

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

**ANÁLISE PROTEÔMICA E MORFOLÓGICA EM FÍGADO DE RATOS
SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AO CHUMBO E SUPLEMENTADOS COM
FERRO**

São Carlos

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTROS DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

ANÁLISE PROTEÔMICA E MORFOLÓGICA EM FÍGADO DE RATOS
SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AO CHUMBO E SUPLEMENTADOS COM
FERRO

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, junto ao programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração em Bioquímica e Biologia Molecular.

Autora: Mileni da Silva Fernandes

Orientação: Prof^a. Dr^a. Marília A. R. Buzalaf

São Carlos

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F363ap

Fernandes, Mileni da Silva.

Análise proteômica e morfológica em fígado de ratos submetidos à exposição ao chumbo e suplementados com ferro / Mileni da Silva Fernandes. -- São Carlos : UFSCar, 2015.

188 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Genética. 2. Chumbo. 3. Proteômica. 4. Eletroforese bidimensional. 5. Fígado. I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Mileni da Silva Fernandes, realizada em 24/09/2015:

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
USP

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva
UFSCar

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira
USP

Profa. Dra. Flávia Iano
USP

Dedicatória

A Deus, sempre orientando meus passos. Por estar sempre me protegendo e me guiando em todos os momentos da minha vida e dando-me força. E sei também que será essa mesma força que me fará seguir sempre em frente.

“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele tudo fará”

Salmos 37:5

Aos meus pais Carlos Roberto e Lúcia, pela sabedoria em me educar, por seus gestos solidários, pela espiritualidade, pelo amor e carinho de pais que souberam me proteger e ensinar os limites da vida. Por terem investido e acreditado sempre na educação e me incentivado a trilhar os caminhos do conhecimento capaz de transformar as pessoas sempre para melhor. Amo vocês.

DEDICO ESTE TRABALHO

*“Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso, aprendemos sempre”*

Paulo Freire

Agradecimentos Especiais

Ao meu amado irmão *Luiz Henrique* e minha cunhada *Anne*, pelo apoio e dedicação sempre presentes. Meu irmão, quando cheguei ao mundo você me esperava, e a fortuna me sorriu. Deus foi por demais generoso quando decidiu que seríamos irmãos, pois escolheu o melhor dos irmãos para mim.

Ao “amorzinho da titia Mi”, minha amada sobrinha *Lara*, pela alegria de viver, a titia te ama muito!

À família *Strandman*, pelo carinho e torcida. Sempre me lembrando que existem pessoas muito especiais me protegendo, a quem minhas atitudes imagino que pudesse provocar um doce e sincero sorriso de orgulho. Tia Leni muito obrigada pelo apoio constante. Amo vocês.

À minha querida avó, *Isabel Fernandes* pelo apoio e torcida representando toda a família Fernandes.

Às minhas amadas amigas *Jú* e *Flo*, que fazem da minha família maior. Agradeço o carinho sincero e a amizade verdadeira, através da eternidade estaremos unidas pelo carinho e bênção de Deus. Amo muito vocês!!.....É claro à japinha linda *Isabela Mayu* por todo seu “singular” amor, a Tatá te ama!

À minha amiga **Aline**, essencial neste trabalho, sempre fazendo o possível para me ajudar, mostrando minhas limitações e ajudando a superá-las. Te admiro profundamente pela profissional que é, e não menos importante, pela amiga que é. É bom saber que temos amigos em quem podemos confiar. Por mais que o tempo passe e que as dificuldades possam surgir, eu sempre estarei firme forte, porque sei que posso contar com você, uma amiga que certamente foi um presente em minha vida. A amizade é um Dom que poucos possuem... obrigada por dividi-la comigo. Nossa amizade sempre foi uma parte muito especial da minha vida, e sempre vou agradecer por isso, e também porque você existe.

À orientadora **Marília Buzalaf**, pelo exemplo inspirador, desde o primeiro momento apoiando e confiando no projeto. Pela dedicação, incentivo, valiosos ensinamentos e principalmente pelas demonstrações de carinho e amizade. Um simples "Obrigada" é pouco para expressar toda gratidão que eu tenho por você.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando Barbosa Jr, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo-USP, pela colaboração promovida a esta pesquisa.

À Dr^a. Adriana Franco Paes Leme, Bianca e Romênia, do Laboratório de Espectrometria de Massas (LNBio), pelo recebimento durante as análises iniciais de MS.

Ao Prof. Dr. Pedro Padilha, do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Unesp-Botucatu. Meus sinceros agradecimentos ao professor, à Cilene e seus alunos Camila, José, Bruna e João por toda colaboração nas análises de GFAAS, muito obrigada pela atenção e disponibilidade.

Ao querido Lucas de Almeida, pelo convívio e colaboração durante toda sua jornada de iniciação científica. Muito obrigada pela amizade.

À minha querida amiga Fernanda Zucki, meus sinceros agradecimentos por toda sua ajuda e companheirismo. A gratidão é um segredo de quem recebe e de quem pratica, não visa mérito, apenas se faz sem pensar em recompensa.

Às amigas Camila Buzalaf, Maria Cecília e Flávia Levy pela carinhosa amizade, reconheço que tenho muita sorte e a alegria de ter amigos.

Às amigas Flávia Jano e Heloísa pela ajuda, descontração e amizade durante todos esses anos no laboratório.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira pelo respeito, generosidade e amizade.

Aos meus amigos do laboratório de Bioquímica, por vivenciarmos juntos tantos momentos de trabalho e também descontração: Luiza, Senda, Thelma, Larissa, Flávia Amadeu, Talita, Juliana, Isabela, Tatiana, Aline Dionizio, Aline, Amanda, Adriana, Cristiane, Beatriz, Cintia, Priscila, Carina, Lúvia, Poliana e Bruno.

Aos funcionários do Biotério Central, da FOB-USP pelo auxílio prestado ao longo do período de tratamento dos animais.

A todos colegas de Pós-graduação pelos momentos compartilhados.

À secretária Ivanildes, da seção de Pós-graduação, sempre com simpatia nos ajudando a resolver todos os trâmites burocráticos. Obrigada pela atenção, gentileza e disponibilidade em sempre nos ajudar.

Agradecer . uma forma de aliviar a alma que grita por uma manifesta...e de sentimento capaz de transmitir um muito obrigado especial a quem nos ajuda.

Agradecimentos Institucionais

Agradeço à *Universidade Federal de São Carlos* na pessoa de seu Reitor Prof. Dr. Targino de Araújo Filho e Vice-Reitor Prof. Dr. Adilson Jesus Aparecido de Oliveira, pela oportunidade de cursar o Doutorado nesta instituição de referência e excelência em nosso país.

Ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) na pessoa de sua Diretora Prof.^a Dr.^a Ana Beatriz de Oliveira.

Ao Departamento de Genética e Evolução (DGE) e a todos os docentes, que contribuíram de forma direta ou indireta para concretização desta etapa.

À Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), pela estrutura fornecida.

À FAPESP, pelo suporte financeiro que viabilizou este estudo científico, através do processo nº 2011/09091-3.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Obrigada!

Resumo

O chumbo (Pb) é um metal pesado amplamente distribuído em nosso meio, porém não possui papel fisiológico no organismo. Devido ao seu emprego em diversos setores industriais, proporciona contaminação direta de pessoas ocupacionalmente expostas e, indiretamente, na forma de poluentes à população geral. Por isso tornou-se um problema de saúde pública. Estudos correlacionam efeitos adversos à saúde com níveis baixos de Pb no sangue, até em concentrações abaixo de 10µg/dL. Seus efeitos vão desde o comprometimento cognitivo em crianças a neuropatia periférica em adultos, mas pouco se sabe sobre seus efeitos no fígado. Tem sido relatado que o ferro (Fe) tem um efeito protetor, que pode ajudar na diminuição da absorção do Pb pelo organismo. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil proteico e o aspecto morfológico no fígado de ratos intoxicados por acetato de chumbo (Pb(C₂H₃O₂)₂), submetidos simultaneamente à suplementação com sulfato ferroso (FeSO₄) na dose de 20 mg/Kg de peso corporal. Para isso, 36 ratos machos recém-desmamados foram divididos em 6 grupos (n=6) e tratados por 6 semanas. O grupo controle recebeu água deionizada; o primeiro grupo experimental recebeu água deionizada e uma solução de FeSO₄ a cada dois dias; dois grupos experimentais que receberam 100 mg/L de Pb(C₂H₃O₂)₂ na água de beber, sendo um deles suplementados com FeSO₄ a cada dois dias; dois grupos que receberam a dose de 400 mg/L de Pb(C₂H₃O₂)₂ na água de beber, onde para um deles foi administrado simultaneamente FeSO₄ a cada dois dias. Após a eutanásia, amostras de sangue e fígado foram coletadas para a análise de concentração de Pb por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Também foram coletadas amostras de fígados para análise proteômica por meio de Eletroforese bidimensional associada a espectrometria de massas (2D-PAGE-MS) e para análise histomorfológica. A concentração de Pb no sangue e fígado, apresentou um efeito dose-resposta com uma redução em torno 40-50% de Pb nos grupos suplementados com Fe (não significativo). Alterações histomorfológicas foram observadas em todos os grupos intoxicados. Pela análise proteômica foram identificadas 247 proteínas com expressão alterada em relação ao grupo controle. Foi constatada a diminuição de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase. A redução dessas enzimas leva ao aumento de radicais livres no tecido hepático, e conseqüentemente ao aumento nos níveis de peroxidação lipídica. A peroxidação prejudica a secreção de lipoproteínas, principalmente a liberação a partir do complexo de Golgi, o que pode ter contribuído para alterações observadas em outras proteínas. A presença de Pb em alguns *spots* foi confirmada através da análise por absorção atômica, e isso pode ter resultado em alterações conformacionais que ativam a maquinaria de degradação proteica. Com base nos resultados, o presente estudo reforça o papel deletério do Pb no tecido hepático, mesmo em baixa dosagem, e apesar de o Fe ter sido associado à redução da absorção de Pb, os resultados sugerem que não deve ser utilizado como estratégia de prevenção para reduzir a intoxicação pelo Pb, já que o mesmo também levou a alterações no padrão de expressão proteica.

Palavras chave: Chumbo; Proteoma; Eletroforese bidimensional; Fígado

Abstract

Lead (Pb) is a heavy metal widely distributed in the environment, but it does not have any physiological role in the body. Due to its widespread use in the industry, it provides direct contamination of occupationally exposed people and, indirectly, through pollutants for the general. Thus, Pb contamination has become a public health problem. Studies have linked adverse health effects at low levels of Pb in the blood, even at concentrations below 10µg/dL. The effects range from cognitive impairment in children and peripheral neuropathy in adults, but there is little knowledge about its effects in the liver. It has been reported that iron (Fe) has a protective effect that can help in reducing the absorption of Pb in the body. In this sense, the aim of this study was to evaluate the protein profile and morphology in the liver of rats intoxicated by lead acetate ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) submitted simultaneously to supplementation with iron sulfate (FeSO_4) at 20 mg/Kg body weight. For this, 36 weanling male rats were divided into 6 groups (n=6) and treated for 6 weeks. The control group received deionized water; the first experimental group received deionized water and a solution of FeSO_4 every two days; two experimental groups received 100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ in the drinking water and one of them was supplemented with FeSO_4 every two days; two groups received 400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ in the drinking water, and one of them was supplemented with FeSO_4 every two days. After euthanasia, blood samples and liver were collected for the analysis of Pb concentration by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). Also, liver samples were collected for proteomic analysis using two-dimensional electrophoresis associated with MS (2D-PAGE-MS) and histomorphological analysis. The concentration of Pb in the blood and liver showed a dose-response effect with a reduction in 40-50% Pb in the groups supplemented with Fe (not significant). Histomorphological changes were observed in all intoxicated groups. Proteomic analysis identified 247 proteins with altered expression in relation to the control group. It was observed a decrease in antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. The reduction of these enzymes leads to an increase of free radicals in the liver tissue and consequently to an increase the levels of lipid peroxidation. The peroxidation affects the secretion of lipoproteins, mainly their release from the Golgi complex, which may have contributed to the changes observed in other proteins. The presence of Pb in some spots was confirmed by atomic absorption analysis, and this may have resulted in conformational changes that activate the protein degradation machinery. Based on the results, the present study highlights the deleterious role of Pb in the liver even at low dosage, and although Fe was associated with a reduced absorption of Pb, the results suggest that it should not be used as a prevention strategy to reduce the intoxication by Pb, since itself led to changes in the pattern of protein expression.

Keywords: Lead, Proteomics, two-dimensional electrophoresis; Liver.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	39
1.1 ASPECTOS GERAIS	39
2 REVISÃO DE LITERATURA	43
2.1 METAIS E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS	43
2.1.1 Chumbo	44
2.1.2 Ferro	49
2.1.3 Relação entre chumbo e ferro	50
2.2 FÍGADO	52
2.3 PROTEÔMICA	54
3 OBJETIVOS	59
3.1 GERAL	59
3.2 ESPECÍFICOS	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E EXPOSIÇÃO AO CHUMBO	63
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS	64
4.3 ANÁLISES DE Pb NO TECIDO HEPÁTICO E SANGUE TOTAL	65
4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA	66
4.4.1 Processamento técnico das peças para microscopia de luz	66
4.4.2 Preparo dos cortes em H&E	68
4.4.3 Microscopia de luz (óptica)	69
4.5 ANÁLISE PROTEÔMICA	69
4.5.1 Preparo da amostra	69
4.5.2 Eletroforese bidimensional	72
4.5.2.1 Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)	72
4.5.2.2 Eletroforese SDS-PAGE (Segunda Dimensão)	73
4.5.3 Visualização e análise de imagens	74
4.5.4 Preparo das amostras para espectrometria de massas	75
4.5.5 Identificação dos spots por espectrometria de massas	78
4.5.6 Análise computacional	80
4.6 METALOPROTEÔMICA	80
4.6.1 Determinação de Fe e Pb em spots proteicos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS)	80
4.6.2 Procedimentos analíticos	81

4.6.3 Cálculos estequiométricos	82
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1 MASSA CORPORAL	87
5.2 MASSA DO FÍGADO	88
5.3 ANÁLISES DE Pb NO TECIDO HEPÁTICO E SANGUE TOTAL	89
5.4 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA.....	91
5.5 ANÁLISE PROTEÔMICA	98
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
ANEXO A	179
APÊNDICE A	183

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas do processamento histotécnico. **A)** Diferentes concentrações de álcool etílico e xilol, utilizados nos processos de desidratação e diafanização das peças. **B- E)** Etapas de inclusão do tecido em parafina.....67
- Figura 2.** Microtomia das peças e coloração dos cortes. **A)** Micrótomo (Microm, modelo HM 340 E, Alemanha) utilizado para realização dos cortes histológicos. **B)** Corantes H&E. **C)** Lâminas identificadas com cortes teciduais.....68
- Figura 3.** Homogeneização do tecido hepático em moinho criogênico para posterior extração das proteínas. A - Moinho criogênico; B – Tubo de policarbonato; C - Colocação da amostra no moinho criogênico; D -Colocação do N₂.70
- Figura 4.** Sistema de focalização isoeletrica Ettan IPGphor 3 e Ettan Manifold GE Healthcare, Uppsala, Suécia) carregado com as amostras.72
- Figura 5.** Segunda dimensão em géis SDS-PAGE 12,5% (200mmX 255mmX1,5mm), no sistema Ettan DALTsix (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).74
- Figura 6.** Excisão e recorte dos spots selecionados para espectrometria de massa. Os spots provenientes dos 3 géis obtidos para cada grupo são inicialmente captados com uma ponteira plástica. Depois, são cortados em fragmentos de cerca 1 mm³ com navalha.....76
- Figura 7.** Digestão de proteínas. Soluções de eluição para lavagem dos peptídeos; sonicação (Ultra-Som) e concentrador a vácuo utilizado para secagem.77
- Figura 8.** Gráfico obtido a partir do MASCOT para o spot 276 Controle. A barra presente na área sombreada em verde não foi considerada identificação significativas, pois está abaixo do valor limite. Porém, barras acima do valor limite foram consideradas significativas e provavelmente apresenta coincidência com alguma proteína.79
- Figura 9.** Massa média (\pm DP) do fígado dos animais dos grupos controle e experimentais. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$). $n=5-6$88
- Figura 10.** Gráfico de dispersão das concentrações de Pb para cada indivíduo. Em **a** a variação dos valores das concentrações de Pb no sangue e em **b** no fígado, encontradas para cada grupo.91

