissões vulcânicas, como contribuidores no aporte deste metal aos ambientes aquáticos e consequentemente à sua biota. Muitos solos da Amazônia são naturalmente ricos em mercúrio, que acaba sendo liberado no sistema fluvial (Roulet *et al.*, 1999; Fadini e Jardim, 2001). Outro fator que passou a chamar atenção, em relação aos rios amazônicos, são os empreendimentos hidrelétricos que estão sendo instalados. A mudança drástica na dinâmica do fluxo de água, bem como outras transformações biogeoquímicas decorridas em função da construção desses barramentos, podem interferir no ciclo do mercúrio, facilitando processos de metilação (Fearnside, 2014).

A forma metilada do mercúrio tem alta afinidade como os grupamentos sulfidrila e hidroxila das proteínas (Schurz *et al.*, 2000), além de lipossolubilidade, que lhe confere difusão facilitada pelas membranas celulares, possibilitando fácil absorção e acumulação no organismo (Baird e Cann, 2011). Esta forma de mercúrio, tem elevada taxa de captação e baixas taxas de eliminação, ou seja, tem característica de bioacumulação, e atinge altas concentrações em níveis tróficos elevados, apresentando-se em maior concentração em espécies predadoras, processo conhecido como biomagnificação (Malm, 1998; Bastos *et al.*, 2006; Azevedo-Silva *et al.*, 2016).

O músculo do peixe parece estar ativamente envolvido na acumulação do metilmercúrio, em preterimento a outros metais tóxicos, devido em grande parte a alta afinidade apresentada por este composto com as proteínas que contém aminoácidos sulfurados presentes em abundância neste tecido (Uysal *et al.*, 2008). Uma vez que esta é normalmente a parte destinada ao consumo humano, muitos estudos relatam os níveis de metais no tecido muscular, especialmente em peixes de regiões contaminadas (Porvari, 1995; Durrieu *et al.*, 2005; Kehrig *et al.*, 2008), a fim de avaliar se os níveis aceitáveis à saúde humana não são excedidos.

Embora os níveis deste e outros contaminantes sejam muitas vezes baixos no ambiente, não se pode evitar a exposição crônica. E ainda há muito a ser elucidado sobre os mecanismos pelos quais o mercúrio interage e interfere com os processos bioquímicos do organismo. Logo, o objetivo deste estudo foi mensurar a concentração de mercúrio total no tecido muscular de duas espécies de peixes amazônicos, bem como mapear o proteoma, obtido por eletroforese bidimensional (2D-PAGE), à procura de *spots* proteicos contendo mercúrio. Tais *spots* foram então caracterizados por espectrometria de massas (ESI-MS/MS) na tentativa de elucidar mecanismos e respostas a contaminação, e de integrar dados de acumulação e toxicidade, apontando para possíveis biomarcadores que indiquem alterações precoces do estado fisiológico e de higidez destes organismos.

As espécies alvo para esta pesquisa foram o *Plagioscion squamosissimus* (carnívoro), conhecido popularmente por corvina, e o *Colossoma macropomum* (onívoro), conhecido como tambaqui, de posições distintas na cadeia trófica, e capturados no rio Madeira, sob a área de influência da Usina Hidrelétrica de Jirau-RO. A região do rio Madeira foi a segunda área de mineração de ouro de maior importância na Amazônia (Bastos *et al.*, 2006). Também tratam-se de espécies de abundância populacional, de interesse comercial e com relativa importância em relação a composição da dieta da população local.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e Preparo das Amostras

Os peixes das espécies *Plagioscion squamosissimus* e *Colossoma macropomum*, conhecidos popular e localmente como corvina e tambaqui, respectivamente, foram coletados com redes de espera de malhas entre 1,5 e 10 cm (entre nós), distribuídas em um raio de 500 m de três pontos de coleta distribuídos a jusante e a montante da área de represamento do rio Madeira-RO (Caripunas 09°11'16,98"S 064°36'44,53"W; Rau 09°16'12,8"S 064°41'14,1"W; São Lourenço 09°23'26,5"S 064°53'05,7"W), durante o período de cheia. Foram capturados nove corvinas e dez tambaquis, que foram eutanasiados no local, por mielotomia seguida de perfuração craniana (CCAC, 2005 e CONCEA, 2015); e realizado a retirada de amostra dos músculos dorsolaterais (epiaxial). As amostras foram acondicionadas individualmente e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) para o transporte até os laboratórios de estudos metalômicos do Instituto de Biociências (Departamento de Química e Bioquímica-UNESP), onde foram armazenadas em freezer a -80°C para os procedimentos analíticos. Para as análises de separação de proteínas as amostras foram unidas e maceradas, derivando em um *pool* de cada espécie.

2.2. Extração, Precipitação e Quantificação de Proteínas

O tecido muscular de cada espécie foi vigorosamente macerado, com auxílio de almofariz e pistilo, na presença de nitrogênio líquido, para liberação da fração proteica. Água ultrapura, na proporção de 1 mL de água para 1 g de tecido, foi adicionada para formação de homogenado ou extrato bruto, que foi então transferido para microtubos graduados. Esses extratos foram então centrifugados e o sobrenadante foi recolhido em microtubos.

As proteínas foram precipitadas em acetona 80% (v/v). Para tanto, o extrato proteico foi dividido em alíquotas de 200 µL onde foi adicionado acetona gelada na proporção de 1:4 (200 µL de amostra para 800 µL de acetona). As amostras foram então armazenadas a 2°C por duas horas, sendo posteriormente centrifugadas a 18625,88 g por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado restando, aderido ao fundo do microtubo, o precipitado proteico do tecido muscular de cada espécie.

Um dos precipitados de cada amostra foi direcionado à quantificação da proteína total pelo método do biureto (Doumas *et al.* 1981), utilizando curva analítica

previamente construída com concentrações de 10 a 100 g L⁻¹ a partir de solução padrão estoque de albumina bovina (100 g L⁻¹) para determinação das concentrações de proteína total nos extratos dos precipitados proteicos.

2.3. Eletroforese Bidimensional (2D PAGE)

Para separação das proteínas, um dos precipitados proteicos de cada uma das amostras foi ressolubilizado em 200 µL de tampão Tris-HCl, contendo anfólitos de pH na faixa de 3 a 10, e ao qual foi adicionado 1,4-ditiotreitol (DDT). Um volume de 250 µL de cada amostra ressolubilizada e corrigida quanto a concentração de proteínas (1,5 µg µL⁻¹) foi aplicada em canaletas de uma bandeja de reidratação, onde foram colocadas fitas pré-fabricadas de gel de poliacrilamida de 13 cm, também contendo anfólitos imobilizados de pH com gradiente de 3 a 10. As fitas com as respectivas amostras foram então recobertas com óleo mineral e deixadas em temperatura ambiente por 14 horas para completa reidratação das fitas com a solução contendo a amostra.