Figura 11. Fotomicrografia de tecido hepático; visão geral. A) GC (controle); B) GEI (20 mg/Kg FeSO₄); C) GEII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); D) GEIII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄); E) GEIV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); F) GEV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄). Hematoxilina e Eosina.....94

Figura 12. Fotomicrografia de tecido hepático; observar focos de inflamação (setas). A) GC (controle); B) GEI (20 mg/Kg FeSO₄); C) GEII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); D) GEIII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄); E) GEIV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); F) GEV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄). Hematoxilina e Eosina-400x.95

Figura 13. Fotomicrografia de tecido hepático. Observar: Hepatócitos (HP), hepatócito binucleado (seta), Células de Kupffer (CK), capilares sinusóides (CS), infiltrado inflamatório (círculo), “vacúolos” (seta). A) GC (controle); B) GEI (20 mg/Kg FeSO₄); C) GEII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); D) GEIII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄); E) GEIV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); F) GEV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄). Hematoxilina e Eosina- 1000x.....96

Figura 14. Géis bidimensionais representativos de proteínas hepáticas de ratos, dos grupos, GC (controle); GEI (20 mg/Kg FeSO₄); GEII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); GEIII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄); GEIV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); GEV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄).99

Figura 15. Gráfico representando o número de spots detectados por grupo, nos géis 2D..... 100

Figura 16. Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH3-10, 24 cm, e corados em azul de coomassie coloidal. Os spots circundados em amarelo apresentam diferença de expressão entre os grupos GC (A) e GEII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂) (B)..... 101

Figura 17. Categorização das proteínas identificadas de acordo com os “processos biológicos”, obtido através do ClueGO. **A-** GC x GEI; **B-** GC x GEII132

Figura 18. Categorização das proteínas identificadas de acordo com os “processos biológicos”, obtido através do ClueGO. **A-** GC x GEIII; **B-** GC x GEIV. 133

Figura 19. Categorização das proteínas identificadas de acordo com os “processos biológicos”, obtido através do ClueGO. **A-** GC x GEV; **B-** GEII x GEIII.134

Figura 20. Categorização das proteínas identificadas de acordo com os “processos biológicos”, obtido através do ClueGO. Comparação GEIV x GEV.135

Figura 21. Diagrama esquemático das reações de Fenton e Haber-Weiss. O ferro é um cofactor catalítico potente, que aumenta a produção de radicais de superóxido, que pode causar dano celular (adaptado de ANDERSON e SHAH(2013))......147

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de proteínas no homogenato de tecido hepático, e volume de amostra utilizado para obtenção do pool.....	71
Tabela 2. Programa de aquecimento utilizado na otimização das temperaturas de pirólise e atomização de ferro e chumbo.	82
Tabela 3. Massa média (\pm DP, g) inicial e final dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb e Pb + FeSO ₄	87
Tabela 4. Concentração média (\pm DP) de Pb no sangue (μ g/dL) e fígado (ng/g) dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb ou Pb+FeSO ₄	90
Tabela 5. Perfil quantitativo de spots proteicos, encontrados no fígado de ratos tratados com diferentes concentrações de ferro e acetato de chumbo.....	103
Tabela 6. Relação geral das proteínas encontradas através da abordagem 2D-PAGE-MS	104
Tabela 7. Proteínas com expressão diferencial ($p < 0,05$) em fígados de ratos nas comparações realizadas entre os grupos, identificadas através da abordagem 2D-PAGE-MS.....	118
Tabela 8. Relação de spots proteicos contendo Pb ou Fe.	128

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- < - Menor
- > - Maior
- °C - Graus Celsius
- µg - Micrograma
- µL - Microlitro
- µm - Micrômetro
- µM - Micromolar
- 2D-PAGE - *Two dimensional electrophoresis* (eletroforese bidimensional)
- 2D-PAGE-MS - Eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massas
- AAS – Espectrometria de absorção atômica
- ACN - Acetonitrila
- AmBic - *Ammonium Bicarbonate* (Bicarbonato de amônio)
- ATP - Adenosina trifosfato
- BSA – Albumina do Soro Bovino
- cm - Centímetro
- CHAPS - 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1- propanesulfonate
- CO₂ – Dióxido de Carbono
- DMT1 – Transportador de metal divalente-1
- DNA - Ácido desoxiribonucleico
- DTT - Ditioneitol
- ESI - *Electrospray Ionization* (Ionização por Eletrospray)
- EVA – Etil vinil acetato
- g - Gramas
- GFAAS – Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
- GO - Gene Ontology
- h - Hora
- Hb - Hemoglobina
- HE - Hematoxilina e Eosina
- IAA - Iodoacetamida
- ICP-MS – Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente
- ID - Identificador
- IEF - *Isoelectric focalization* (Focalização isoelétrica)
- IPG - *Immobilized pH gradient* (Gradiente de pH imobilizado)
- KDa - Quilodalton(s)
- Kg - Quilograma
- KV - Quilovolts
- L - Litro
- LC-MS/MS- Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
- M - Molar
- m/z* - Razão entre a massa e a carga

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

mA - Miliamper
mg - Miligramas
mgf – *Mascot Generic Format*
min - Minutos
mL - Mililitros
MM - Massa molecular
mm - Milímetros
mM - Milimolar
MS - *Mass spectrometry* (Espectrometria de massas)
N₂ - Nitrogênio Líquido
n - número de
ng - Nanogramas
nm – Nanômetro
p – Nível de significância
p/v - peso/volume
pI - Ponto isoelétrico
ppm – Parte por milhão
QI – Quociente de inteligência
RNA - Ácido ribonucléico
RP - *Reverse phase* (fase reversa)
rpm - Rotações por minuto
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
TEMED - Tetrametiletenodiamina
TMAH – Hidróxido de tetrametilamônio
TOF - *Time-of-flight* (Tempo de vôo)
UniProt - *Universal Protein Resource*
V - Volts
v/v - volume/volume
W - Watts
α - alfa

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

O chumbo (Pb) é um metal tóxico de ocorrência natural na crosta terrestre e sem função fisiológica no organismo humano (MAINENTI, 2006; MOREIRA, M. F. R. e NEVES, 2008). Uma vez absorvido pela corrente sanguínea, o Pb é distribuído por diversos órgãos e sistemas.

É considerado um dos contaminantes mais comuns do ambiente, devido às inúmeras atividades industriais que favorecem a sua grande distribuição (MOREIRA, F. R. e MOREIRA, 2004a; NAKAMURA, 2002). O principal meio de contaminação é a exposição ocupacional ao chumbo, entretanto, a exposição ambiental passou também a ser alvo de preocupação. Mesmo nos países desenvolvidos, onde a conscientização acerca dos efeitos do Pb no ambiente e na saúde humana tem resultado em esforços para restringir seu uso, a emissão do mesmo na atmosfera em uma escala global ainda é alta (BARANOWSKA-BOSIACKA; GUTOWSKA; RYBICKA et al., 2012). Assim, a comunidade científica nacional e internacional tem buscado estudar as manifestações moleculares, celulares e clínicas que a exposição ao Pb é capaz de ocasionar no homem.

Em 2002, no município de Bauru (SP), ocorreu um acidente ecológico envolvendo uma fábrica de acumuladores elétricos. Não só os trabalhadores foram expostos ao risco do Pb, como também uma extensa área junto a fábrica. Então, inúmeras ações e novas pesquisas começaram a ser desenvolvidas, com a população contaminada, com o intuito de analisar o efeito deste agente tóxico. Em virtude disto, o interesse voltou-se aos estudos experimentais, nos quais, tempo de exposição, dosagem de Pb, ausência e/ou presença de outros agentes concomitantes, entre outros, poderiam ser discutidos para melhor entendimento dos efeitos e possíveis formas de tratamento.

As implicações em saúde pública do aumento da toxicidade do Pb entre pessoas deficientes de ferro (Fe) são substanciais, visto que a deficiência de Fe é a desordem nutricional mais comum no mundo. A suplementação de Fe para

crianças com risco de intoxicação por chumbo tem sido recomendada, no entanto como a sobrecarga de Fe é muito prejudicial, são necessários mais estudos antes de adotar esta medida (AHAMED e SIDDIQUI, 2007).

Tem sido relatado recentemente que, a exposição ao Pb rompe a homeostasia celular do Fe (WANG, Q.; LUO; ZHANG et al., 2007a). Na membrana celular, o Pb produz danos peroxidativos a lipídeos e proteínas. Este efeito parece ser causado por uma combinação de mecanismos, como liberação de Fe (o que, por sua vez, está relacionado à formação de radicais livres), perturbação de mecanismos antioxidantes e efeitos oxidativos diretos do Pb (ADONAYLO e OTEIZA, 1999; VILLEDA-HERNANDEZ; BARROSO-MOGUEL; MENDEZ-ARMENTA et al., 2001).

Alguns estudos correlacionaram efeitos adversos à saúde com níveis cada vez mais baixos de Pb no sangue, até mesmo em concentrações menores do que 10 µg/dL, principalmente em crianças (ATSDR, 1992). O fígado é um órgão central do metabolismo energético, e é de grande importância avaliar quais os efeitos a intoxicação subcrônica pelo Pb produziria no perfil proteico hepático, bem como investigar se a suplementação com Fe poderia reduzir estas possíveis alterações.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METAIS E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Dentre os elementos químicos, os metais são os que constituem o maior grupo e são divididos de acordo com sua importância biológica. Os metais essenciais, como por exemplo Mn (Manganês), Fe (Ferro) e Zn (Zinco), são aqueles com funções biológicas conhecidas e específicas e podem, quando acima de determinadas concentrações, apresentar toxicidade ao organismo (BEVERIDGE; HUGHES; LEE et al., 1997).

Os metais tóxicos, Pb (Chumbo), Hg (Mercúrio) e Cd (Cádmio), são elementos não essenciais, ou seja, que não apresentam função biológica e possuem alta toxicidade quando os valores ultrapassam os de referência (CAMPOS, 1996). Sabe-se que diversos fatores devem ser contextualizados para definir a real toxicidade desses elementos, tais como: concentração, tipo de organismos expostos, capacidade de assimilação dos metais, vias de exposição, entre outros (PEIJNENBURG e JAGER, 2003).

A toxicidade que estes metais exercem na célula é devido à habilidade com que estabelecem pontes estáveis com componentes celulares, podendo causar destruição da membrana citoplasmática e/ou de componentes celulares, através da peroxidação de lipídios, interação com enzimas, prejudicando suas atividades e causar dano direto ao DNA (BEYERSMANN, 1994; GUTTERIDGE; WEST; ENEFF et al., 1990; LE; LIM; HONG et al., 2013; MERZENICH; HARTWIG; AHRENS et al., 2001; ROUCH; LEE e MORBY, 1995; SCHREURS e ROSENBERG, 1982).

Nesse contexto, destaca-se o Pb, um metal tóxico, que é contaminante comum do ambiente, devido à sua ocorrência natural e emprego em diversos setores industriais (JURDZIAK; GAC; MARTYNOWICZ et al., 2015; NAKAMURA, 2002). Portanto, sua extensa utilização proporciona a contaminação direta de pessoas ocupacionalmente expostas (JURDZIAK; GAC; MARTYNOWICZ et al., 2015) e, indiretamente à população em geral (KAUFMANN; CLOUSE; OLSON et al., 2000; SANTANA, 2002).

2.1.1 Chumbo

O chumbo é um elemento químico de símbolo Pb com número atômico 82 e massa atômica igual a 207,2. Pertence ao grupo 14 da classificação periódica dos elementos químicos. É um metal cinza azulado ou cinza prateado e em temperatura ambiente, o chumbo encontra-se no estado sólido. Trata-se de um metal tóxico que ocorre naturalmente na crosta terrestre e foi um dos primeiros metais manipulados pelo homem (DRASCH, 1982; WIWANITKIT e SUWANSAKSRI, 2006). Usualmente encontra-se combinado com dois ou mais elementos para formar compostos de Pb (ATSDR, 2007). Encontra-se em dois estados de oxidação Pb (II) e Pb (IV) que são estáveis, mas no ambiente o elemento predominante é o íon Pb^{+2} . O seu baixo ponto de fusão (327 °C), permitiu que fosse fundido e trabalhado mesmo em sociedades primitivas (ALLOWAY, 1993). Com o passar do tempo, seu uso industrial foi bastante difundido, ou seja, sua incorporação no meio ocupacional passou a ocorrer de forma mais efetiva devido ao fortalecimento dos processos industriais do ramo petrolífero, corantes, tintas, acumuladores, gráfico e bélico (PAOLIELLO, 2001; SILVA, I. F. T. M., 2000). Dessa forma, o Pb participa intensamente do meio em que o homem vive e sua concentração ambiental varia de local para local, e por isso sua toxicidade vem sendo um problema de saúde pública devido à sua persistência no meio (NEEDLEMAN, 2004). Estima-se que, nos últimos 30 anos, grandes quantidades de Pb tenham sido emitidas no ambiente (TAJKARIMI; FAGHIH; POURSOLTANI et al., 2008).

A contaminação pelo Pb pode ser derivada tanto de fatores industriais quanto ambientais (NAKAMURA, 2002). A intoxicação pelo Pb orgânico ocorre principalmente através do chumbo tetraetila e tetrametila, que apresentam características lipossolúveis, sendo facilmente absorvidos pela pele, pelo trato gastrointestinal e pelos pulmões (KLAASSEN, 1991; MOREIRA, F. R. e MOREIRA, 2004a). O Pb orgânico é metabolizado pelo fígado a chumbo triaquil e Pb inorgânico, que são responsáveis pelos efeitos tóxicos no organismo (KOSNETT, 2003). A intoxicação pelo Pb inorgânico por sua vez ocorre predominantemente através da via respiratória, mas também pode ocorrer pelo trato gastrointestinal

(ingestão de água, alimentos contaminados) e pele (compostos lipossolúveis). No organismo, o Pb inorgânico não é metabolizado, e sim, complexado por macromoléculas, sendo absorvido, distribuído e eliminado (MOREIRA, F. R. e MOREIRA, 2004a). As indústrias são a principal fonte de exposição, mas o meio ambiente pode contribuir para intoxicação por este elemento (NAKAMURA, 2002).

A absorção do metal pelo organismo é dependente da concentração, tempo de exposição, propriedades físico-químicas do composto, idade, estado fisiológico do indivíduo e níveis de Ca, Mg, Fe, P e vitamina D presentes na dieta (SILVA, I. F. T. M., 2000; WHO, 1977). Independentemente da via de intoxicação, o Pb, ao atingir a corrente sanguínea, passa a acumular-se no fígado, baço, rins, coração, pulmão, cérebro, músculos e sistema esquelético, sendo os sistemas hematológico, nervoso, renal, gastrintestinal e reprodutor os que sofrem as principais ações deletérias (JACOB, 2000). Necropsias de seres humanos expostos ao Pb indicaram que o tecido hepático é o maior depósito de Pb dos tecidos moles, (33%), seguido pelo córtex renal e medula (LYN, 2006). Nos tecidos moles, a retenção de Pb se estabiliza na vida adulta, podendo até decrescer em alguns órgãos, com o avanço da idade. Porém, o acúmulo permanece ocorrendo nos ossos durante toda a vida, já que os mesmos armazenam cerca de 95 % do conteúdo corpóreo total do metal em adultos (SANIN; GONZALEZ-COSSIO; ROMIEU et al., 1998).

A ingestão humana de metais pesados provenientes do ambiente tem sido foco de contínuo interesse (CELIK; OGENLER e COMELEKOGLU, 2005). A intoxicação se dá de forma lenta e cumulativa, sendo clinicamente conhecida como saturnismo ou plumbismo (SILVA, I. F. T. M., 2000). A exposição ao Pb e sua introdução no organismo, até mesmo em baixos níveis, constitui um sério problema de saúde pública, em consequência à ausência de uma concentração do metal que seja inofensiva (TONG; VON SCHIRNDING e PRAPAMONTOL, 2000).

Tendo como objetivo o estabelecimento de parâmetros para exposição ao Pb, na década de 80, foram normatizados três níveis de exposição, fundamentados na concentração do metal em sangue: 1-Baixa (10 a 20 µg/dL); 2-Moderada (21 a 60 µg/dL), 3-Elevada (acima de 61 µg/dL) (ATSDR, 1988).

A legislação de 1994, mantém-se vigente no Brasil, e estabelece como valor de referência de normalidade a concentração de Pb no sangue igual ou superior a 40 µg/dL até o limite de tolerância biológica permitido, de 60 µg/dL (MINISTÉRIO DO TRABALHO, 1994). Em 1991, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention-CDC*), descreveu os efeitos adversos para a saúde decorrentes de baixas concentrações desse metal no sangue (10 µg/dL), assim propondo a troca do nível de intervenção, na época de 25 µg/dL, para 10 µg/dL (CDC., 1991). Nos últimos anos pesquisas apontaram que concentrações de Pb no sangue entre 10 e 20 µg/dL não são consideradas seguras, tendo sido demonstrada a possibilidade de ocorrência de diversos distúrbios no sistema nervoso central, especialmente em crianças (BELLINGER, 2008; MOSTAFA; EL-SHAHAWI e MOKHTAR, 2009);(MIN; SINGER; KIRCHNER et al., 2009). Alguns estudos correlacionaram efeitos adversos à saúde com níveis cada vez mais baixos de chumbo no sangue, até mesmo em concentrações menores do que 10 µg/dL, principalmente em crianças (ATSDR, 1992). Foram encontrados em crianças com concentração de Pb no sangue entre 3 a 5 µg/dL, distúrbios de cognição, quociente de inteligência (QI), atenção e comportamento (CANFIELD; HENDERSON; CORY-SLECHTA et al., 2003; CHIODO; COVINGTON; SOKOL et al., 2007; CHIODO; JACOBSON e JACOBSON, 2004; LANPHEAR; DIETRICH; AUINGER et al., 2000).

O relatório do Comitê Consultivo sobre Prevenção do Envenenamento por Chumbo em Crianças (*Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention - ACCLPP*) recomenda que não se use mais a expressão "nível de preocupação para chumbo no sangue", por conta da evidência de efeitos deletérios à saúde das crianças com concentrações de Pb no sangue abaixo de 10 µg/dL. Recomenda-se que seja adotado um valor de referência com base no 97,5 percentil da distribuição dos níveis sanguíneos de Pb em crianças com idade entre um e cinco anos, o qual, atualmente, é de 5 µg/dL (ACCLPP, 2012). O CDC revisou este relatório e concorda com as novas recomendações (CDC, 2012).

Para verificar a dose de Pb presente no organismo, são utilizados a urina e/ou sangue, o esmalte dentário (ATSDR, 1999; COSTA DE ALMEIDA; PEREIRA

SARAIVA MDA; BARBOSA et al., 2007; DE ALMEIDA; DE SOUZA GUERRA; TANUS-SANTOS et al., 2008; GOMES; ROSARIO DE SOUSA MDA; BARBOSA et al., 2004; MOREIRA, F. R. e MOREIRA, 2004b; OLYMPIO, K. P.; OLIVEIRA; NAOZUKA et al., 2010; RABINOWITZ, 1995; SILVA, I. F. T. M., 2000) e a saliva do ducto da glândula parótida (BARBOSA; CORREA RODRIGUES; BUZALAF et al., 2006). O sangue é o mais utilizado para esta verificação, porém esta medida aponta somente a exposição ambiental recente, ao contrário do osso, onde pode ser verificada a exposição acumulada (ATSDR, 1999; MOREIRA, F. R. e MOREIRA, 2004a; OLYMPIO, K. P.K, 2009).

Quanto à excreção, as vias urinária e digestiva são as vias primárias de excreção do Pb, seguidas pelas vias secundárias (bile, suor, cabelo, unha, leite materno, entre outras) com menor importância (MOREIRA, F. R. e MOREIRA, 2004a). Cerca de 90% de Pb ingerido é eliminado pelas fezes e urina sob a forma de sulfetos insolúveis.

Clinicamente, os sistemas mais sensíveis são os sistemas nervoso central, hematopoiético, gastrointestinal, cardiovascular, musculoesquelético e reprodutor (BAGCHI e PREUSS, 2005; BECHARA, 2004; MAINENTI, 2006; MOREIRA, F. R. e MOREIRA, 2004b; SILVA, I. F. T. M., 2000). No sistema nervoso, tanto a porção central quanto a porção periférica podem ser acometidas pelo Pb, embora a literatura demonstre que existe uma sensibilidade maior para alterações do sistema nervoso central em crianças (TOSCANO e GUILARTE, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995).

Os principais sintomas ocasionados pela intoxicação por Pb têm sido descritos pela literatura como: quadros de déficits na atenção e vigília, prejuízos cognitivos, alterações na função psicomotora, memória de curto prazo, habilidades visuoespaciais e disfunção de linguagem, além de dores de cabeça, convulsões, diminuição de QI, perda de audição, comportamento agressivo, retardamento mental, dores abdominais e nas articulações, nefropatia, anemia e, eventualmente, morte em crianças com dosagem de Pb acima de 10 µg/dL no sangue (BECHARA, 2004; BELLINGER, 2008; CORDEIRO R, 1996; LIPPMANN, 1990; MORGAN; GARAVAN; SMITH et al., 2001; PAYTON; RIGGS; SPIRO et al., 1998; WHITE; DIAMOND; PROCTOR et al., 1993; WINNEKE; KRAMER; BROCKHAUS et al., 1983).

Segundo Goyer (GOYER, 1996), os efeitos tóxicos do Pb são atribuídos à indução do estresse oxidativo, devido ao Pb prejudicar o balanço pró-oxidante/antioxidante dos tecidos, assim levando ao aparecimento de disfunções fisiológicas, bioquímicas e comportamentais. O acúmulo dos radicais livres, devido ao estresse oxidativo, pode acarretar em danos à estrutura das biomoléculas de DNA, carboidratos, lipídios e proteínas, além de outros componentes celulares (MONTEIRO; BECHARA e ABDALLA, 1991), levando a disfunções e morte celular, especialmente para as células neuronais, consideradas altamente sensíveis a esses radicais livres (ADHIKARI; PENATTI; RESENDE et al., 2006; DEMASI; COSTA; PASCUAL et al., 1997; KIM; LEE; HWANGBO et al., 2003). Assim, existem muitos alvos para ação tóxica do Pb no organismo.

O Pb interfere no funcionamento das membranas celulares e enzimas, formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (grupamentos -SH, -H₂PO₃, -NH₂, -OH), que agem como doadores de elétrons (MOREIRA, F. R. e MOREIRA, 2004b; SARYAN LA, 1994). Portanto as interações bioquímicas do Pb com grupamentos sulfidrilas (-SH), são consideradas importantes toxicologicamente. Por exemplo, se tal interação ocorrer em uma enzima, sua atividade pode ser alterada e resultar em efeitos tóxicos.

Na célula, o Pb tem a habilidade de substituir distintos cátions polivalentes (Ca⁺², Zn⁺², Mg⁺²) em seus sítios de ligação, ou seja, o metal é capaz de inibir ou imitar a ação desses cátions e de interagir com proteínas (GODWIN, 2001), promovendo alterações em diversos processos biológicos considerados importantes, como o metabolismo energético, regulação gênica, apoptose e maturação proteica. Essas alterações podem ser explicadas, em parte, pelas disfunções mitocondriais causadas pelo Pb, haja vista que o início dos processos degenerativos coincide com o fenômeno denominado permeabilidade de transmissão, que está associado a um colapso do potencial da membrana mitocondrial (GILMORE e WILSON, 1999; LIDSKY e SCHNEIDER, 2003).

2.1.2 Ferro

O Fe é elemento essencial na maioria dos processos fisiológicos do organismo humano, desempenhando função central no metabolismo energético celular (AISEN, 1982; GROTO, 2008). Fisiologicamente, é encontrado na forma ferrosa (Fe^{+2}) ou férrica (Fe^{+3}), e por apresentar uma característica química versátil, o Fe, ao transferir elétrons para o oxigênio molecular, é capaz de promover a oxidação de diversas moléculas, bem como causar danos oxidativos celulares. Deste modo, tanto a deficiência quanto o excesso de Fe no organismo são responsáveis por um amplo espectro de doenças, variando desde a anemia até a hemocromatose (SIQUEIRA; ALMEIDA e ARRUDA, 2006). É um cofator importante para enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e na fixação do nitrogênio. Nos mamíferos é utilizado principalmente na síntese da hemoglobina (Hb) nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado (WIJAYANTI; KATZ e IMMENSCHUH, 2004). O organismo de um indivíduo adulto comporta de 4 a 5 g de Fe, sendo cerca de 2,5 g na forma de Hb (FAIRBANKS e BEUTLER, 2001; HOFFBRAND; PETTIT e MOSS, 2006).

Apesar do Fe ser um dos minerais mais abundantes da crosta terrestre, sua deficiência é um dos problemas nutricionais mais comuns, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (MONSEN, 1999). Sua deficiência acarreta consequências para todo o organismo, sendo a anemia a mais relevante. Outras manifestações foram vistas, como o comprometimento do desenvolvimento físico e cognitivo de crianças, aumento da morbidade materna e infantil, redução da capacidade de trabalho do indivíduo e sua resistência imunológica, todos fatores determinantes tanto para o empobrecimento quanto para a redução da qualidade de vida (BEARD e CONNOR, 2003; BOVELL-BENJAMIN e GUINARD, 2003).

Por outro lado, o excesso de Fe é extremamente nocivo para os tecidos, devido a complicações tóxicas desencadeadas pelo seu acúmulo. Por isso a necessidade de um perfeito equilíbrio no metabolismo do Fe, para que essa homeostase possibilite a manutenção das funções celulares essenciais e ao

mesmo tempo evite possíveis danos (GROTTO, 2008). Dentro da homeostase do Fe, os mecanismos de excreção são menos desenvolvidos e eficazes do que aqueles que regulam a absorção e distribuição, onde várias células, hormônios e proteínas transportadoras do Fe estão envolvidas (BEAUMONT C, 2006; DONOVAN; ROY e ANDREWS, 2006).

2.1.3 Relação entre chumbo e ferro

O Pb e o Fe são metais bivalentes que são absorvidos pelo mesmo mecanismo intestinal e ambos podem causar prejuízo quando presentes no organismo ou em excesso, respectivamente. No entanto, estudos não explanam sistematicamente as interações ou os efeitos independentes da exposição ao Pb e Fe, assim como desordens e resultados funcionais, como também os possíveis mecanismos associados (ZHOU; CHEN; FAN et al., 2014).

Ao longo dos anos, pesquisas têm demonstrado haver uma íntima relação entre exposição ao Pb e o metabolismo do Fe em sistemas biológicos, onde a deficiência de Fe pode levar a um aumento da absorção do Pb (BRADMAN; ESKENAZI; SUTTON et al., 2001; WRIGHT; TSAIH; SCHWARTZ et al., 2003), da mesma forma que a suplementação com Fe pode reduzir a absorção de Pb pelo intestino (CHOI e KIM, 2003; HAMMAD; SEXTON e LANGENBERG, 1996; KIM; LEE; HWANGBO et al., 2003). Um estudo onde os autores, avaliaram mulheres grávidas expostas ao Pb, foi relatado que a baixa condição socioeconômica, o hábito de fumar e dieta pobre em cálcio foram alguns dos fatores associados com níveis de Pb mais elevados no sangue. Também relataram que mulheres que complementavam a dieta com Fe e ácido fólico apresentaram menores níveis do metal no sangue (BAGHURST; MCMICHAEL; VIMPANI et al., 1987).

Estudo envolvendo crianças com dieta deficiente em fósforo, cálcio, zinco e Fe demonstraram que a absorção do Pb é influenciada pela deficiência destes elementos. Também foi observado que crianças tendem a apresentar níveis mais elevados de Pb do que adultos, e tal resultado parece estar associado com a deficiência de Fe (ALABDULLAH; BAREFORD; BRAITHWAITE et al.,

2005; MAHAFFEY, 1983; WOLF; JIMENEZ e LOZOFF, 2003). Uma explicação para essa observação citada é que o Fe obtido na dieta é pouco e limitado, uma vez que os seres humanos não possuem uma via fisiológica para excreção. Os enterócitos (células intestinais) são responsáveis pela absorção do Fe, que é transferido através da membrana do enterócito pela proteína transportadora de metal divalente 1 (DMT1) (GUNSHIN; MACKENZIE; BERGER et al., 1997). A DMT1 não é específica para o Fe, podendo transportar uma variedade de íons metálicos divalentes, incluindo cobre, zinco e o Pb. Portanto se o teor de Fe na dieta é baixo, outros íons divalentes podem ser absorvidos, incluindo o Pb. Em 2005, um estudo mostrou que adultos com deficiência de Fe não apresentavam níveis maiores de Pb no sangue que os adultos não deficientes, ambos vivendo no mesmo ambiente. Esses resultados contradizem a teoria da preferência da proteína DMT1 em absorver outros íons metálicos divalentes na ausência de Fe em adultos, embora seja uma teoria relatada em crianças (ALABDULLAH; BAREFORD; BRAITHWAITE et al., 2005).

Alguns pesquisadores relacionam a deficiência de Fe com a condição de aloctrofagia, chamada Síndrome de *Pica*, que é um estranho comportamento caracterizado pelo consumo inapropriado de substâncias não alimentares, sem valor nutritivo (MOORE e SEARS, 1994).

O Pb é capaz de romper a homeostasia celular do Fe, podendo contribuir com o processo de apoptose celular do córtex cerebral, que por sua vez, pode ser causada pela diminuição dos níveis corticais de Fe (WANG, Q.; LUO; ZHANG et al., 2007b). Na membrana celular, o Pb gera danos tanto para lipídeos quanto para proteínas, sendo estes danos, ao que tudo indica, causados por alterações na liberação de Fe e consequente formação de radicais livres, pelos mecanismos que controlam a formação de antioxidantes e pelos efeitos oxidativos do próprio Pb (ADONAYLO e OTEIZA, 1999; VILLEDA-HERNANDEZ; BARROSO-MOGUEL; MENDEZ-ARMENTA et al., 2001).

Em outro estudo, foi mostrada a presença de níveis elevados de Pb em animais com deficiência de Fe, em comparação com grupo controle. O provável mecanismo para maior absorção de Pb, seria a substituição de Fe^{+2} por Pb^{+2} e

o aumento do transporte ativo para o corpo, ou ainda a possibilidade de o Pb^{+2} ocupar o lugar do Fe^{+2} no sistema hematopoiético, reduzindo a excreção de Pb (BRADMAN; ESKENAZI; SUTTON et al., 2001).

2.2 FÍGADO

O fígado é um órgão que possui alta atividade metabólica, sendo essencial na regulação do metabolismo, na síntese de proteínas e de outras moléculas, no armazenamento de proteínas e de Fe, na degradação dos hormônios e na inativação e excreção de drogas e de toxinas (BERNE; LEVY; KOEPPEN et al., 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Recebe diariamente um fluxo de nutrientes e de substâncias potencialmente tóxicas, que chegam a ele pela circulação sanguínea, portanto é localizado como um filtro entre o sistema digestivo e o resto do organismo. Além do sangue rico em oxigênio (arterial), que chega ao fígado pela artéria hepática, o órgão recebe maior parte do seu sangue pela veia porta, sangue proveniente do intestino, baço e pâncreas que depois de passar pelos sinusóides hepáticos, escoam para as veias hepáticas e volta a circulação sistêmica pela veia cava (GUYTON e HALL, 1996).

O fígado é o órgão que recebe as drogas ingeridas, isso se deve a sua localização anatômica e às suas funções fisiológicas e bioquímicas, em função da abundância de enzimas do metabolismo (GRATTAGLIANO; BONFRATE; DIOGO et al., 2009; LEE, 2003; OSTAPOWICZ; FONTANA; SCHIODT et al., 2002). É o maior órgão visceral do corpo, de imensa complexidade e essencial para sobrevivência do homem. Não há outro órgão que possa compensar a sua multiplicidade de funções. O hepatócito, célula hepática predominante, é responsável por regular o metabolismo intermediário, desintoxicar xenobióticos, sintetizar proteínas e lipídeos, além de produzir e excretar a bile (SIRICA; NATHANSON; GORES et al., 2008). Rodeando os hepatócitos, encontramos os capilares sinusóides e vasos linfáticos, fazendo com que o sangue flua livremente para as células e que os

produtos celulares secretados possam ser liberados de volta no sangue ou nos vasos linfáticos (MATTOS e DANTAS-CORRÊA, 2010).

O que determina se um composto irá provocar um efeito tóxico ou não é basicamente o equilíbrio entre a bioativação, detoxificação e os mecanismos de defesa/reparo (WILLIAMS; KITTERINGHAM; NAISBITT et al., 2002). O fígado é um órgão preparado para lidar com as toxinas e impedir ou reduzir os danos causados por intermediários reativos tóxicos. Apesar de muitas vias enzimáticas e não enzimáticas de bioativação estarem presentes no fígado, intermediários reativos podem escapar do processo de desintoxicação e dar início a reações em cadeia de radicais. Estas espécies reativas podem, direta ou indiretamente, causar uma lesão tóxica na célula e iniciar uma reação imunológica mediada (LEE, 2003; WALGREN; MITCHELL e THOMPSON, 2005).