As fitas reidratadas, para a etapa de separação das proteínas por ponto isoelétrico, foram então colocadas no sistema de isoeletrofocalização (IEF) do modelo Ettan™ IPGphor™3. A programação de tensão elétrica utilizada para separação obedeceu a programação e condições estabelecidas por protocolo do sistema Ettan IPGphor 3.

Finalizado o último estágio da focalização isoelétrica e antes do procedimento de separação das proteínas pela massa molecular (SDS-PAGE), as fitas passaram por duas etapas de equilíbrio. A primeira etapa foi a de redução, na presença do DTT, que atua no rompimento das pontes dissulfeto presentes nas proteínas; e a segunda etapa foi a de alquilação, onde a iodocetamida substituiu o DTT, e teve a ação de evitar a reoxidação dos grupos tiois. Ambas as etapas tiveram duração de 15 minutos, sob agitação.

Na sequência, as fitas foram colocadas sobre geis de poliacrilamida a 12,5% previamente preparados entre placas de vidro. Um padrão conhecido de proteínas com peso molecular entre 14,4 e 97 kDa foi aplicado em papeis filtro (8 µL) colocados ao lado de cada fita, que foram então cobertos com solução de agarose 0,5% (m/v).

A corrida foi feita em cuba SE 600 Ruby (Amersham Biosciences), com a programação de tensão de 100 V por 30 minutos, seguida de 250 V por 2 horas. Os geis

foram então retirados das placas e imersos em solução de fixação de proteínas pelo período de 1 hora, e então colocados em solução corante de coomassie coloidal por 48 horas, sob agitação leve. Para posterior retirada do corante, os geis foram mergulhados em água ultrapura, passando por várias trocas até visualização nítida dos *spots* proteicos. Estes foram então digitalizados em *scanner* específico (GE Healthcare) e as imagens obtidas foram analisadas pelo programa de tratamento de imagens *ImageMaster Platinum* versão 7.0.

Foram confeccionados oito geis de cada amostra, divididos entre duas corridas eletroforéticas realizadas em tempos distintos, para verificação da equivalência ou *matching* entre os *spots* dos geis e a repetibilidade da técnica. Os geis da primeira corrida foram direcionados para o mapeamento e quantificação do mercúrio nos *spots* proteicos, enquanto os geis subsequentes foram encaminhados para identificação das proteínas.

2.4. Determinação de Mercúrio Total

Estudos anteriores indicaram a maior concentração de *spots* contendo mercúrio na faixa de separação de proteínas de menor massa molecular (Moraes *et al.*, 2012; Braga *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2015), logo, neste estudo padronizou-se o mapeamento apenas na faixa de aproximadamente 14,4 kDa.

A quantificação do mercúrio total nas amostras *in natura*, nos precipitados proteicos e nos *spots* recortados dos geis, foi feita por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), após mineralização ácida das amostras. Para tanto, as amostras dos tecidos (aproximadamente 0,1 g), os precipitados proteicos (ambos em duplicata) e os *spots* provenientes de quatro geis, foram transferidos para tubos de digestão, onde foi adicionado 300 µL de ácido sulfúrico concentrado e 200 µL de peróxido de hidrogênio, e os mesmos foram aquecidos em bloco digestor. O extrato ácido obtido foi então avolumado para 5 mL com água ultrapura. A leitura foi feita em espectrômetro de absorção atômica (SHIMADZU modelo AA-6800) e modificador químico zircônio e nitrato de paládio (1:2) foi utilizado. A validação dessas determinações foi feita por meio da análise de padrão certificado de proteína de peixe (*Fish Protein DORM 4 - NRC*).

2.5. Preparo e Identificação dos *Spots* Proteicos

Os *spots* proteicos, na faixa mapeada (14,4 kDa), que apresentaram mercúrio, foram extraídos dos géis, cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos para microtubos, sendo então submetidos as etapas de remoção do corante, redução e alquilação das proteínas, digestão tríptica e eluição dos peptídeos, conforme metodologia descrita por Shevchenko *et al.* (2006).

A solução peptídica foi então analisada para obtenção dos espectros de massas, através do sistema nanoAcquity UPLC acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Machester, UK). Os dados obtidos foram processados utilizando-se o *software* PLGS (Protein Lynx Global Server), e a identificação das proteínas foi realizada por meio do algoritmo de contagem de íons. Como as sequências proteicas destas duas espécies não são totalmente conhecidas, a identificação das proteínas foi feita por homologia, com busca em banco de dados *UniProt* (www.uniprot.org), dentro da classe Actinopterygii, a qual pertencem as duas espécies de peixe estudadas..

Uma vez identificadas as proteínas de interesse, foram obtidas suas sequências *fasta*, que foram transferidas para o *software* Blast2GO (B2G), que possibilitou a análise funcional das proteínas associadas ao mercúrio, permitindo sua categorização segundo os processos biológicos em que estão envolvidas, e a função molecular ou atividade bioquímica que exercem no organismo (Conesa *et al.*, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de concentração de mercúrio encontrados no tecido muscular de *P. squamosissimus*, peixe carnívoro, foi maior que o apresentado pelo *C. macropomum*, onívoro (tabela 1). Reforçando a relação da distribuição deste metal com os hábitos alimentares das espécies, e sua tendência de biomagnificação na cadeia trófica (Maurice-Bourgoin *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2006; Bastos *et al.*, 2015).

Em função dos efeitos adversos a saúde humana causados pelo mercúrio, diversas agências estabeleceram valores referência para a ingestão de pescado

contaminado. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998, estabeleceu um limite máximo de tolerância para o mercúrio total em peixes predadores como sendo de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$, e para as demais espécies de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$, isto para produtos da pesca direcionados para o consumo humano. Os valores encontrados neste estudo estão abaixo dos estipulados acima (tabela 1).

Com relação a distúrbios fisiológicos no organismo dos peixes, Sandheinrich e Wiener (2011), ao sumarizar diversos estudos relacionando a concentração de mercúrio total e a exibição de sintomas tóxicos, concluíram que as mudanças em processos bioquímicos, danos às células e tecidos e efeitos negativos a reprodução de peixes, começam a ocorrer em concentrações a partir de $500 \mu\text{g Hg por kg de peso úmido do músculo axial}$. Os valores encontrados neste estudo estão abaixo desta faixa, porém mudanças em níveis menores de organização biológica puderam ser encontradas, ao identificarmos proteínas-chave do metabolismo em associação a este elemento (tabela 3).

As concentrações de mercúrio total determinadas nos precipitados proteicos (tabela 1) demonstraram que em média 81% do mercúrio presente nos tecidos está associado as proteínas extraídas no processo de precipitação total com acetona 80% (v/v). Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Mason *et al.* (1995), que afirmam que a predominância do metilmercúrio no peixe reside na proteína e não no tecido adiposo.