Estudos sobre a hepatotoxicidade potencial do Pb em sistemas de experimentação animal relataram alterações no metabolismo de xenobióticos hepáticos, metabolismo do colesterol, proliferação das células do fígado e síntese de DNA, indicando que o Pb induz a hiperplasia hepática (EPA, 1986; MUDIPALLI, 2007).

Em 2001, pesquisadores avaliaram a relação entre os níveis de Pb sanguíneo e indicadores hematológicos, hepáticos e renais em trabalhadores expostos ocupacionalmente e concluíram que a exposição por longo período ao Pb estimulou a produção de células vermelhas e hematócrito, porém seu efeito sobre as funções hepática e renal não foi elucidado (HSIAO; WU; LAI et al., 2001). Sugere-se que os efeitos desse metal sobre a síntese do grupo heme podem alterar a capacidade funcional do sistema citocromo P-450 hepático para metabolizar drogas (SKERFVING; NILSSON; SCHUTZ et al., 1993; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995).

Atualmente, estudos na área da toxicologia têm proporcionado novos achados sobre a hepatotoxicidade. Os modelos animais são inúmeras vezes utilizados para avaliar determinada condição patológica tal como necrose, hepatite, esteatose, fibrose, cirrose ou malignidade, bem como a hepatotoxicidade. Assim, a utilização desses modelos para estudar como a

intoxicação por Pb pode afetar o tecido hepático, bem como a relação entre Pb e Fe no processo de intoxicação, poderia contribuir para melhor entendimento dos processos biológicos que poderiam ser afetados pela intoxicação por Pb.

2.3 PROTEÔMICA

A proteômica é uma área da Ciência que começou em 1994 quando Marc Wilkins usou o termo “Proteoma” (conjunto de PROTEÍNAS codificadas pelo genOMA) em público pela primeira vez (BLACKSTOCK e WEIR, 1999; WILKINS; SANCHEZ; GOOLEY et al., 1996). O termo proteoma faz referência a um conjunto de proteínas que está sendo expresso num dado momento da vida celular de um organismo a partir de uma sequência de nucleotídeos do DNA (ABBOTT, 1999). Segundo (BLACKSTOCK e WEIR, 1999), o objetivo da proteômica é estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína e mecanismos regulatórios, utilizando as ferramentas de espectrometria de massas que evoluíram a tal ponto que possibilitaram estas análises. Existem várias definições para a proteômica, que pode ser definida simplesmente como a ferramenta para estudar o proteoma.

A importância de estudos proteômicos na pesquisa pode ser entendida quando se observam os diferentes estágios do ciclo de vida em insetos. Com os mesmos genes, o inseto tem diferentes morfologias em estágios distintos de seu ciclo vital. As distinções morfológicas que acompanham as diferentes funções celulares e das organelas são diretamente determinadas por uma variação no proteoma, e não pelo genoma, pois aquele pode ser alterado por várias modificações pós-tradução (THONGBOONKERD; KLEIN e KLEIN, 2004). Através destas modificações, várias proteínas funcionalmente distintas podem ser geradas a partir de um único gene. Neste sentido, a proteômica complementa as informações obtidas através da genômica. Os perfis proteicos expressos em diferentes condições fisiológicas ou patológicas são então comparados, e as informações deste tipo de estudo permitem a identificação de proteínas de

transdução de sinal ou ainda a identificação de proteínas específicas de estados patológicos e fisiológicos (GRAVES e HAYSTEAD, 2002).

O rápido progresso da proteômica nos últimos anos é baseado no sucesso de três fatores: a genômica, especialmente quando se considera que o projeto genoma humano e de outras espécies está completo ou quase completo; a separação de proteínas por métodos com ou sem gel; e a espectrometria de massas (MS) (PIERCE e CAI, 2004; THONGBOONKERD; KLEIN e KLEIN, 2004). Os dados obtidos a partir da análise proteômica são complementares àqueles obtidos através da análise genômica e outros estudos "ÔMICOS" (como transcriptômica, metabolômica, interatômica, metaloproteômica, etc.). Todos estes campos "ÔMICOS" servem como peças individuais do quebra-cabeça, a fim de se construir uma imagem dinâmica da biologia e fisiologia de células, tecidos e órgãos.

Uma das ferramentas mais utilizadas em análise proteômica é a eletroforese bidimensional (2D-E) que separa as proteínas com base nas suas duas principais características, o peso molecular e ponto isoelétrico e por isso chamada de bidimensional. Na primeira dimensão, denominada focalização isoelétrica (IEF), as proteínas, que dependendo de sua estrutura primária (dos aminoácidos que a compõe) e do pH do meio podem apresentar carga líquida positiva, negativa ou neutra, são submetidas a uma separação horizontal em uma tira de gel de poliacrilamidas contendo um gradiente de pH imobilizados (*immobilized pH gradient - IPG*), e sob a influência de um campo elétrico, as proteínas irão migrar para a posição do gradiente na qual sua carga líquida será zero, focalizando-se neste ponto, onde o valor de pH é numericamente igual ao pI. Posteriormente, a tira contendo as proteínas previamente separadas é transferida para um gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que sob influência de um campo elétrico, irá separar as proteínas de acordo com suas massas moleculares (MM) relativas. Essa metodologia foi desenvolvida de modo independente por Klose e O'Farrel e a época foi considerada uma poderosa ferramenta para análise e detecção de complexos proteicos a partir de diferentes fontes biológicas (KLOSE e SPIELMANN, 1975; O'FARRELL, 1975). A 2D-E permite o estudo do perfil proteico que compõe uma

amostra biológica, bem como modificações no padrão de expressão e modificações pós-traducionais (HECKER; BECHER; FUCHS et al., 2010).

Em relação à caracterização e identificação de proteínas, de maneira geral, a Espectrometria de Massas (MS) é uma técnica que mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa por meio de um espectrômetro de massas, que pode ser considerado uma “balança molecular”, cuja finalidade é medir a massa de átomos e moléculas com extrema precisão. O equipamento é basicamente dividido em três partes: uma fonte de ionização, um analisador e um detector, sendo que a molécula a ser analisada percorre obrigatoriamente este caminho, nesta ordem (DASS, 2007).

A utilização da proteômica para estudos envolvendo toxicologia tem se tornado cada vez mais comum, e atualmente é um campo conhecido como toxicoproteômica. A toxicoproteômica tem como objetivos aprofundar a compreensão dos mecanismos toxicopatológicos bem como buscar alterações de proteínas que atuam como biomarcadores de toxicidade química (WETMORE e MERRICK, 2004).

Outro campo que vem ganhando destaque é a metaloproteômica, cujo objetivo é entender os aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas responsáveis pelo transporte de íons metálicos nos organismos vivos (GARCIA; MAGALHAES e ARRUDA, 2006; HARAGUCHI, 2004). Ela integra estudos analíticos e bioquímicos, contemplando o fracionamento e a caracterização de proteínas associadas a metais, procurando compreender o papel dos íons metálicos em sistemas biológicos, mais especificamente o seu papel em relação às proteínas (BRAGA; BITTARELLO; PADILHA et al., 2015). Além das ferramentas clássicas em proteômica, a metaloproteômica utiliza-se da espectrometria de absorção atômica (AAS) e ICP-MS (espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente), ambas utilizadas para determinações quantitativas de elementos metálicos (KRUG, 2004; LAJUNEN e PERÄMÄKI, 1992)..

A utilização da proteômica para avaliar a toxicidade do Pb vem sendo utilizada para buscar biomarcadores que ajudem a monitorar indivíduos expostos a este elemento. Nesse sentido, a proteômica poderia ajudar a identificar

proteínas relacionadas a hepatotoxicidade do Pb bem como ajudar a entender o possível papel protetor do Fe.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos da intoxicação pelo Pb em fígado de ratos submetidos a intoxicação por este metal, bem como a possível prevenção destes efeitos pela exposição simultânea com Fe.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil proteico em fígado de ratos por meio de eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massas após a exposição;
- Avaliar possíveis modificações morfológicas do tecido hepático dos animais.
- Avaliar a relação entre a dose de Pb administrada e os seus possíveis efeitos.

Material & Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E EXPOSIÇÃO AO CHUMBO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, atendendo pelo protocolo 012/2011 (ANEXO A).

Primeiramente um projeto piloto foi realizado a fim de estabelecer a relação entre o Pb administrado em água e a concentração do metal no sangue, sendo esperados valores em torno de 10 µg/dL e 30 µg/dL para as dosagens na água de 100 mg/L e 400 mg/L de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, respectivamente.

O estudo foi realizado com um total de 36 ratos machos recém-desmamados (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), oriundos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru-Universidade de São Paulo (FOB-USP), e foram divididos em seis grupos de seis animais cada. Os animais foram mantidos durante seis semanas em gaiolas metabólicas, numa sala com um ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro, temperatura e umidade controladas e livre acesso a uma dieta industrializada (ração) da marca Purina, que apresenta baixa quantidade de Pb em sua composição (0,36 mg/kg), não interferindo nos resultados. Todos os grupos tiveram livre acesso à água de beber pré-preparada, durante as seis semanas. A água de beber foi preparada pela dissolução de acetato de chumbo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) em água destilada e deionizada em duas concentrações distintas de 100 mg/L e 400 mg/L, sendo analisada para confirmação das concentrações por meio de espectrometria de absorção atômica (AAS), utilizando forno de grafite. De acordo com (WANG, Q.; LUO; ZHANG et al., 2007a), espera-se que a dose mais alta produza níveis de Pb no sangue em torno de 30 µg/dL, e a dose mais baixa produza níveis de Pb no sangue em torno de 10 µg/dL. Esta última dose, de acordo com o *Centers for Disease Control* (CDC), corresponde ao nível aceitável de Pb no sangue.

Os seis grupos de animais foram nomeados e divididos recebendo os seguintes tratamentos:

- grupo controle (GC): composto por seis animais que receberam apenas água de beber deionizada, além de gavagem gástrica com água deionizada a cada dois dias;
- grupo experimental I (GEI): composto por seis animais que receberam água de beber deionizada e gavagem gástrica a cada dois dias com 20 mg/Kg de FeSO₄.
- grupo experimental II (GEII): composto por seis animais que receberam 100 mg/L de Pb(C₂H₃O₂)₂ em água de beber e concomitantemente, a cada dois dias, água deionizada por gavagem gástrica;
- grupo experimental III (GEIII): composto por seis animais que receberam que receberam 100 mg/L de Pb(C₂H₃O₂)₂ em água de beber e concomitantemente, a cada dois dias, por gavagem gástrica, uma solução de FeSO₄ na dose de 20 mg/kg de peso corporal;
- grupo experimental IV (GEIV): composto por seis animais que receberam 400 mg/L de Pb(C₂H₃O₂)₂ em água de beber e concomitantemente, a cada dois dias, água deionizada por gavagem gástrica;
- grupo experimental V (GEV): composto por seis animais que receberam 400 mg/L de Pb(C₂H₃O₂)₂ em água de beber e concomitantemente, a cada dois dias, por gavagem gástrica, uma solução de FeSO₄ na dose de 20 mg/kg de peso corporal.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Ao final do período experimental (6 semanas), os animais foram pesados e anestesiados pela administração intramuscular de Dopalen (cloridato de quetamina) e Anasedan (cloridato de xilazina) (1:1), dosado de acordo com o peso corporal do animal na proporção de 0,14mL/100g de peso. Em seguida, a cavidade peritoneal e depois a torácica foram expostas, e o coração foi puncionado para coleta do sangue em tubos *trace Royal blue BD Hemogard* (BD

Vacutainer®, USA), em seguida armazenados a -20 °C para posterior determinação de Pb sanguíneo.

Posteriormente à punção cardíaca, os fígados foram rapidamente coletados e pesados, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, para posterior análise proteômica, bem como da concentração de Pb. O lobo esquerdo foi destinado à análise histológica, para a qual foi fixado em formalina 10% tamponada.

4.3 ANÁLISES DE Pb NO TECIDO HEPÁTICO E SANGUE TOTAL

A realização das análises foi no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Para tanto, foi utilizado um Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado, equipado com uma célula de reação (DRC-ICP-MS ELAN DRCII, Perkin Elmer, Sciex, Norwalk, CT, EUA), operando com argônio de alta pureza (99,999%, Praxair, Brasil) e H₂/Ar (5/95%) como gás de reação (99,999%, Praxair, Brasil), conforme descrito por (BATISTA; GROTTTO; RODRIGUES et al., 2009). Em resumo, as amostras e materiais de referência certificados (CRMs) (aproximadamente 75 mg) foram pesados em tubos Falcon® de polipropileno de 15 mL (Becton Dickinson). Então, 1 mL de solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) foi adicionado às amostras e incubado à temperatura ambiente por 12 h num homogenizador rotacional. Após solubilização, o volume foi trazido para 10 mL com uma solução diluída contendo HNO₃ 0,5% (v/v), 10 µg/L Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). Padrões de calibração analíticos foram preparados numa concentração variando entre 0 e 20 µg/L, num diluente contendo TMAH 5% (v/v), HNO₃ 0,5% (v/v), 10 µg/L Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). O limite de detecção para o Pb foi de 0.0066 µg/L.

Para as amostras de sangue, 200µL de cada amostra foram colocadas em tubos Falcon® de polipropileno de 15 mL (Becton Dickinson), para um volume final de 10 mL (diluição de 50 vezes) com uma solução contendo HNO₃

0,5% (v/v), 10 µg/L Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). Padrões de calibração analíticos foram preparados numa concentração variando entre 0 e 20 µg/L, no mesmo diluente. A curva foi feita por ajuste de matriz, a qual continha os padrões de calibração, sangue ovino diluído 50 vezes (sangue base) e diluente.

Após a preparação da amostra, a mesma foi diretamente injetada no equipamento. O controle de qualidade para as análises de Pb foi certificado através da análise de materiais de referência do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia americano (NIST 955c). Ademais, outros materiais de referência fornecidos tanto pelo Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque (NYSDOH programa de teste de proficiência para elementos traço em sangue total) quanto pelo Instituto Nacional de saúde Pública de Quebec, Canadá (INSP – esquema de análise de qualidade externa (EQAS) para elementos traço no sangue) foram também analisados.

4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA

4.4.1 Processamento técnico das peças para microscopia de luz

Foram utilizados os lobos esquerdos para a realização do processamento, onde os mesmos foram fixados em solução de formalina 10% tamponada, por 7 dias, à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados em água corrente e processados histologicamente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2010), com desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) em 3 banhos de 40 minutos cada para posterior impregnação (embebição) e inclusão em Histosec® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) fundida na estufa a 60 °C (Figura 1).

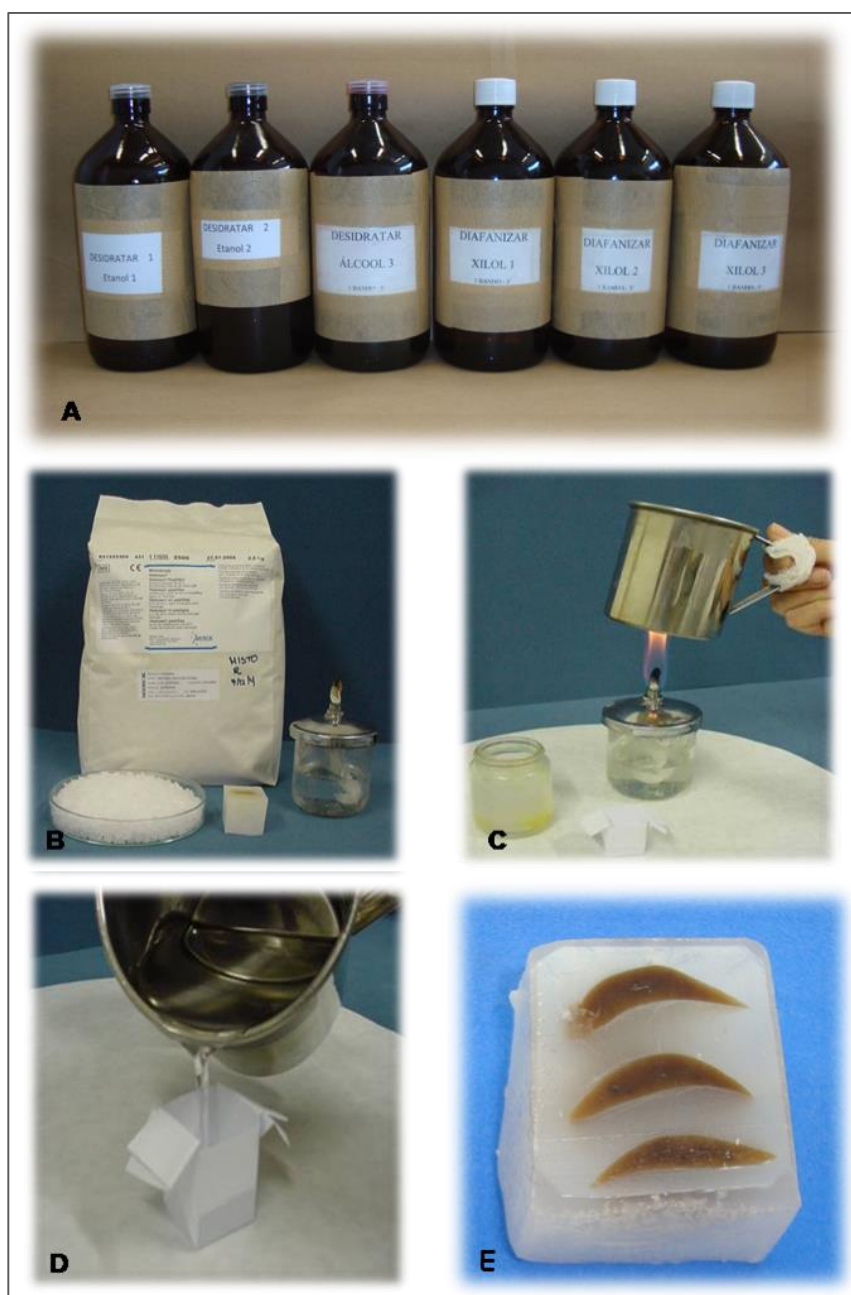


Figura 1. Etapas do processamento histotécnico. **A)** Diferentes concentrações de álcool etílico e xilol, utilizados nos processos de desidratação e diafanização das peças. **B- E)** Etapas de inclusão do tecido em parafina.

Para a microtomia foram realizados cortes semi-seriados de 5 μm de espessura, obtidos em micrótom (Microm, modelo HM 340 E, Alemanha) (Figura 2), colocados sobre lâminas convencionais, os quais foram corados pela técnica da Hematoxilina - Eosina (LUNA, 1968).



Figura 2. Microtomia das peças e coloração dos cortes. **A)** Micrótopo (Microm, modelo HM 340 E, Alemanha) utilizado para realização dos cortes histológicos. **B)** Corantes H&E. **C)** Lâminas identificadas com cortes teciduais.

4.4.2 Preparo dos cortes em H&E

A coloração para H&E consistiu em banhos seriados dos cortes selecionados e capturados em lâminas convencionais. Os tratamentos, realizados em um único dia, consistiram de: três banhos em xilol por 15 min cada, para desparafinizar os cortes; três banhos em etanol absoluto de 5 min cada; um banho em etanol 70% de 5 min, para hidratar a amostra; lavagem em água corrente por 10 min; um banho em corante hematoxilina por 30 segundos; lavagem em água corrente por 10 min; um banho em corante eosina por 70 segundos; lavagem em água corrente; um banho rápido em etanol 70%; dois banhos rápidos em etanol absoluto; dois banhos em etanol absoluto por 2 min cada, para desidratar os cortes; diafanizados em três banhos em xilol de dois min e finalizando com a adesão da lamínula nos cortes, com resina Enterlan® (Merck KGaA, Frankfurter, Darmstadt – Germany).

4.4.3 Microscopia de luz (óptica)

Após a coloração, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz (óptico) e fotografadas através de sistema de microfotografia (microcomputador com o software de captura e análise de imagem *Image Pro-Plus 6.0*, acoplado ao microscópio óptico Olympus BX-50).

4.5 ANÁLISE PROTEÔMICA

4.5.1 Preparo da amostra

Para a aquisição de géis com boa qualidade, o preparo da amostra deve resultar na completa solubilização, desagregação, desnaturação e redução das proteínas presentes na amostra. Para isto, as amostras foram homogeneizadas em moinho criogênico, modelo 6770 Freezer Mill (Spex, Metuchen, NJ, EUA) (figura 3 A). As amostras foram fracionadas em fragmentos de um centímetro de acordo com a orientação dos fabricantes, colocadas em tubos de policarbonato (figura 3 B), e então, os fragmentos foram triturados com 15 batimentos por segundo, 2 ciclos de 2 min com 1 min de intervalo e um pré congelamento de 1 min proporcionado pelo nitrogênio, que previne a degradação de componentes da amostra, mantendo em baixa temperatura (figura 3 C e D). Ao final do processo, obtiveram-se amostras pulverizadas e com aspecto homogêneo.

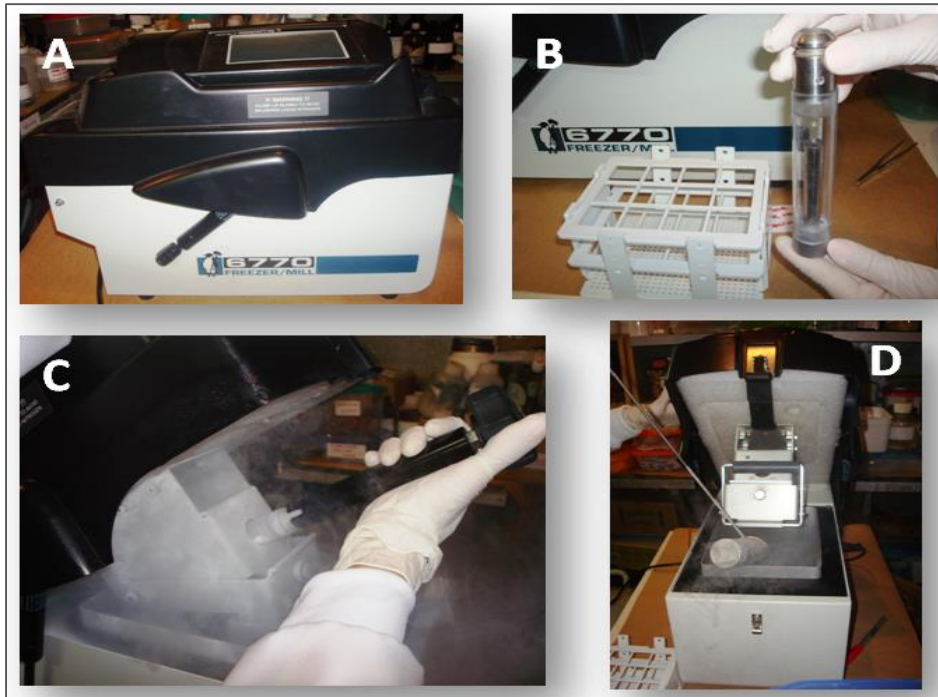


Figura 3. Homogeneização do tecido hepático em moinho criogênico para posterior extração das proteínas. A - Moinho criogênico; B – Tubo de policarbonato; C - Colocação da amostra no moinho criogênico; D - Colocação do N₂.

Cerca de 100 mg de amostras pulverizadas foram transferidas para um microtubo e em seguida foram adicionados 500 μ L de tampão de extração contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, ditiotreitól (DTT) 1%, anfólitos carregadores 0,5% pH3-10 e um coquetel de inibidores de proteases, sendo incubados em gelo por 1 h. Após incubação o homogenato foi centrifugado (Eppendorf) a 8000 g por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado (GE-HEALTHCARE, 2004).

A fim de remover o excesso de sais, açúcares, ácidos nucleicos e lipídeos, utilizou-se o kit *PlusOne 2D Clean-up* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), que contém agentes precipitantes e coprecipitantes, capazes de precipitar e remover impurezas das amostras de maneira eficiente. Após a extração, 200 μ L da amostra extraída foram transferidos para um microtubo e os procedimentos para a precipitação foram realizados conforme recomendações do fabricante. Todas as etapas foram realizadas em gelo para evitar danos a amostra. Após precipitação e limpeza, o *pellet* obtido foi ressuspenso em 200 μ L de solução de

reidratação contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2%, anfólito carreador pH 3-10 0,5% e 0,002 % de azul de bromofenol, e no momento do uso, foram adicionados DTT (30mM) para cada 2,7 mL de tampão de reidratação.

As proteínas foram quantificadas utilizando-se o kit *Quick Start™ Bradford Protein Assay* (Bio-rad, Hercules, CA, EUA), baseado no método de Bradford (BRADFORD, 1976), em triplicata. Para cada reação utilizou-se 1 µL de amostra e 250 µL do reagente de coloração e após incubação por 5 min em temperatura ambiente, as absorbâncias foram determinadas a 595 nm em leitor de microplaca (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech). As concentrações proteicas foram calculadas pela comparação com uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de proteína de soro bovino (BSA). Posteriormente a quantificação, cerca de 1000 µg de proteínas de cada um dos seis animais de cada grupo foram combinadas para formar um *pool*/por grupo, totalizando 6 amostras (uma de cada grupo) a serem carregadas na eletroforese bidimensional. Tal procedimento foi realizado para minimizar a variabilidade individual (TILTON; HAIDACHER; LEJEUNE et al., 2007). Novamente foi feita a quantificação de proteínas, como descrito anteriormente. As concentrações de proteína em µg/µL encontradas para cada amostra de tecido hepático estão demonstradas na terceira coluna da tabela 1 e os volumes de amostra aplicados nos géis, na quarta coluna.

Tabela 1. Concentração de proteínas no homogenato de tecido hepático, e volume de amostra utilizado para obtenção do pool

GRUPOS	A _{595nm}	[proteína] µg/µL	Vol. (µL) p/ 1000 µg
GC	0,601	992,83	20,14
GE I	0,636	1057,05	18,92
GE II	0,608	1006,60	19,87
GE III	0,667	1113,93	17,95
GE IV	0,691	1158,88	17,26
GE V	0,679	1136,86	17,59

GC- Grupo controle; GEI-20 mg/Kg FeSO₄; GEII-100 mg/L Pb(CH₃COO)₂; GEIII-100 mg/L de Pb (CH₃COO)₂ +20 mg/Kg de FeSO₄; GEIV- 400 mg/L Pb(CH₃COO)₂; GEV- 400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂+ 20 mg/Kg de FeSO₄.

4.5.2 Eletroforese bidimensional

4.5.2.1 Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)

A caracterização das proteínas presentes na amostra foi realizada com tiras IPG de 24 cm e gradiente de pH 3-10 (GE Healthcare). Para isso, as fitas IPG foram cuidadosamente posicionadas no *strip holder* e reidratadas durante 14 h a 20°C em 450 µL de solução de reidratação contendo aproximadamente 1000 µg de proteínas. Sobre as fitas IPG foi acrescentado 3 mL de óleo mineral (*cover fluid*, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) para evitar evaporação dos reagentes durante o processo de reidratação. As proteínas foram primeiramente separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), através de focalização isoelétrica (IEF), utilizando o sistema *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), figura 4. A focalização isoelétrica foi realizada nas seguintes condições: 500 V por 1 h, 1.000 V por 1 h e, por fim, 10.000 V até atingir 40.000 V.

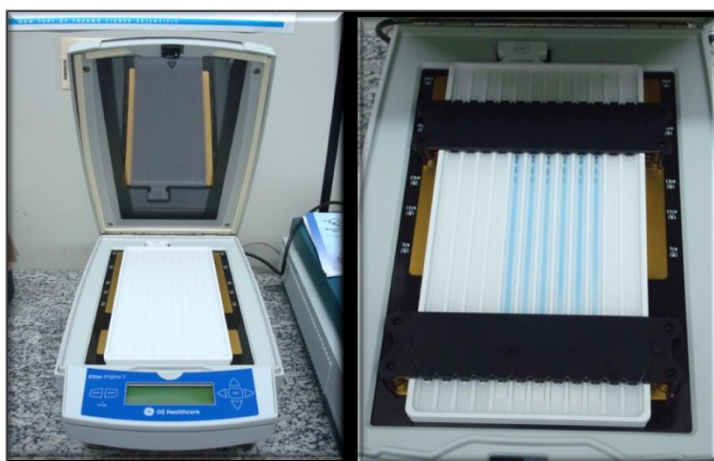


Figura 4. Sistema de focalização isoelétrica *Ettan IPGphor 3* e *Ettan Manifold* GE Healthcare, Uppsala, Suécia) carregado com as amostras.

4.5.2.2 Eletroforese SDS-PAGE (Segunda Dimensão)

Após a focalização, as tiras foram removidas do *manifold*, lavadas individualmente com tampão SDS 1% e foram equilibradas em duas etapas, uma solução tampão de equilíbrio (uréia 6 M, Tris-HCl 75 mM, Glicerol 29,3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%), contendo 1% (p/v) DTT (reduzidor), por 20 minutos, e em seguida, para alquilação, no mesmo tampão contendo 2,5 % (p/v) de iodoacetamida (IAA) por 20 minutos.

A eletroforese de segunda dimensão foi realizada em gel vertical homogêneo de 12,5% de acrilamida (255 mm X 200 mm X 1,5 mm). Depois de equilibradas, reduzidas e alquiladas, as tiras foram inseridas sobre o gel de acrilamida e fixadas com uma solução pré-aquecida de 0,5% (p/v) de agarose solubilizada em tampão de corrida Laemmli (LAEMMLI, 1970). Foi utilizado padrão de ampla faixa de massa molecular (14 a 200 KDa, *Broad range molecular weight*, Bio-rad). A separação eletroforética das proteínas foi conduzida no sistema *Ettan DALTsix* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) a 20 °C (Figura 5), proporcionando maior agilidade e precisão nas análises, já que o aparelho permite a corrida de até seis géis distintos, diminuindo as diferenças verificadas quando géis 2-DE são obtidos individualmente ou em duplicatas. No primeiro estágio será utilizado-se uma corrente fixa de 80 V, 15 mA/gel e 100 W por 1 h, para migração das proteínas da tira IPG para o gel. Já no segundo estágio, a corrida foi conduzida com corrente constante de 500 V, 60 mA/gel e 100 W a 20°C, até que o azul de bromofenol atingisse o fundo do gel (aproximadamente 5 h).

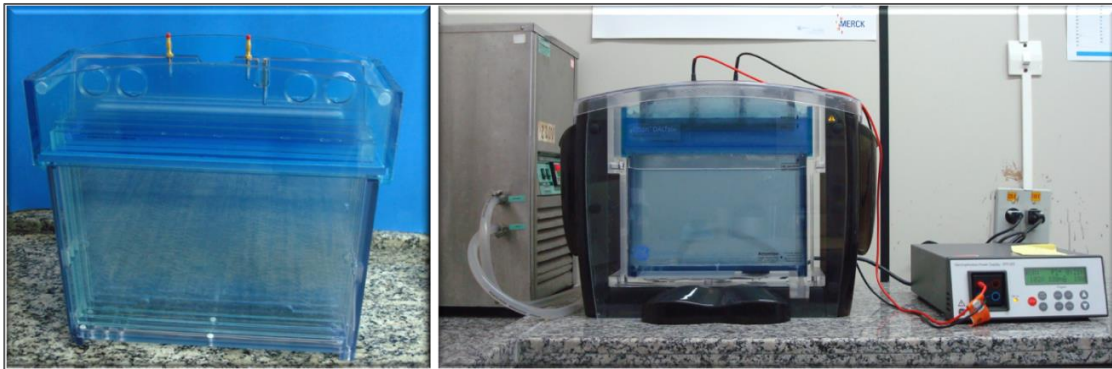


Figura 5. Segunda dimensão em géis SDS-PAGE 12,5% (200mmX255mmX1,5mm), no sistema Ettan DALTsix (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

4.5.3 Visualização e análise de imagens

Ao final da corrida, o gel foi colocado em solução fixadora (NEUHOFF; AROLD; TAUBE et al., 1988) contendo ácido fosfórico 1,3% e metanol 20% durante 1 h, para prevenir a mobilidade das proteínas no gel e lavar os anfólitos. Então, os mesmos foram lavados com água deionizada e deixados por 24 h em solução de coloração contendo 10% de ácido fosfórico, 10% de sulfato de amônio, 0,12% de *Coomassie Brilliant Blue G-250* e 20% de metanol. As proteínas separadas por 2DE foram visualizadas através dessa coloração por *Coomassie Brilliant Blue G-250* (USB, Cleveland, OH, EUA), realizada de acordo com o protocolo de Candiano e colaboradores (CANDIANO; BRUSCHI; MUSANTE et al., 2004). Por fim, os géis foram lavados com água deionizada e armazenados em solução de ácido acético 5%. Os géis corados foram digitalizados com resolução de 300 dpi com auxílio do programa *LabScan 6.0* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) no *scanner* modelo *ImageScanner™ III* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

Para a análise das imagens, foi adotado o programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A detecção dos *spots* e a determinação do seu volume foram realizadas de modo automático e utiliza os parâmetros área mínima (delimitação física gerada pelo *spot*), *smooth* (intensidade, gerada em *pixels*) e *saliência* (curvatura do *spot*). Neste estudo, foram adotados os seguintes parâmetros: fator *smooth* = 4, área mínima = 5 e *saliência* = 220. Dentro de cada grupo, o gel com o maior número de *spots* foi escolhido como gel de referência e em seguida foi efetuado o pareamento dos

géis com o de referência. Após esse passo, foram realizadas correções com a adição e remoção manual dos *spots*. Com as correções devidamente efetuadas, procedeu-se à análise das classes, que forneceu a diferença estatística entre os grupos experimentais.