Tabela 1. Determinação da concentração mercúrio total no tecido e precipitado proteico de músculo de *Plagioscion squamosissimus* e *Colossoma macropomum*.

	<i>P. squamosissimus</i>	<i>C. macropomum</i>
	Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Tecido	68 \pm 0,76	54 \pm 0,91
Precipitado Proteico	56 \pm 0,95	43 \pm 0,69
Padrão certificado*	403 \pm 0,12	

*Padrão certificado DORM 4 - NRC contendo $410\pm55 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio total.

No tecido muscular, na faixa de separação de proteínas de 14 kDa, do *P. squamosissimus* foram mapeados 31 spots, enquanto que no *C. macropomum* foram 64 spots. Por sua vez, mercúrio foi detectado em 05 e 14 spots, respectivamente (figura 1 A

e B), para estas espécies. O *spot* 5 do *P. squamosissimus* e os *spots* 6, 9 e 11 do *C. macropomum* foram os que apresentaram maior concentração deste metal (tabelas 2).

Com relação a análise de separação das proteínas por 2D-PAGE, a análise de correlação entre os *spots* proteicos das repetições dos geis de cada amostra demonstrou *matching* de 96 ± 3 e $92\pm5\%$ para *P. squamosissimus* e *C. macropomum*, respectivamente. O que significa, que em média, mais de 90% dos *spots* proteicos estavam presentes em todos os geis, das diferentes amostras, e apresentaram desvio padrão menor que 5%, demonstrando eficiência nas condições adotadas para a 2D-PAGE, assim como o demonstrado em outros estudos de mesma finalidade (Moraes *et al.*, 2012; Braga *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2015).

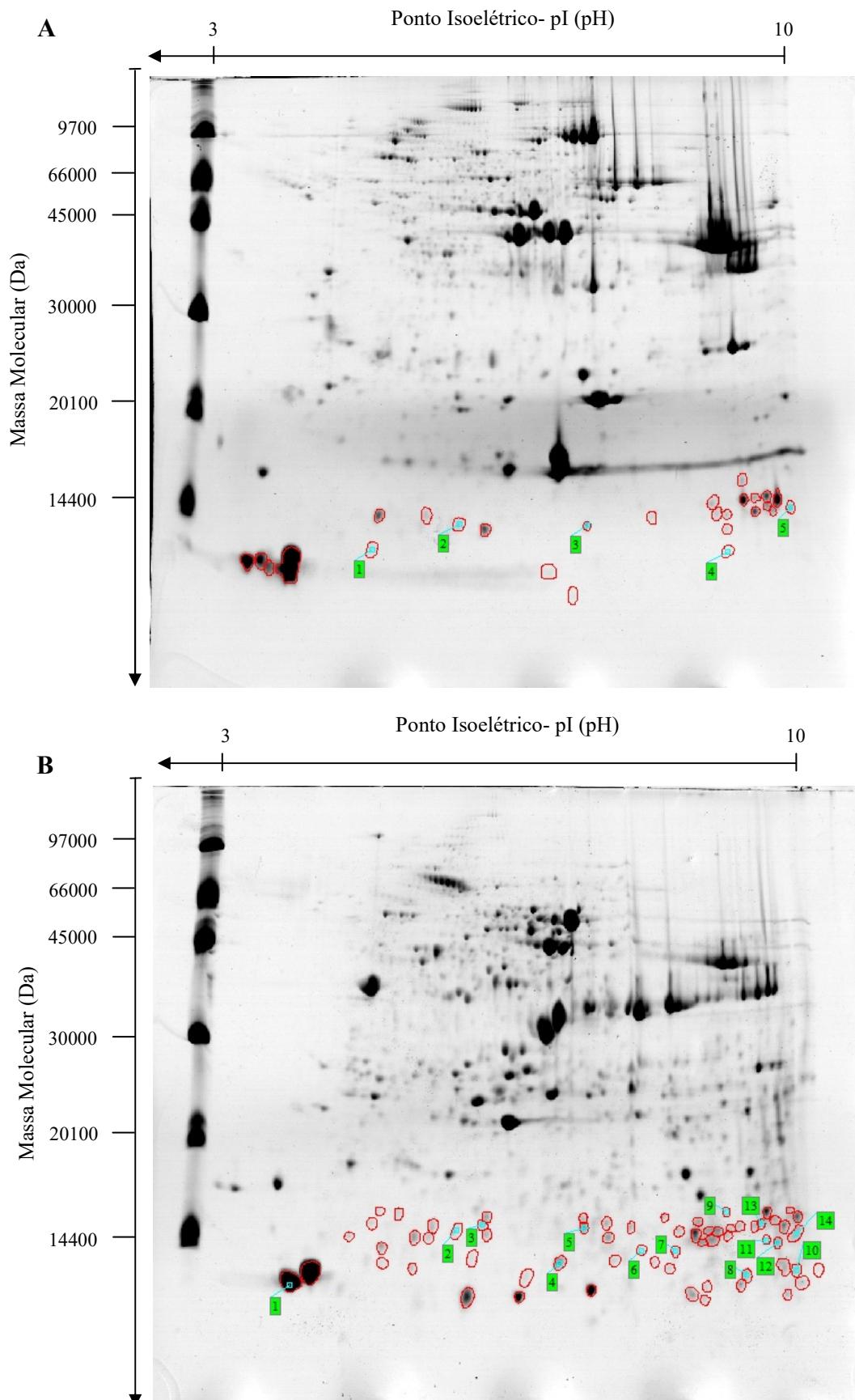


Figura 1. Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por eletroforese 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular de *Plagioscion squamosissimus* (A) e *Colossoma macropomum* (B). Os círculos em vermelho indicam os spots recortados e digeridos para determinação de mercúrio total. Os números indicam os spots onde o mercúrio foi detectado e quantificado, e as respectivas proteínas caracterizadas por ESI MS/MS.

Tabela 2. Concentração de mercúrio nos *spots* proteicos obtidos por GFAAS. Massa molecular e ponto isoelétrico experimental de cada spot do tecido muscular de *Plagioscion squamosissimus* e *Collossoma macropomum*.