Pelo programa também foram estimados os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada *spot*. Para determinar diferenças na expressão proteica, foram consideradas as alterações no valor de % de volume. O uso da % de volume implica na normalização do *spot*, pois para calcular a % de volume, considera-se o volume total de todos os *spots* no gel. Assim, minimizam-se as variações decorrentes da quantidade de proteína aplicada e do procedimento de coloração.

4.5.4 Preparo das amostras para espectrometria de massas

Após análise pelo *software*, os *spots* selecionados foram excisados dos géis e preparados para espectrometria de massas de acordo com Andrade (ANDRADE, 2006). Para isso, duas folhas brancas de EVA (*Ethylene Vinyl Acetate*) foram coladas sobre uma bancada com boa iluminação, e em cima destas, foram posicionadas três placas de vidro. As triplicatas de cada grupo foram então posicionadas sobre cada placa e os *spots* foram excisados com o auxílio de ponteiros universais de 1000 μL e 200 μL , das quais as pontas foram retiradas em diferentes alturas para proporcionar diferentes diâmetros (Figura 6). Em seguida, os mesmos foram cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm^3 , transferidos para tubos de 2,0 mL contendo 200 μL de ácido acético 5% e armazenados a 4 °C até o passo seguinte.

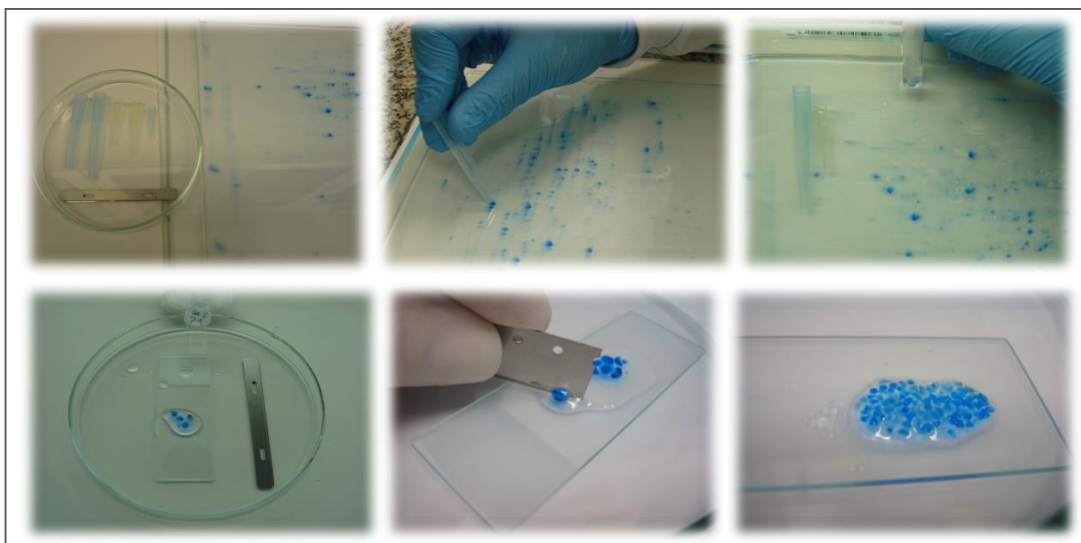


Figura 6. Excisão e recorte dos spots selecionados para espectrometria de massa. Os spots provenientes dos 3 géis obtidos para cada grupo são inicialmente captados com uma ponteira plástica. Depois, são cortados em fragmentos de cerca 1 mm³ com navalha.

Para a retirada do corante, ou seja, para que os segmentos de gel ficassem totalmente transparentes, os mesmos foram lavados no mínimo por três vezes, em uma solução contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AMBIC) 25 mM por 30 minutos. Subsequentemente, os mesmos foram desidratados duas vezes em ACN 100% por 10 minutos. Ao final da segunda desidratação, a ACN foi removida e o resíduo remanescente deixado evaporar em temperatura ambiente.

Depois de desidratados, os *spots* foram submetidos à redução e alquilação. Para isso, foram inicialmente reidratados com a solução redutora com DTT 20 mM em AMBIC 50 mM e incubados por 40 minutos a 56 °C. O excesso de líquido foi removido e substituído por IAA 55 mM em AMBIC 50 mM. Após 30 minutos no escuro, em temperatura ambiente, o líquido foi removido, os fragmentos lavados em AMBIC 25 mM e em seguida desidratados em ACN 100%. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel deixado evaporar em temperatura ambiente.

Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados com 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina (*Trypsin Gold Mass Spectrometry*, Promega, Madison, WI, EUA) em AMBIC 25 mM por 15 minutos para que a

tripsina pudesse penetrar no gel. Em seguida, adicionaram-se 50 μ L de AMBIC 25 mM para total cobertura dos *spots*, incubou-se posteriormente a 37 °C por 14 h. Após as 14 h, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 μ L de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 15 minutos com solução de eluição A (ACN 50% v/v e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 minutos com solução de eluição B (metanol 60% v/v e ácido fórmico 1% v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%, a 45 °C sob sonicação (Figura 7). O aparelho de sonicação usado foi um ULTRA-SOM de banho (*Branson*, modelo 2510, Danbury, CT, EUA) com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida à secagem em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) à temperatura ambiente, por 2-3 h e então o tubo foi armazenado a -20 °C até a realização do sequenciamento.

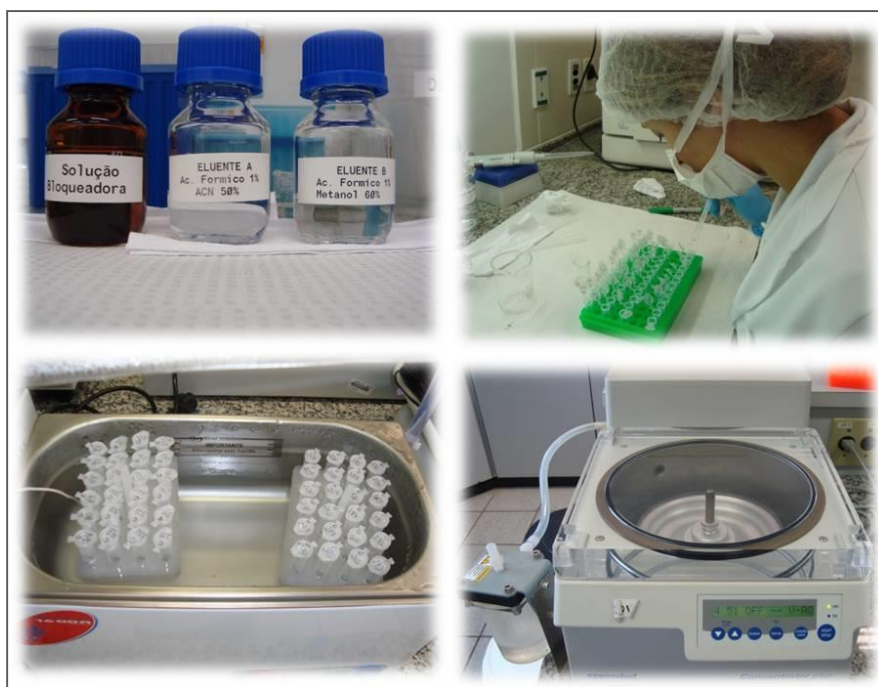


Figura 7. Digestão de proteínas. Soluções de eluição para lavagem dos peptídeos; sonicação (Ultra-Som) e concentrador a vácuo utilizado para secagem.

4.5.5 Identificação dos *spots* por espectrometria de massas

Os peptídeos foram solubilizados em 12 μ L de ácido fórmico 0,1% e transferidos para tubos específicos para realização da espectrometria de massas. Parte do sequenciamento das proteínas foi conduzido na plataforma LC-MS/MS NanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA), acoplada a uma fonte *nanoelectrospray* no espectrômetro de massas *Q-ToF Ultima* (Waters, Milford, MA, EUA), disponível no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas, SP. Os espectros foram adquiridos usando o *software* MassLynx v.4.1 e os arquivos brutos foram convertidos para o formato específico (.mgf) através do *software* Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.), e submetidos à base de dados *Rat International Protein Database* v3.86 (39917 sequences; 21244696 residues) usando a ferramenta de busca MASCOT v.2.3.01 (Matrix Science Ltd), cujo resultado é apresentado na forma de *score* e indica a probabilidade do *match* não ser um evento aleatório. Assim, o resultado foi fornecido na forma de um gráfico de barras, no qual existe um valor limite (*score* limite), e quando os *matches* estão acima deste valor, considera-se que a probabilidade deste evento ser randômico é muito baixa (<5%). Então, adotou-se como critério um valor limite igual ou superior a 60, conforme ilustrado na Figura 8, que mostra o gráfico referente ao *spot* 274 do grupo Controle.

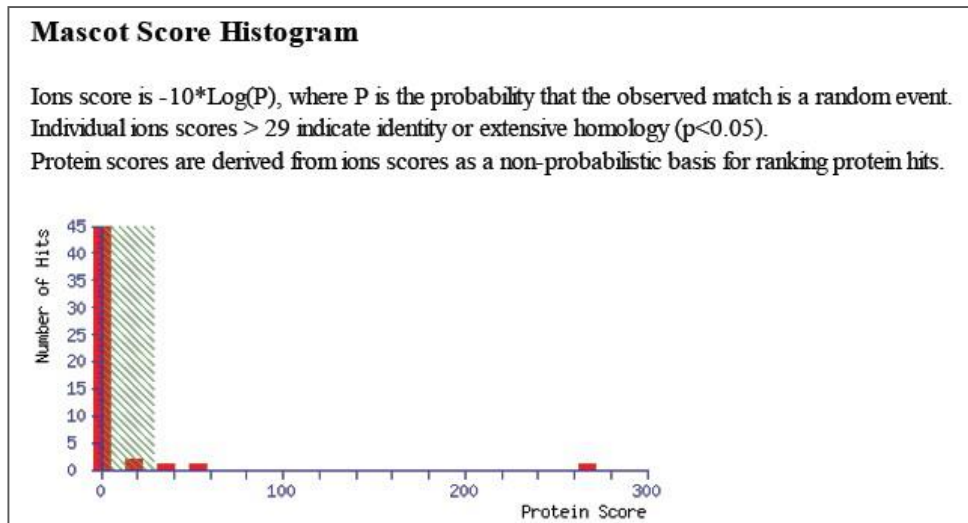


Figura 8. Gráfico obtido a partir do MASCOT para o *spot 276* Controle. A barra presente na área sombreada em verde não foi considerada identificação significativa, pois está abaixo do valor limite. Porém, barras acima do valor limite foram consideradas significativas e provavelmente apresenta coincidência com alguma proteína.

Foi instalado na Faculdade de Odontologia de Bauru-FOB-USP, um espectrômetro de massas com fonte ionização por ESI e analisador de massas híbrido Xevo G2 Q-TOF, acoplado ao sistema nanoAcquity Ultra Performace LC (Waters, Manchester, UK), então o restante do sequenciamento das amostras foi realizado no laboratório de bioquímica desta Universidade. Os dados obtidos foram processados através do *software ProteinLynx GlobalServer 3.0* (PLGS), Waters Co., Manchester, UK.

Os *softwares* de busca correlacionam os espectros obtidos de fragmentação de peptídeos trípticos experimentais com espectros teóricos gerados a partir de digestão tríptica de proteínas, depositados em bancos de dados. Os bancos de dados utilizados foram o UniProtKB/Swiss-Prot (Uniprot-<http://www.uniprot.org/>), e as condições de busca foram baseadas em taxonomia de *Rattus norvegicus*.

4.5.6 Análise computacional

Para compreender a importância biológica das proteínas encontradas dentro das comparações realizadas, foi feita análise funcional através do *plugin* ClueGo v2.17 (BINDEA; MLECNİK; HACKL et al., 2009) que permite a integração e visualização dos termos do *Gene Ontology* (GO). O ClueGO utiliza estatísticas *kappa* para conectar os termos em uma rede. O método estatístico *kappa*, refere-se à medida quantitativa do grau de concordância sobre como as proteínas compartilham uma anotação de termos do GO (HUANG; SHERMAN; TAN et al., 2007). Os resultados foram visualizados através do *software* Cytoscape v 3.0.1 (SHANNON; MARKIEL; OZIER et al., 2003).

4.6 METALOPROTEÔMICA

4.6.1 Determinação de Fe e Pb em spots proteicos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS)

Após a análise do *software* realizada nos géis bidimensionais, os *spots* foram excisados, sendo utilizados para análise triplicata de géis por grupo. A mineralização ácida dos *spots* proteicos foi realizada para a eliminação da fração orgânica (LIMA; NEVES RDE; DOS SANTOS et al., 2010; SANTOS; LIMA; NEVES et al., 2011). Três repetições dos *spots* proteicos recortados foram transferidos para balões de digestão de 5 mL, onde para cada balão foram transferidas alíquotas de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado e 250 µL de peróxido de hidrogênio (Merck) para serem digeridas em bloco digestor a aproximadamente 40 °C até completa mineralização das amostras (extrato translúcido). Em seguida, os extratos foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL, completando-se os volumes com água ultrapura.

Após essa etapa, foram realizadas as diluições das amostras de acordo com a determinação do metal de interesse. Para determinação de Pb foram adicionados 750 µL da amostra digerida mais 250 µL de nitrato de paládio, como

modificador químico. Já para determinação de Fe foram adicionados 200 μL de amostra digerida mais 800 μL de água ultrapura. Assim, após a etapa de preparo das amostras (extratos ácidos), 20 μL de solução padrão e/ou amostra foram injetados para dentro do tubo de grafite através da micropipeta do autoamostrador.

As determinações de Fe e Pb nos extratos ácidos obtidos foram feitas utilizando espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema *self-reverse* (SR), tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada, recoberto com filme de carbeto de tungstênio (SILVA, F. A.; NEVES; QUINTERO-PINTO et al., 2007) e amostrador automático ASC-6100. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco de Fe e Pb SHIMADZU, operada com 12 mA de corrente. O comprimento de onda utilizado foi de 248,3 nm para o ferro e 283,3 nm para o Pb; a resolução espectral utilizada foi de 0,5 nm.

Como gás inerte foi utilizado o argônio, mantendo-se um fluxo constante de 0,30 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ durante todo programa de aquecimento, exceto na etapa de atomização, na qual o fluxo de gás foi interrompido. Os sinais de absorbância foram medidos em área de pico.

Soluções padrão aquosas, contendo 0,01 mol L^{-1} de ácido sulfúrico Merck, 0,50% de Triton- X 100 e 10 mg L^{-1} de Pd (II), preparadas por diluição de solução estoque contendo 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ferro e/ou chumbo, foi utilizada no preparo de curva analítica na faixa de concentração de 4,00 a 16,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Fe e de 2,00 a 8,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Pb.

4.6.2 Procedimentos analíticos

No programa de aquecimento do tubo de grafite, inicialmente fixou-se a temperatura de atomização (T_A), variando-se a temperatura de pirólise (T_P) em intervalos de 100 $^{\circ}\text{C}$. Depois de fixada a T_P ótima, variou-se a T_A nos mesmos intervalos. O programa de aquecimento utilizado nesses estudos encontra-se descrito na Tabela 2 e em todas as medidas foi utilizado nitrato de paládio como modificador (SILVA, F. A.; NEVES; QUINTERO-PINTO et al., 2007; SILVA, F. A.; PADILHA; PEZZATO et al., 2006).

Tabela 2. Programa de aquecimento utilizado na otimização das temperaturas de pirólise e atomização de ferro e chumbo.

Etapas	Temperatura (°C)	Estágios		Fluxo de Argônio (L min ⁻¹)
		Rampa(s)	Aquecimento(s)	
Secagem	90	10	0	0,30
Secagem	150	10	5	0,30
Secagem	250	10	5	0,30
Pirólise*	1500	10	20	0,30
Atomização*	2400	1	5	0 (leitura)
Limpeza	2600	5	0	0,30

*Variável

4.6.3 Cálculos estequiométricos

Foram realizados cálculos estequiométricos em relação aos *spots* do tecido hepático. Os cálculos possibilitam a estimativa de quantos átomos de Pb ou Fe estariam presentes por moléculas de *spot* proteico (LIMA; NEVES RDE; DOS SANTOS et al., 2010; SANTOS; LIMA; NEVES et al., 2011). Exemplo de cálculo abaixo.

Dados *Spot* de exemplo:

Spot 47 do grupo experimental III, onde foi identificado chumbo:

$$M_m = 28,255 \text{ kDa} = 28.255 \text{ Da}$$

$$M_m_{\text{Pb}} = 207,2$$

$$m_{\text{proteína}} = 0,99 \mu\text{g} = 0,99 \times 10^{-6} \text{ g}$$

$$n^\circ \text{ Avogadro} = 6,022 \times 10^{23}$$

$$[\text{Pb}]_{\text{spot}} = 3,23 \text{ mg g}$$

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

Cálculo do número de moléculas de proteína no spot

$$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ Da} \text{ ————— } 1,661 \times 10^{-24} \text{ g} \\ 28.255 \text{ Da} \text{ ————— } x \text{ (g)} \end{array} \right\} x = 4,69 \times 10^{-20} \text{ g}$$

$$\left. \begin{array}{l} 4,69 \times 10^{-20} \text{ g} \text{ ————— } 1 \text{ mol} \\ 0,99 \times 10^{-6} \text{ g} \text{ ————— } y \text{ (moléculas)} \end{array} \right\} y = 2,11 \times 10^{13} \text{ moléculas de proteína}$$

Cálculo do número de átomos de chumbo

$$\left. \begin{array}{l} 3,23 \text{ mg de chumbo} \text{ ————— } 1 \text{ g de proteína} \\ z \text{ (mg)} \text{ ————— } 0,99 \times 10^{-6} \text{ g (} m_{\text{proteína}} \text{)} \end{array} \right\} z = 0,32 \times 10^{-8} \text{ g}$$

$$\left. \begin{array}{l} 207,2 \text{ g (} M_m_{\text{Pb}} \text{)} \text{ ————— } 6,022 \times 10^{23} \\ 0,32 \times 10^{-8} \text{ g} \text{ ————— } w \text{ (átomos)} \end{array} \right\} w = 0,93 \times 10^{13} \text{ átomos de Pb}$$

Relação de átomos de chumbo por molécula de proteína

$$\frac{n^\circ \text{ de átomos de chumbo}}{n^\circ \text{ de moléculas de chumbo}} = \frac{0,93 \times 10^{13}}{2,11 \times 10^{13}} = \boxed{0,44 \text{ átomos de Pb por molécula de proteína}}$$

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados de concentração de chumbo no sangue e no fígado, foi utilizado o software *Graph Pad InStat* (Versão 5.0, para Windows, Graphpad Software, San Diego Califórnia USA). Inicialmente foram checadas a normalidade e a homogeneidade dos dados, utilizando-se os testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Bartlett*, respectivamente, para seleção do teste estatístico apropriado. Quanto à concentração de Pb no sangue, os dados passaram no teste de normalidade, mas não no de homogeneidade. Após transformação logarítmica, foram então analisados por ANOVA, seguidos pelo teste de *Tukey* para comparações individuais. Para a análise de Pb no fígado, os dados passaram na normalidade, mas as diferenças entre os desvios-padrão foram significativas, mesmo após transformação logarítmica. Foram então analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste de *Dunn* para comparações individuais.

Para as massas inicial e final dos animais, bem como para a massa do fígado, os dados passaram no teste de normalidade e de homogeneidade, sendo analisados por ANOVA e teste de *Tukey* para comparações individuais.

Para verificar a diferença estatística entre os *spots* foi realizado o teste de ANOVA através do programa *ImageMaster 2D platinum* versão 7.0. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados & Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MASSA CORPORAL

Foram aferidas as massas corporais dos animais dos diferentes grupos a cada dois dias, sendo os dados do primeiro e do último dia considerados para análise (tabela 3). Observa-se que todos os animais apresentaram ganho de massa corporal durante o período experimental. Tanto para a massa inicial como para a final, a ANOVA não detectou diferenças significativas entre os grupos ($F=0,040$, $p=0,999$ e $F=0,205$, $p=0,958$, para massa inicial e final, respectivamente). Os resultados corroboram com um estudo que avaliou os efeitos desses metais no cérebro de ratos, utilizando as mesmas dosagens do presente estudo (FERREIRA, 2012). É provável que a intoxicação pelo Pb não altere o padrão de peso corpóreo como demonstrado por um estudo onde os animais foram expostos à superdosagem de 4280 ppm de acetato de chumbo e após 3 semanas não foram encontradas alterações significativas na massa corporal dos animais (GAUTAM e FLORA, 2010).

Tabela 3. Massa média (\pm DP, g) inicial e final dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb e Pb + FeSO₄.

Grupos	Massa inicial (g)	Massa final (g)
GC	81,70 \pm 26,64	246,50 \pm 47,3
GEI	82,33 \pm 27,22	254,30 \pm 67,40
GEII	79,67 \pm 25,97	237,00 \pm 32,69
GEIII	84,17 \pm 29,21	259,83 \pm 32,34
GEIV	85,67 \pm 28,15	240,5 \pm 71,97
GEV	79,80 \pm 35,77	257,40 \pm 23,86

Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p=0,9990$ e $p=0,9579$ para as massas inicial e final, respectivamente. $n=5-6$).

GC (Grupo controle); GEI (20 mg/Kg FeSO₄); GEII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); GEIII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂+ 20 mg/Kg FeSO₄); GEIV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); GEV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂+ 20 mg/Kg FeSO₄).

5.2 MASSA DO FÍGADO

A figura 9 apresenta a média (\pm DP) das massas dos fígados dos animais dos grupos controle e experimentais. A ANOVA detectou diferença significativa entre grupos ($F=8,593$, $p<0,0001$). O teste de *Tukey* revelou que os grupos tratados com Fe apresentaram peso do fígado significativamente maior que os grupos não tratados com Fe. Essa diferença pode ser um reflexo do aumento no depósito de Fe no tecido hepático. O Fe hepático corresponde a 60% do total de Fe do organismo e desse, 95% é armazenado nos hepatócitos como ferritina e 5% como hemossiderina nas células de *Kupffer* (BEARD; DAWSON e PINERO, 1996). A exposição ao Pb não influenciou no peso dos fígados. Resultados semelhantes foram encontrados por autores que avaliaram, dentre outros, o efeito da exposição ao chumbo durante a gestação e lactação no tecido hepático em ratos (PILLAI; PATEL; PANDYA et al., 2009). Não foram encontradas alterações nos pesos dos fígados entre os grupos experimentais e controle.

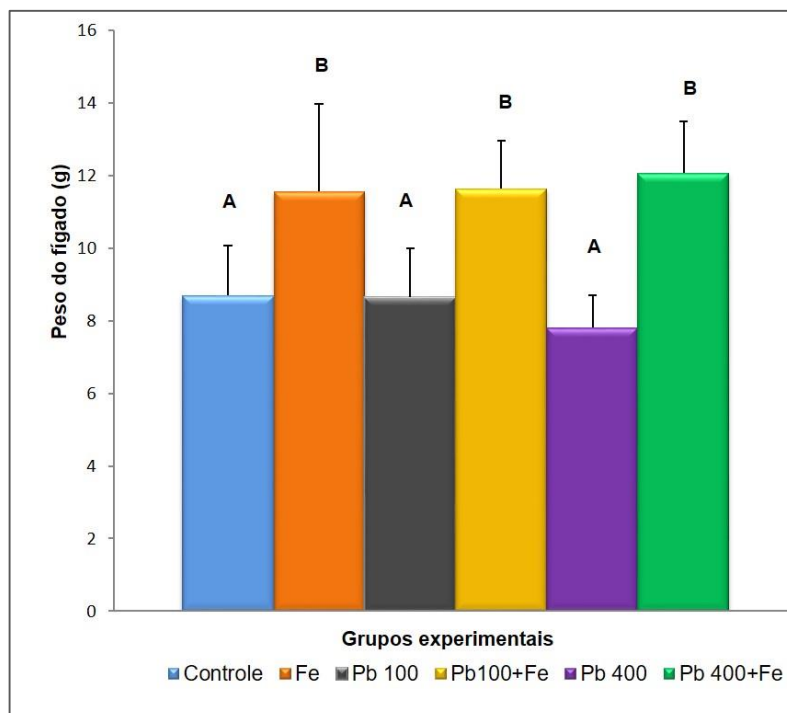


Figura 9. Massa média (\pm DP) do fígado dos animais dos grupos controle e experimentais. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p<0,05$). $n=5-6$.

5.3 ANÁLISES DE Pb NO TECIDO HEPÁTICO E SANGUE TOTAL

Em relação à concentração de Pb no sangue total, de maneira geral, foi observado um efeito dose-resposta, o que representa eficácia no delineamento metodológico utilizado, e também foi observada uma redução nos níveis de Pb no sangue quando foi administrado o FeSO₄ (Tabela 4).

A ANOVA após transformação logarítmica detectou diferença significativa entre os grupos ($F=69,643$, $p<0,0001$). As menores concentrações de Pb no sangue foram observadas nos grupos controle e FeSO₄, que não diferiram significativamente entre si. Valores intermediários foram encontrados para os grupos que receberam água contendo 100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂, que diferiram significativamente dos anteriores e também dos grupos que receberam água contendo 400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂. Foi utilizada a dosagem de 20 mg/kg de Fe, que corresponde a um valor médio visto na literatura, que varia de 7 a 40 mg/Kg. A administração concomitante de FeSO₄ e Pb foi capaz de reduzir os níveis médios deste metal no sangue dos animais, em cerca de 50% e 40% para os grupos que receberam água contendo 100 e 400 mg/L de Pb(C₂H₃O₂)₂, respectivamente. Entretanto, essa redução observada nos valores médios não foi significativa, pois houve acentuada variação nos valores individuais dentro dos grupos experimentais (figura 10a e tabela 4). Apesar dessa variação, os resultados obtidos diferem daqueles obtidos por alguns autores, os quais concluíram que a suplementação com FeSO₄ (14 mg Fe/Kg) resultou no aumento da plumbemia nos ratos (WANG, Q.; LUO; ZHANG et al., 2007a; WANG, Q.; LUO; ZHENG et al., 2007).

O teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* detectou diferença significativa apenas entre os grupos GC vs GE IV e GC vs GE V ($KW=29,839$, $p<0,0001$), como mostrado na tabela 4. Assim como ocorrido para o sangue, a administração concomitante de FeSO₄ levou a uma redução nos níveis de Pb no fígado dos animais expostos a 100 e 400 mg/L de Pb(C₂H₃O₂)₂, porém essa redução não foi estatisticamente significativa, provavelmente devido à variação discutida anteriormente (figura 10b e tabela 4). Embora não haja na literatura

trabalhos que avaliem o possível efeito da suplementação do Fe na redução da absorção do Pb no tecido hepático, tal efeito protetor já foi observado no tecido encefálico (LIU, C.; YU; SHI et al., 2007; WANG, Q.; LUO; ZHANG et al., 2007a), e portanto, os resultados obtidos no presente trabalho ampliam a possibilidade da utilização do Fe como uma estratégia preventiva na intoxicação pelo Pb.

Tabela 4. Concentração média (\pm DP) de Pb no sangue ($\mu\text{g/dL}$) e fígado (ng/g) dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb ou Pb+FeSO₄.

Grupos	[Pb]sangue ($\mu\text{g/dL}$)	[Pb] fígado (ng/g)
GC	0,20 \pm 0,13 ^a	12,71 \pm 2,79 ^a
GEI	0,34 \pm 0,57 ^a	13,96 \pm 5,12 ^a
GEII	9,05 \pm 5,76 ^b	359,88 \pm 275,21 ^{ab}
GEIII	4,36 \pm 1,75 ^b	124,15 \pm 89,79 ^{ab}
GEIV	37,54 \pm 17,15 ^c	1593,90 \pm 450,43 ^b
GEV	23,37 \pm 4,69 ^c	830,41 \pm 69,83 ^b

Médias seguidas por letras distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os grupos (ANOVA após transformação logarítmica e *Kruskal-Wallis* para o sangue e fígado, respectivamente. $p < 0,0001$). $n=5-6$.

GC (Grupo controle); GEI (20 mg/Kg FeSO₄); GEII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); GEIII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂+ 20 mg/Kg FeSO₄); GEIV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); GEV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂+ 20 mg/Kg FeSO₄).

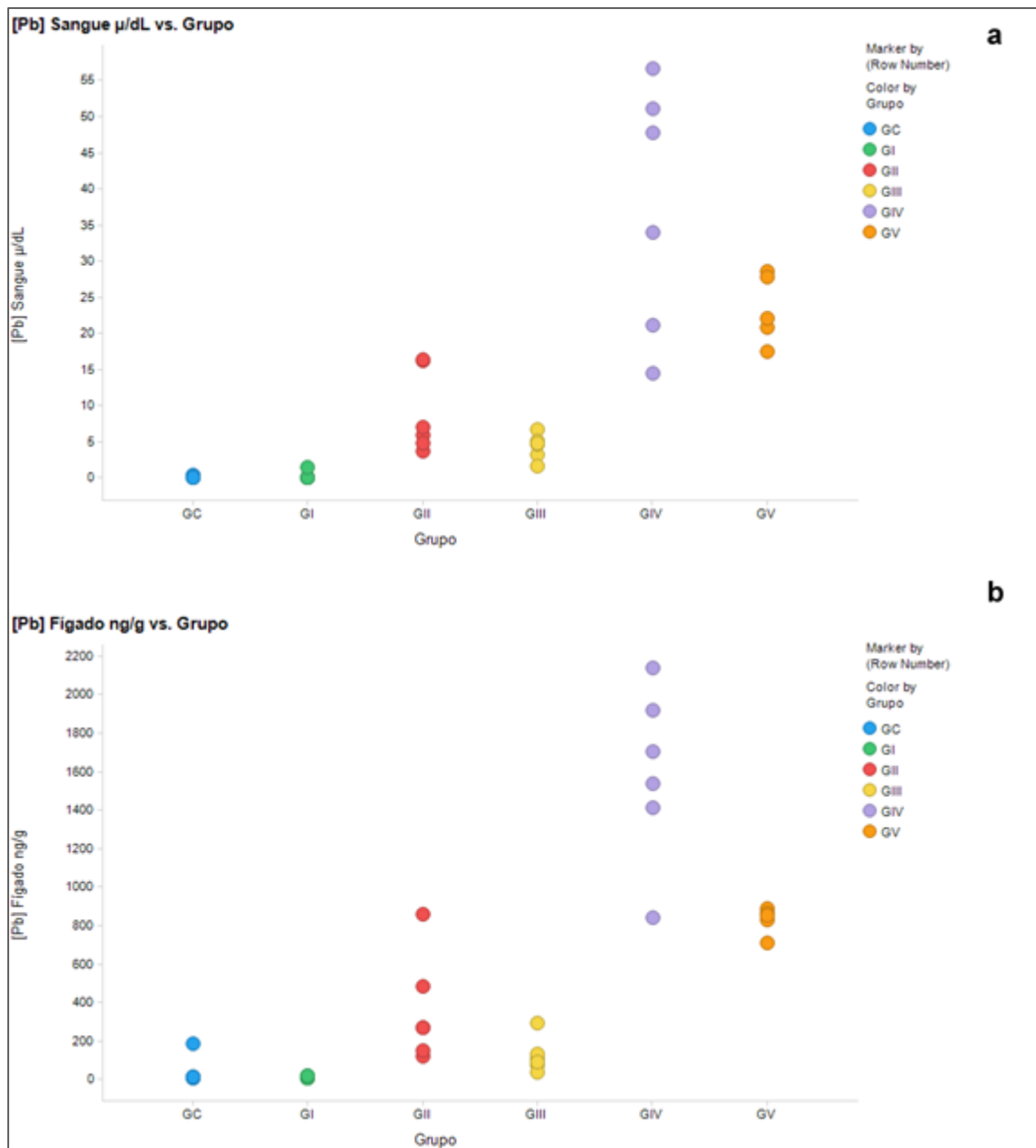


Figura 10. Gráfico de dispersão das concentrações de Pb para cada indivíduo. Em a **a** variação dos valores das concentrações de Pb no sangue e em **b** no fígado, encontradas para cada grupo.