Nº Spot	Massa Molecular (Da)	Massa de Proteína (μg)	Ponto Isoelétrico (pH)	Hg no Spot (μg g⁻¹)
<i>Plagioscion squamosissimus</i>				
1	12189	4,34	4,96	2,65
2	13205	6,95	6,00	6,04
3	13142	5,15	7,53	5,82
4	12424	3,33	9,12	7,20
5	14216	3,83	9,99	12,52
<i>Collossoma macropomum</i>				
1	11757	254,33	3,83	0,05
2	14298	5,76	5,76	5,21
3	14574	4,66	6,06	12,98
4	12710	14,77	6,93	0,37
5	14504	9,19	7,22	3,92
6	13416	2,53	7,90	23,87
7	13384	2,80	8,29	4,10
8	12311	8,82	9,12	2,72
9	15335	2,11	8,86	22,73
10	12450	4,80	9,69	12,61
11	13905	2,58	9,34	21,13
12	13762	7,60	9,47	4,74
13	14725	4,60	9,27	5,22
14	14152	9,83	9,68	2,44

Na análise de identificação dos *spots* proteicos é comum encontrar mais de uma proteína ao se realizar a busca no banco de dados (Beranova-Giorgianni, 2003). Assim, padronizou-se considerar o maior *score* e a maior cobertura para a escolha da proteína. Também foram considerados os dados de massa molecular (Mm) e pI obtidos experimentalmente, em relação à Mm e pI teóricos obtidos no banco de dados Uniprot.

Alguns *spots* não puderam ser caracterizados, o que pode estar relacionado à baixa concentração de proteína nos *spots*, não gerando peptídeos possíveis de serem sequenciados, ou ainda, devido à limitação de informações disponíveis nos bancos de dados. Logo, foi possível identificar três proteínas no proteoma muscular de *P. squamosissimus* e sete no proteoma de *C. macropomum* (tabela 3).

Tabela 3. Proteínas identificadas por espectrometria de massa, a partir da identificação e quantificação do mercúrio por GFAAS, no tecido muscular de *Plagioscion squamosissimus* e *Collossoma macropomum*.

Nº Spot	Proteína	Acesso	Score	pI/Mm (Da) Experimental	pI/Mm (Da) teórica (Uniprot)	Cobertura (%)	Seqüência de Peptídeos
<i>Plagioscion squamosissimus</i>							
1	Proteína de ligação a ácidos graxos 3	Q8UVG7	8.373	4,96/12.189	5,71/14.881	17,29	LGEFFDETTADDR EEFDETTADDRK
2	Não identificada	-	-	6,00/13.205	-	-	-
3	Não identificada	-	-	7,53/13.142	-	-	-
4	UPF0366	E3TBS2	2.599	9,12/12.424	8,79/13.294	13,11	VGGVFHSTC VWPGGSR
5	Phosphoglycerate mutase 2	W5LFH1	289	9,99/14.216	9,28/24.237	4,72	HYGGLTGLNK
<i>Collossoma macropomum</i>							
1	Paralbumina beta	E3TBW7	291	3,83/11.757	4,56/11.632	14,68	AFAIIDQDK LFLQNFK
2	Não identificada	-	-	5,76/14.298	-	-	-
3	Não identificada	-	-	6,06/14.754	-	-	-
4	Creatina quinase muscular	Q9PV91	114	6,93/12.710	6,44/42.835	1,84	GTGGGVDTASVGGVFDISNADR RGIGGGVDTASVGGVFDISNADR
5	Alfa hemoglobina	O13139	4.012	7,22/14.504	7,97/15.421	20,29	MLTVYPQTAK ADDIGAEALGR VDPANFK LRVDPANFK
6	Beta hemoglobina	O13140	5.621	7,90/13.416	7,66/16.342	22,97	TVMGGGLER VEWTDAER LHVDPDNFR AIKNMDNIK
7	Não identificada	-	-	8,29/13.384	-	-	-
8	Não identificada	-	-	9,12/12.311	-	-	-
9	Enzima de clivagem da cadeia lateral P450scC (Fragmento)	U5XYD7	109	8,86/15.335	8,84/27.187	4,24	LHPVAVSLQR
10	Não identificada	-	-	9,69/12.450	-	-	-
11	Beta hemoglobina (Fragmento)	B9A9V6	3.538	9,34/13.905	8,55/13.646	20,80	TVMGGGLER LHVDPPDNFR AIKNMDNIK TVMGGLER

Nº <i>Spot</i>	Proteína	Acesso	Score	pI/Mm (Da) Experimental	pI/Mm (Da) teórica (Uniprot)	Cobertura (%)	Sequência de Peptídeos
12	Não identificada	-	-	9,47//13.762	-	-	-
13	Beta hemoglobina (Fragmento)	B9A9V6	241	9,27//14.725	8,55//13.646	5,41	TVMGGLER LHVDPDNFR AIKNMDNIK TVMGGLER
14	Não identificada	-	-	9,68//14.152	-	-	-

Pela análise funcional das proteínas identificadas nos *spots* contendo mercúrio, podemos observar a associação deste metal a proteínas relacionadas ao transporte e metabolismo de lipídeos (FABP3 e UPF0366, respectivamente), ao metabolismo energético (fosfoglicerato mutase 2 e creatina quinase), ao metabolismo do cálcio (parvalbumina β), ao metabolismo de xenobióticos e esteroidogênese (citocromo P450scc) e ao transporte de oxigênio (hemoglobinas α e β) (quadro 1). A exposição ao mercúrio pode causar efeitos adversos através da alteração de diversos alvos. A toxicidade surge através da ligação ávida com grupos sulfidrila (-SH) e, em menor grau, grupos hidroxila, carboxila e fosforila das proteínas (Ayensu e Tchounwou, 2006), que causam disfunções celulares envolvendo a inativação de enzimas, alterações nas conformações protéicas, e consequente distúrbio de vários processos metabólicos e de transporte.

Proteína	Função Molecular	Processo Biológico
α e β hemoglobina	Ligação e transporte de oxigênio; ligação de heme e de íons ferro	Transporte de oxigênio; resposta a hipóxia
P450scc	Ligação de heme e de íons ferro; oxireductase, atuando em doadores emparelhados, com incorporação ou redução de oxigênio molecular, NADPH como um doador, e incorporação de um átomo de oxigênio; colesterol monooxigenase (clivagem de cadeia lateral)	Resposta celular ao estímulo hormonal peptídico; processo de biossíntese de metabólito secundário, hormônio esteróide C21 e de cortisol; processo de oxidação-redução; processo metabólico do colesterol
FABP3	Atividade de transporte e ligação a ácidos graxos	Transporte
Creatina quinase muscular	Atividade de quinase e ligação de ATP	Fosforilação
Parvalbumina β	Ligação a íons Ca	-
Fosfoglicerato mutase 2	Atividade de fosfoglicerato mutase dependente de 2,3-bisfosfoglicerato; atividade de bisfosfoglicerato mutase	Fusão de mioblastos; gliconeogênese; processo glicolítico; regulação da derivação pentose-fosfato
UPF0366	-	Regulação negativa do processo apoptótico; regulação positiva da transcrição do promotor de RNA polimerase II; adipogênese

Quadro 1. Categorização das proteínas identificadas nos *spots* contendo mercúrio do proteoma muscular de *Plagioscion squamosissimus* e *Collossoma macropomum*, de acordo com a função molecular que desempenha e o processo biológico com o qual contribui. Análise funcional por Blast2GO.

A proteína de ligação à ácidos graxos 3 (FABP3) encontrada no *spot* 01 do proteoma muscular do *P. squamosissimus*, pertence a família de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos, e é expressa principalmente no tecido muscular e cardíaco. Estas proteínas atuam como transportadores intracelulares de metabólitos intermediários hidrofóbicos e como transportadores de ácidos graxos de cadeia longa entre membranas

(Ockner, 1990). Tem também, um papel no transporte de xenobióticos lipofílicos para o núcleo (Velkov, 2013). Embora, até recentemente, não haja na literatura estudos relacionando a ligação do mercúrio a esta proteína de transporte, ela possui um grupo sulfidrila livre (Bernier e Jollès, 1987), que pode ser alvo de ligação para o mercúrio e outros íons metálicos classificados como "ácidos moles", facilitando assim sua passagem no meio intracelular. Wang *et al.* (2013) constataram que o declínio da expressão gênica de FABP3 causa defeitos no desenvolvimento embrionário do peixe-zebra (*Danio rerio*), incluindo atraso no desenvolvimento e edema no pericárdico. E que este efeito está provavelmente relacionado ao papel desta proteína na regulação da sinalização do ácido retinóico.

A proteína UPF0366, homólogo da proteína C11orf67, integrante da família de proteínas que contêm o domínio Mth938, identificada no *spot 4* do proteoma muscular de *P. squamosissimus*, não tem ainda seu papel totalmente esclarecido. Estudos apontam para evidências de envolvimento destas proteínas na diferenciação dos pré-adipócitos e na adipogênese (Wang *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2012). A estrutura cristalina do domínio Mth938 revela uma dobra terciária única constituída por três folhas β e três α hélices. As folhas β de cada monômero associam-se para formar um dímero com uma fenda na interfase, onde pressupõem-se que ocorra ligação com ácidos nucléicos de cadeia dupla (Das *et al.*, 2001). Não há até o momento descrição de associação desta família de proteínas com íons metálicos. No entanto, Braga *et al.* (2015) também encontram mercúrio em *spot* proteico, caracterizado como Mth938, do proteoma muscular de uma outra espécie de peixe carnívoro capturada no Rio Madeira, a *Brachyplatystoma rousseauxii*. Este pode ser indício da afinidade desta proteína com o mercúrio, porém a sua estrutura e papel metabólico ainda necessitam de aprofundamento.

A fosfoglicerato mutase 2 (PGM2), identificada no *spot 5* do *P. squamosissimus*, é uma isoenzima, expressa no tecido muscular, que pertence a família das fosfoglicerato mutases (EC 5.4.2.11). Estas enzimas são indispensáveis à glicólise e gliconeogênese, sendo responsáveis por catalisar a interconversão de 3-fosfoglicerato (3PG) em 2-fosfoglicerato (2PG), tendo o 2,3-bisfosfoglicerato como intermediário (Bond *et al.*, 2001). Apresentam-se como homodímeros, e todas as sequências contêm uma histidina no sítio ativo, que é fosforilada durante o ciclo catalítico (Jedrzejas, 2000). O único estudo disponível relacionando o mercúrio a esta família de enzimas é o de Grisolia e Tecson (1967), que focava na transformação reversível da fosfoglicerato mutase em 2,3-

difosfoglicerato fosfatase, induzida pelo Hg^{2+} , em determinado pH e concentração. O que indica que o mercúrio pode se ligar e promover modificações funcionais nesta enzima.

O *spot* 1 do proteoma muscular do *C. macropomum* foi caracterizado como sendo a parvalbumina β . Existem duas linhagens filogenéticas distintas de parvalbumina: α e β , no entanto a maioria das parvalbuminas de peixes pertence ao subtipo β . São proteínas de baixo peso molecular (10-12,5 kDa) com elevada afinidade para o Ca^{2+} (dois íons Ca^{2+} por molécula) (Arif, 2009). São geralmente esféricas com núcleo hidrofóbico bem definido, todas as cadeias laterais polares estão na superfície exceto aquelas associadas à ligação de cálcio (Kretsinger e Nockolds, 1973). Ocorrem em altas concentrações nas fibras musculares de contração rápida, atuando como fatores relaxantes solúveis, acelerando o ciclo de contração-relaxamento, também protegem as células da sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, ligando-se aos íons livres, reduzindo assim seu conteúdo intracelular (Arif, 2009). Cuello *et al.* (2012) investigaram os efeitos da exposição ao metilmercúrio no desenvolvimento do *Danio rerio* (zebrafish) e encontraram expressão alterada em três isoformas de parvalbumina, sugerindo a perturbação da homeostase do cálcio como importante mecanismo de toxicidade MeHg. Esta proteína e suas isoformas tem sido encontradas em *spots* contendo mercúrio, do proteoma de diferentes espécies de peixes amazônicos, estudadas por nosso grupo de pesquisa (Vieira *et al.*, 2015; Braga *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2017). Partindo do pressuposto que os aspectos comuns entre organismos diferentes se acentuam ao nível molecular (Arias *et al.*, 2007), a utilização desta proteína como biomarcador é interessante, uma vez que pode ser verificada em mais de uma espécie do ambiente.

A enzima creatina quinase (CK) (*EC* 2.7.3.2), identificada no *spot* 4 de *C. macropomum*, tem papel essencial no metabolismo energético. São pelo menos quatro isoformas conhecidas, a muscular e a cerebral, ambas citosólicas, e duas outras formas mitocondriais (Scholl e Eppenberger, 1972). De maneira geral, o papel dessas enzimas é catalisar a transferência de fosfato de alta energia, proveniente da adenosina trifosfato (ATP), para a creatina, obtendo como resultado fosfocreatina (PCr) e adenosina difosfato (ADP) (Bessman e Carpenter, 1985). Esta reação é reversível, ou seja, ATP também pode ser gerado a partir de PCr e ADP. Logo, a PCr tem papel importante como reservatório energético para regeneração de ATP em tecidos que tem necessidades elevadas e intermitentes, como o muscular esquelético, o nervoso e o cardíaco, bem como para o transporte de energia intracelular (Wallmann e Hemmer, 1994).

A CK é uma enzima ubíqua, existente como um dímero com duas subunidades. Cada subunidade tem um grupo reativo de cisteína que é crítico para ligação ao substrato, e também é altamente susceptível à oxidação (Wang *et al.*, 2001). A ligação de íons metálicos a estes locais produz diferentes efeitos na taxa de reação enzimática (Araújo *et al.*, 1996), que podem ser explicados por alterações conformacionais induzidas, aumentando ou diminuindo a acessibilidade dos grupos -SH ao substrato. Experimentos com diferentes espécies animais, e em diferentes tecidos, demonstram que o mercúrio é potente inibidor da CK (Rico *et al.*, 1977; Araújo *et al.*, 1996; Glaser *et al.*, 2010). Ainda, Farina *et al.* (2010) levantaram a hipótese de que os grupos tiol de algumas proteínas específicas, como a CK, são mais nucleofílicos, e consequentemente mais reativos, do que a glutationa (GSH).

A enzima de clivagem da cadeia lateral, conhecida como citocromo P450scc (*EC 1.14.15.6*) ou CYP11A1 (primeira proteína da família 11, subfamília A), encontrada no *spot* 9 do proteoma muscular do *C. macropomum*, faz parte da superfamília de enzimas monooxigenase do citocromo P450. Estas enzimas, heme-tiolatos, atuam sobre gama de substratos quimicamente diferentes, suportando o metabolismo oxidativo, peroxidativo e redutivo de tais substratos, endógenos e xenobióticos, tais como poluentes ambientais, agroquímicos, esteróides, prostaglandinas e ácidos graxos (Danielson, 2002).

A citocromo P450scc atua especificadamente no primeiro passo do processo de esteroidogênese, catalisando a conversão do colesterol em pregnenolona (Hanukoglu, 1992). Tem pouca expressão no tecido muscular, sendo quase que exclusiva dos tecidos endócrinos. Embora toda família de P450 esteja envolvida no metabolismo de xenobióticos, não há estudos relacionando especificadamente a enzima P450scc ao metabolismo do mercúrio. No entanto, esta é uma das proteínas com maior concentração de mercúrio do tecido muscular de *C. macropomum* (tabela 2), indicando uma possível capacidade de ligação ao metal para desintoxicação do organismo, caracterizando-se assim como provável biomarcador de toxicidade. Deficiências na expressão ou na função desta proteína pode resultar em perturbação da homeostase de hormônios esteróides, incluindo falta de glicocorticóides e hipertensão mitocondrial (Danielson, 2002).

Grande parte das proteínas identificadas neste estudo fazem parte do complexo hemoglobina, estando consequentemente envolvidas na ligação e transporte de oxigênio (quadro 1). Tratam-se das hemoglobinas, tanto alfa (α) como beta (β), encontradas nos *spots* 5, 6, 11 e 13 do proteoma muscular de *C. macropomum*.

A hemoglobina, de maneira geral, é composta de quatro cadeias de globinas, duas α e duas β , que criam um tetrâmero estável. Cada globina contém um grupo prostético heme, que permite a ligação com quatro moléculas de oxigênio, de forma reversível (Perutz, 1978). A maioria das espécies de peixes apresentam hemoglobinas simétricas, com dois pares de cadeias de globina idênticas, mas há espécies que apresentam assimetria, com pelo menos três cadeias de globina diferentes em uma única molécula de hemoglobina (Souza e Bonilla-Rodriguez, 2007). Podem, também, ser encontradas espécies com várias formas de hemoglobinas, as chamadas isohemoglobinas, simétricas e assimétricas, de maior ou menor afinidade com o oxigênio, com alterações nas quantidades relativas de cada tipo de hemoglobina moduladas pelas condições ambientais (Fago *et al.*, 2002).

Estudos em diversas espécies animais, apontam a hemoglobina como chave central no metabolismo do metilmercúrio, ao captar e distribuir este elemento do sangue para outros tecidos (Doi e Tagawa, 1983; Ancora *et al.*, 2002; Zayas *et al.*, 2014). Ao ser ingerido, este metal, é absorvido no intestino, penetra na membrana celular dos eritrócitos, e torna-se associado com as hemoglobinas, em função de sua elevada afinidade pelos grupos sulfidrila destas moléculas (Doi e Tagawa, 1983). O número de grupos sulfidrila em hemoglobinas tetraméricas de vertebrados varia, entre diferentes espécies animais, de 2 a 18 grupos por tetrâmero (Kleinschmidt e Sgouros, 1987).

Zayas *et al.* (2014), encontraram evidências de que a hemoglobina presente no tecido hepático de golfinhos brancos (*Lagenorhynchus acutus*) era a principal proteína de ligação ao metilmercúrio, e que esta ligação se dava através dos resíduos de cisteína (Cys), principalmente o Cys 93 presente na subunidade β , enquanto que o Cys 104 da cadeia α parecia contribuir com menos de 10% das ligações ao mercúrio. Em nosso estudo, os *spots* correspondentes as hemoglobinas da cadeia β (*spots* 6, 11 e 13) tem a maior concentração de mercúrio por grama de proteína que o *spot* correspondente a hemoglobina α (*spot* 5) (tabela 2).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pela identificação e posterior análise funcional das proteínas presentes nos *spots* contendo mercúrio, podemos observar a associação deste metal a proteínas relacionadas a processos chave no organismo, como o transporte de ácidos graxos e oxigênio, o metabolismo energético, de lipídeos, de íons cálcio, de xenobióticos e a esteroidogênese. Ajudando assim na compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à toxicidade ao

mercúrio e fornecendo opções de possíveis candidatos a biomarcadores para o monitoramento ambiental aquático.

Como a exposição ao mercúrio pode causar efeitos adversos por meio de disfunções celulares envolvendo a inativação de enzimas, alterações nas conformações protéicas, e consequente distúrbio de vários processos metabólicos, as proteínas encontradas no presente estudo podem vir a ser possíveis biomarcadores da toxicidade do mercúrio em organismos em ambiente natural.

5. REFERÊNCIAS

- ANCORA, S.; ROSSI, R.; DI SIMPLICIO, P.; LUSINI, L.; LEONZIO, C. *In Vitro* Study of Methylmercury in Blood of Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, p. 348-353, 2002.
- ARAUJO, G.M.N.; SILVA, C.B.; HASSON-VOLOCH, A. Comparison of the Inhibitory Effects of Mercury a Cadmium on the Creatine Kinase from *Electrophorus electricus* (L.). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 28, p. 491-497, 1996.
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 61-72, 2007.
- ARIF, S.H. A Ca^{2+} -binding protein with numerous roles and uses: parvalbumin in molecular biology and physiology. **Bioessays**, v. 31, p. 410-421, 2009.
- AYENSU, W.K.; TCHOUNWOU, P.B. Microarray Analysis of Mercury-Induced Changes in Gene Expression in Human Liver Carcinoma (HepG₂) Cells: Importance in Immune Responses. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 3, p. 141-173, 2006.
- AZEVEDO-SILVA, C.E.; ALMEIDA, R.; CARVALHO, D.P.; OMETTO, J.P.H.B.; CAMARGO, P.B.; DORNELES, P.R.; AZEREDO, A.; BASTOS, W.R.; MALM, O.; TORRES, J.P.M. Mercury biomagnification and the trophic structure of the ichthyofauna from a remote lake in the Brazilian Amazon, **Environmental Research**, v. 151, p. 286-296, 2016.
- BAIRD, C.; CANN, M. Metais, Solos, Sedimentos e Disposição de Resíduos. In: **Química Ambiental**. 4 Ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. p. 683-823.
- BASTOS, W.R.; GOMES, J.P.O.; OLIVEIRA, R.C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E.L.; LACERDA, L.D.; SILVEIRA, E.G.; PFEIFFER, W.C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 368, p. 344-351, 2006.
- BASTOS, W.R.; DÓREA, J.G.; BERNARDI, J.V.E.; LAUTHARTTE, L.C.; MUSSY, M.H.; LACERDA, L.D.; MALM, O. Mercury in fish of the Madeira river (temporal and spatial assessment), Brazilian Amazon. **Environmental Research**, v. 140, p. 191-197, 2015.
- BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 273-281, 2003.
- BERNIER, I.; JOLLÈS, P. A survey on cytosolic non-enzymic proteins involved in the metabolism of lipophilic compounds: from organic anion binders to new protein families. **Biochimie**, v. 69, p. 1127-1152, 1987.

BESSMAN, S.P.; CARPENTER, C.L. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p. 831-862, 1985.

BOND, C.S.; WHITE, M.F.; HUNTER, W.N. High Resolution Structure of the Phosphohistidine-activated Form of *Escherichia coli* Cofactor-dependent Phosphoglycerate Mutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 3247-3253, 2001.

BRAGA, C.P.; BITTARELLO, A.C.; PADILHA, C.C.F.; LEITE, A.L.; MORAES, P.M.; BUZALAF, M.A.R.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.M. Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. **Talanta**, v. 132, p. 239-244, 2015.

CCAC, CANADIAN COUNCIL OF ANIMAL CARE. **CCAC Guidelines on:** the care and use of fish in research, teaching and testing. Canadá, 2005. 87 p. Disponível em: <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>. [Acesso em: 10/02/2015].

CONCEA, CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA.** Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2015. 54 p. Disponível em: www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238014.doc. [Acesso em: 10/02/2015].

CUELLO, S.; XIMENEZ-EMBUN, P.; RUPPEN, I.; SCHONTHALER, H.B.; ASHMAN, K.; MADRID, Y.; LUQUE-GARCIA, J.L.; CAMARA, C. Analysis of protein expression in developmental toxicity induced by MeHg in zebrafish. **Analyst**, v. 137, p. 5302-5311, 2012.

DANIELSON, P.B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. **Current Drug Metabolism**, v. 3, p. 561-97, 2002.

DAS, K.; XIAO, R.; WAHLBERG, E.; HSU, F.; ARROWSMITH, C.H.; MONTELIONE, G. T.; ARNOLD, E. X-Ray crystal structure of MTH938 from *Methanobacterium thermoautotrophicum* at 2.2 Å resolution reveals a novel tertiary protein fold. **Proteins**, v. 45, 486-488, 2001.

DOI, R.; TAGAWA, M. A study on biochemical and biological behaviour of methylmercury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 69, p. 407-416, 1983.

DOUMAS, B.T.; BAYSE, D.B.; BORNER, K.; CARTER, R.J.; ELEVITCH, F.; GARBER, C.C.; GRABY, R.A.; HAUSE, L.L.; MATHER, A.; PETERS, T.JR.; RAND, R.N.; REEDER, D.J.; RUSSELL, S.M.; CHAFFER, R.; WESTGARD, J.O. A candidate reference method for determination of total protein in serum. II. Test for transferability. **Clinical Chemistry**, v. 27, p. 1651-1654, 1981.

DURRIEU, G.; MAURY-BRACHET, R.; BOUDOU, A. Goldmining and mercury contamination of the piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana (Amazon basin). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 315-323, 2005.

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

FAGO, A.; FOREST, E.; WEBER, R. Hemoglobin and subunit multiplicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hemoglobin system. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 24, p. 335-342, 2002.

FARINA, M.; ROCHA, J.B.T.; ASCHNER, M. Oxidative stress and methylmercury-induced neurotoxicity. In: WANG, .; SLIKKER, W. [Ed.]. **Developmental Neurotoxicology Research: Principles, Models, Techniques, Strategies, and Mechanisms**. Indianapolis: John Wiley & Sons, p. 357-385, 2010.

FEARNSIDE, P.M. Impacts of Brazil's Madeira River Dams: Unlearned lessons for hydroelectric development in Amazonia. **Environmental Science & Policy**, v. 38, p. 164-172, 2014.

GLASER, V.; LEIPNITZ, G.; STRALIOTTO, M.R.; OLIVEIRA, J.; DOS SANTOS, V.V.; WANNMACHER, C.M.; DE BEM, A.F.; ROCHA, J.B.; FARINA, M.; LATINI, A. Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. **Neurotoxicology**, v. 31, p. 454-460, 2010.

GRISOLIA, S.; TECSON, J. Mercury-induced reversible increase in 2,3-diphosphoglycerate phosphatase and concomitant decrease in mutase activity of animal phosphoglycerate mutases, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 132, p. 56-67, 1967.

HANUKOGLU, I. Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, p. 779-804, 1992.

JEDRZEJAS, M.J. Structure, function, and evolution of phosphoglycerate mutases: Comparison with fructose-2,6-bisphosphatase, acid phosphatase, and alkaline phosphatase. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 73, p. 263-287, 2000.

KEHRIG, H.A.; HOWARD, B.M.; MALM, O. Methylmercury in a predatory fish (*Cichla* spp.) inhabiting the Brazilian Amazon. **Environmental Pollution**, v. 154, p. 68-76, 2008.

KLEINSCHMIDT, T.; SGOUROS, J.G. Hemoglobin sequences. **Biological chemistry Hoppe-Seyler Journal**, v. 368, p. 579-615, 1987.

KRETSINGER, R.H.; NOCKOLDS, C.E. Carp Muscle Calcium-binding Protein: Structure determination and general description. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 218, p. 3313-3326, 1973.

LACERDA, L. D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, 2008.

LECHLER, P.J.; MILLER, J.R.; LACERDA, L.D.; VINSON, D.; BONZONGO, J.C.; LYONS, W.B.; WARWICK, J.J. Elevated mercury concentrations in soils, sediments,

water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? **Science of the Total Environment**, v. 260, p. 87-96, 2000.

MA, X.; DING, W.; WANG, J.; WU, G.; ZHANG, H.; YIN, J.; ZHOU, L.; LI, D. LOC66273 Isoform 2, a Novel Protein Highly Expressed in White Adipose Tissue, Induces Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. **Journal of Nutrition**, v. 142, p. 448-455, 2012.

MALM, O.; CASTRO, M.B.; BASTOS, W.R.; BRANCHES, F.P.J.; GUIMARÃES, J. R.D.; ZUFFO, C.E.; PFEIFFER, W.C. An assessment of Hg pollution in different gold mining areas, Amazon Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 175, p. 127-140, 1995.

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

MASON, R.P.; REINFELDER, J.R.; MOREL, R.M.M. Bioaccumulation of mercury and methylmercury. **Water, Air, Soil Pollution**, v. 80, p. 915-921, 1995.

MAURICE-BOURGOIN, L.; QUIROGA, I.; CHINCHEROS, J. COURAU, P. Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira rivers and mercury exposure in riparian Amazonian populations. **Science of The Total Environment**, v. 260, p. 73-86, 2000.

MORAES, P.M.; SANTOS, F.A.; PADILHA, C.C.F.; VIEIRA, J.C.S.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.M. A preliminary and qualitative metallomics study of mercury in the muscle of fish from Amazonas, Brazil. **Biological Trace Element Research**, v. 150, n. 1-3, p. 195-199, 2012.

OCKNER, R.K. Historic overview of studies on fatty acid-binding proteins. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 98, p. 3-9, 1990.

PERUTZ, M.F. Hemoglobin structure and respiratory transport. **Scientific American**, v. 239, p. 92-125, 1978.

PFEIFFER, W.C.; MALM, O.; SOUZA, C.M.M.; LACERDA, L.D.; SILVEIRA, E.G.; BASTOS, W.R. Mercury in the Madeira River ecosystem, Rondônia, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 38, p. 239-245, 1991.

PORVARI, P. Mercury levels of fish in Tucuruí hydroelectric reservoir and in River Mojú in Amazonia, in the state of Pará, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 175, p. 109-117, 1995.

RICO, A.G.; BRAUN, J.P.; BENARD, P.; BURGAT-SACAZE, V. *In vivo* inhibition of grey partridge (*Perdix Perdrix*) creatine-kinase by methoxy ethyl mercury silicate. **Poultry Science**, v. 56, p. 1032-1033, 1977.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; FARELLA, N.; SERIQUE, G.; COELHO, H.; SOUSA PASSOS, C.J.; JESUS DA SILVA, E.; ANDRADE, P.S.; MERGLER, D.; GUIMARÃES, J.R.D.; AMORIM, M. Effects of Recent Human Colonization on the Presence of Mercury in Amazonian Ecosystems. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 112, p. 297-313, 1999.

SAMPAIO DA SILVA, D.; LUCOTTE, M.; PAQUET, S.; DAVIDSON, R. Influence of ecological factors and of land use on mercury levels in fish in the Tapajós River basin, Amazon. **Environmental Research**, v. 109, p. 432-446, 2009.

SANDHEINRICH, M.B.; WIENER, J.G. Methylmercury in fish: Recent advances in assessing toxicity of environmentally relevant exposures. In: Beyer, W.N.; Meador, J.P. [Eds.]. **Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations**, CRC Press, Boca Raton, p. 169–190, 2011.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, 1, p. 2856-2860, 2006.

SCHOLL, A.; EPPENBERGER, H.M. Patterns of the isoenzymes of creatine kinase in **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 42, p. 221-226, 1972.

SCHURZ, F.; SABATER-VILAR, M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defense: the role of metal-binding proteins. **Mutagenesis**, v. 15, p. 525-530, 2000.

SOUZA, P.C.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Fish hemoglobin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 769-778, 2007.

UYDAL, K.; EMRE, Y.; KÖSE, E. The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey). **Microchemical Journal**, v. 90, p. 67-70, 2008.

VELKOV, T. Interactions between Human Liver Fatty Acid Binding Protein and Peroxisome Proliferator Activated Receptor Selective Drugs. **PPAR Research**, v. 2013, p. 1-14, 2013.

VIEIRA, J.C.S.; CAVECCI, B.; QUEIROZ, J.V.; BRAGA, C.P.; PADILHA, C.C.F.; LEITE, A.L.; FIGUEIREDO, W.S.; BUZALAF, M.A.R.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.M. Determination of the Mercury Fraction Linked to Protein of Muscle and Liver Tissue of Tucunaré, (*Cichla* spp.) from the Amazon Region of Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, n. 4, p. 422-430, 2015.

VIEIRA, J.C.S.; BRAGA, C.P.; OLIVEIRA, G.; LEITE, A.L.; QUEIROZ, J.V.; CAVECCI, B.; BITTARELLO, A.C.; BUZALAF, M.A.R.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.M. Identification of protein biomarkers of mercury toxicity in fish. **Environmental Chemistry Letter**, p. 1-8, 2017.

WALLIMANN, T.; HEMMER, W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 133, p. 193-220, 1994.

WANG, P.; MCLEISH, M.J.; KNEEN, M.M.; LEE, G.; KENYON, G.L. An Unusually Low pKa for Cys282 in the Active Site of Human Muscle Creatine Kinase. **Biochemistry**, v. 40, p. 11698-1170, 2001.

WANG, H.; MA, X.; ZHANG, H.; ZANG, J.; HU, S.; LI, D. Involvement of LOC66273 isoform 2, a novel Mth938 containing protein, in MAPK pathway. **Frontiers in Bioscience** (Elite Ed), v. 1, p. 1241-1248, 2011.

WANG, X.; ZHOU, L.; JIN, J.; YANG, Y.; SONG, G.; SHEN, Y.; LIU, H.; LIU, M.; SHI, C.; QIAN, L. Knockdown of FABP3 impairs cardiac development in zebrafish through the retinoic acid signaling pathway. **International Journal Molecular Sciences**, v. 14, p. 13826-13841, 2013.

ZAYAS, Z.P.; OUERDANE, L.; MOUNICOU, S.; LOBINSKI, R.; MONPERRUS, M.; AMOUROUX, D. Hemoglobin as a major binding protein for methylmercury in white-sided dolphin liver. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 1121-1129, 2014.

CAPÍTULO IV

IMPLICAÇÕES

A metaloproteômica se mostra ferramenta adequada na pesquisa de biomarcadores moleculares da toxicidade do mercúrio, apontando para proteínas que tem intima associação com este metal. E o conhecimento destes biomarcadores permite avaliar o estado de saúde ambiental, fornecendo dados para a proteção ou recuperação precoce do ecossistema aquático.

Tanto o estudo das metaloproteínas como dos mecanismos envolvidos no estabelecimento do estresse oxidativo, possibilitam entender as interações que ocorrem entre o mercúrio e as biomoléculas no organismo de peixes *in situ*, permitindo a mensuração de possíveis efeitos futuros, o que é de extrema importância na tomada de decisões preventivas ou remediadoras.

As proteínas encontradas neste estudo dão "vislumbre" dos caminhos e possíveis efeitos do mercúrio no organismo de peixes em situação de contaminação crônica. E fornecem ferramentas para futura ampliação do conhecimento dos mecanismos subjacentes envolvidos na toxicidade deste metal. São necessárias agora, conexões entre os níveis de mercúrio associados a estas biomoléculas e os efeitos fisiológicos que podem causar algum comprometimento da viabilidade destas espécies.