5.4 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Para realização da leitura das lâminas, considerou-se padrão de normalidade para o fígado: bom estado de conservação, homogeneidade de aspecto, identificação de lóbulos hepáticos íntegros, espaço porta íntegro e veias

hepáticas bem definidas; cordões sinusóides presentes, íntegros, confluindo para veia centro-lobular (WAGNER; DE CARVALHO; NAKAMURA et al., 2010). Nos capilares sinusóides entendeu-se como normal a presença de algumas hemácias e células de *Kupffer* (macrófagos). Nas células hepáticas, consideraram-se normais aquelas com um ou mais núcleos íntegros (binucleadas), em geral centralizados.

As alterações inflamatórias encontradas consistiram de pequenos acúmulos de leucócitos, que na grande maioria dos casos eram células mononucleares, basicamente linfócitos. Raramente foram observados alguns neutrófilos em meio ao foco inflamatório. Não foram encontrados eosinófilos ou células gigantes.

No grupo GC foram observados padrões de normalidade na análise das lâminas. Foram visualizados facilmente lóbulos hepáticos, espaços porta e veias hepáticas bem delineadas. Os hepatócitos formavam cordões confluentes para a veia centro-lobular. Entre os cordões, observavam-se sinusóides hepáticos com núcleos arredondados e volumosos, geralmente eucromáticos (figuras 11A, 12A e 13A). Para o GEI foi observada a presença de infiltrado inflamatório mononuclear discreto. Encontramos um padrão de distribuição normal dos hepatócitos, alguns binucleados. Capilares sinusóides dilatados em algumas áreas (figuras 11B e 12B).

O GEII apresentou poucos focos inflamatórios (figuras 11C, 12C e 13C), distribuídos ao acaso, nos espaços porta, regiões periféricas, em áreas intralobulares ou na região centrolobular. Foram encontradas regiões onde os hepatócitos apresentaram irregularidade dos volumes nucleares, regiões com desorganização em sua arquitetura, com alterações na delimitação do citoplasma. Não foram encontradas alterações nos capilares sinusóides. Para o GEIII foram encontrados focos inflamatórios tanto na região periférica como centrolobular (figuras 11D e 12D). Em algumas regiões de atividade inflamatória, os hepatócitos ao redor apresentavam intensa eosinofilia (figura 12D). Foram observadas diversas regiões onde os hepatócitos se encontravam com variação de volume de núcleo e citoplasma. Alterações nas delimitações citoplasmáticas foram observadas (figura 13D).

As lâminas do grupo GEIV apresentaram grandes focos inflamatórios se localizaram nos espaços porta e região centrolobular (figuras 11E e 12E). Foram notadas áreas com hepatócitos não apresentando delimitações citoplasmáticas (figura 13E). Diversos hepatócitos binucleados foram observados. Não foram encontradas alterações nos capilares sinusóides. Com relação ao GEV, quando se avalia comparativamente os capilares sinusóides pode-se verificar que o presente grupo apresentou mais áreas de capilares dilatados (figura 12F), diferente do GEI, e apresentou aparentemente mais focos inflamatórios do que GEIV, assim como núcleos. Houve predomínio de focos inflamatórios na região centrolobular. Um detalhe observado apenas neste grupo foi uma pequena região com hepatócitos normais ao lado de outros aparentemente com vacúolos de diferentes tamanhos (Figura 13F).

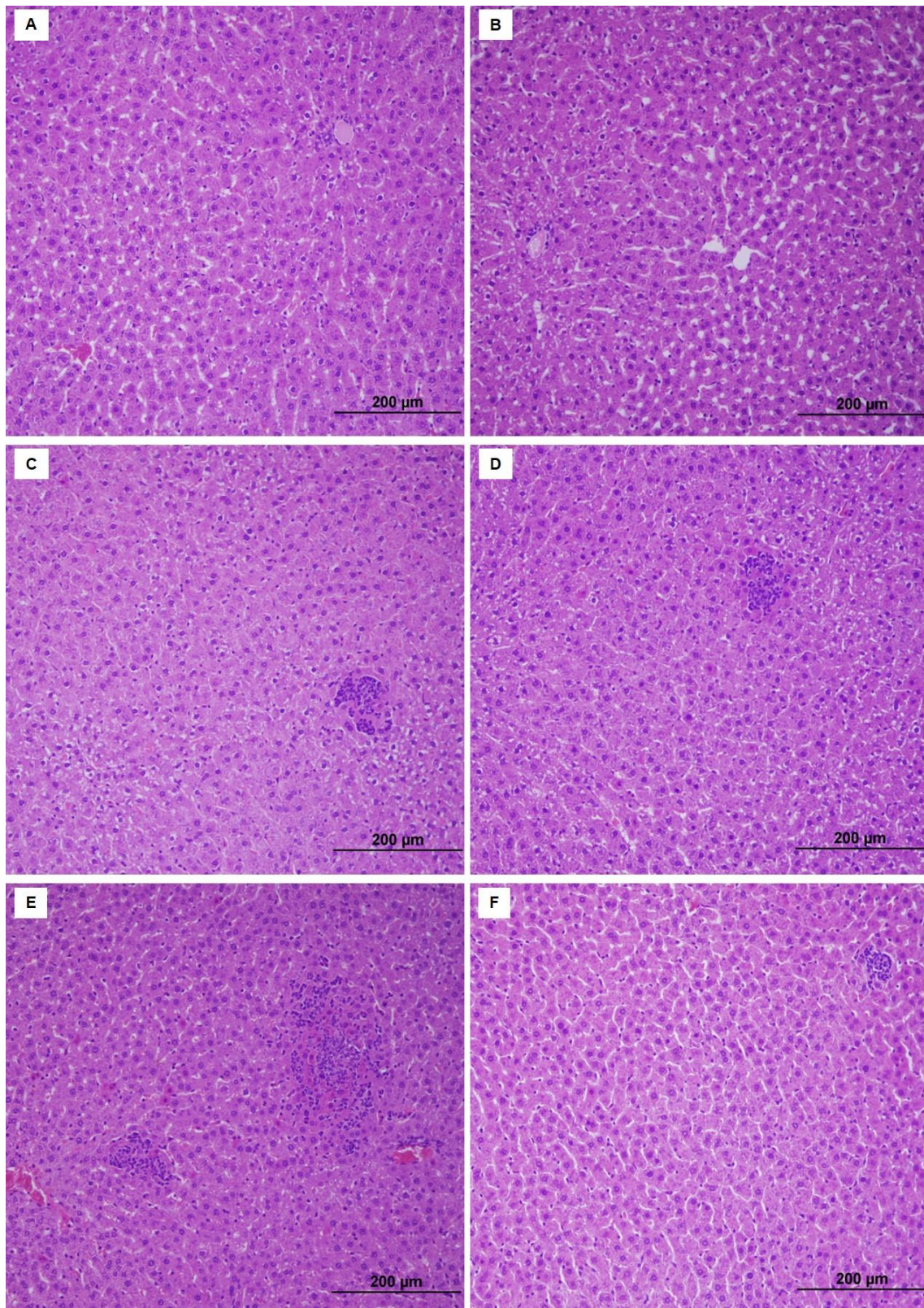


Figura 11. Fotomicrografia de tecido hepático; visão geral. A) GC (controle); B) GEI (20 mg/Kg FeSO_4); C) GEII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$); D) GEIII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ + FeSO_4); E) GEIV (400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$); F) GEV (400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ + FeSO_4). Hematoxilina e Eosina.

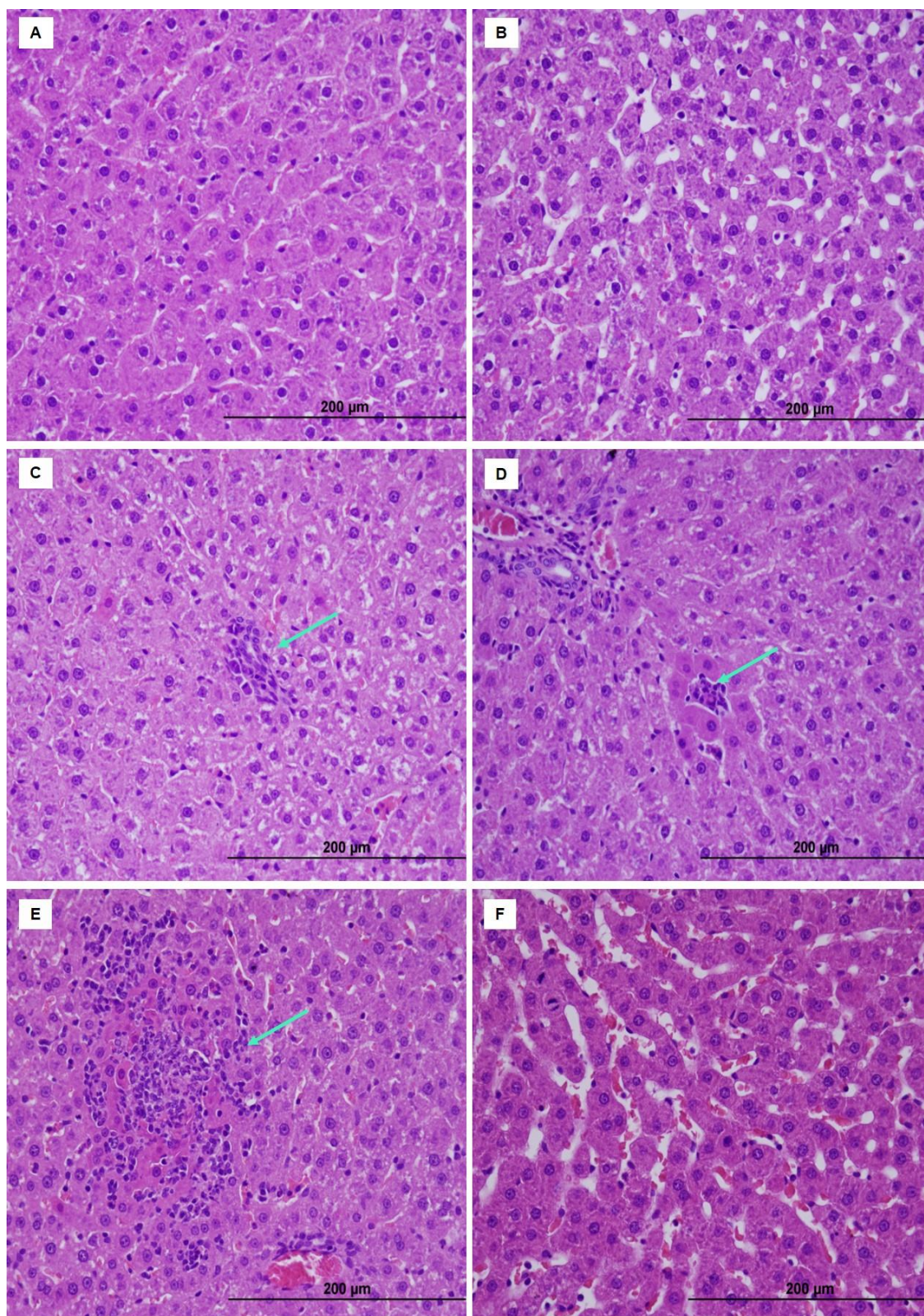


Figura 12. Fotomicrografia de tecido hepático; observar focos de inflamação (setas). A) GC (controle); B) GEI (20 mg/Kg FeSO_4); C) GEII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$); D) GEIII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 + \text{FeSO}_4$); E) GEIV (400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$); F) GEV (400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 + \text{FeSO}_4$). Hematoxilina e Eosina- 400x.

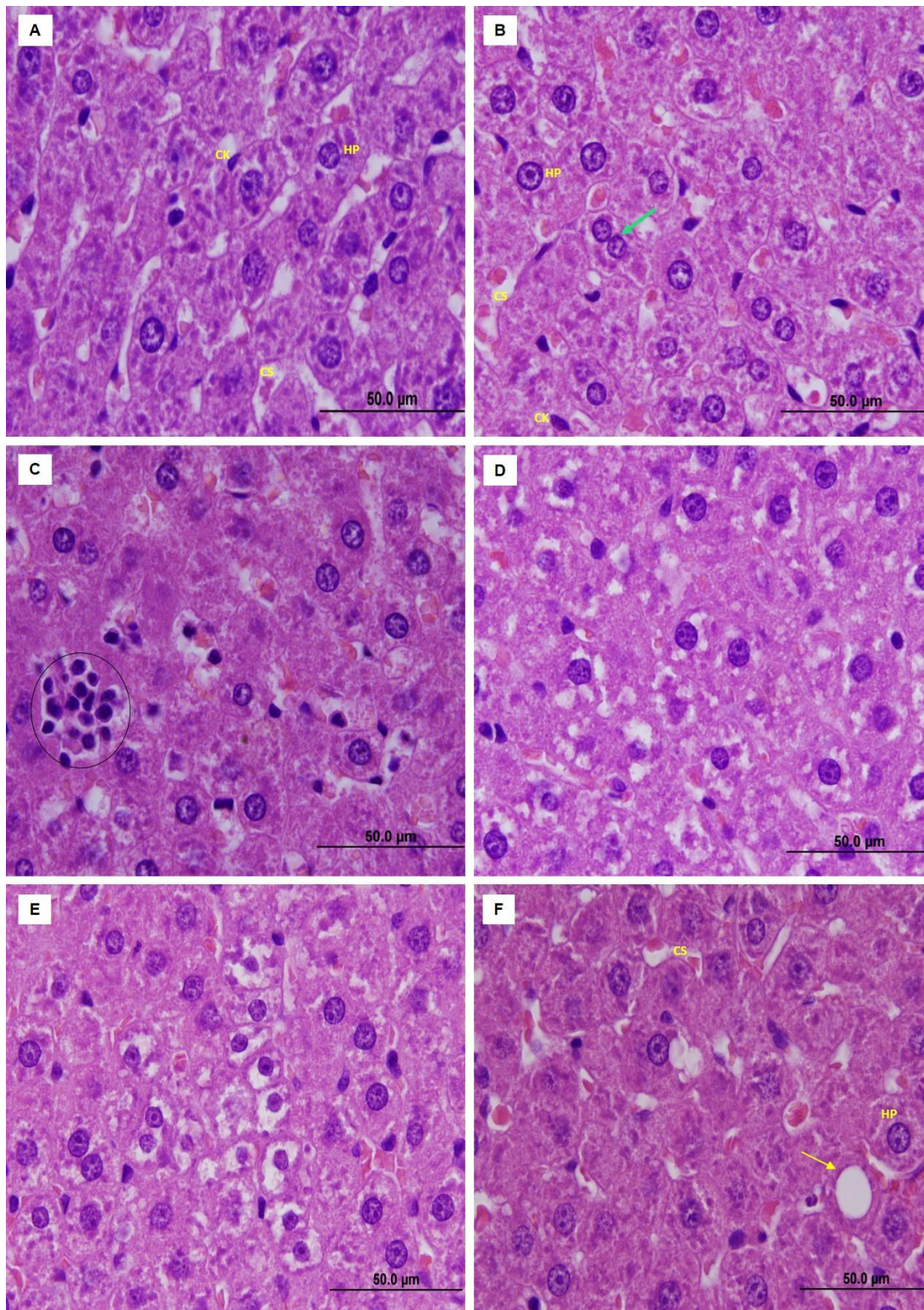


Figura 13. Fotomicrografia de tecido hepático. Observar: Hepatócitos (HP), hepatócito binucleado (seta), Células de Kupffer (CK), capilares sinusóides (CS), infiltrado inflamatório (círculo), “vacúolos” (seta). A) GC (controle); B) GEI (20 mg/Kg FeSO_4); C) GEII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$); D) GEIII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ + FeSO_4); E) GEIV (400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$); F) GEV (400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ + FeSO_4). Hematoxilina e Eosina- 1000x.

De acordo com a análise das lâminas, foi possível observar alterações histomorfológicas nos grupos expostos ao Pb, considerando os padrões de normalidade citados na análise. Esses resultados corroboram o estudo de (AL-BIDERI, 2011), onde a exposição ao Pb causou mudanças histopatológicas progressivas de acordo com a duração da exposição e a concentração do Pb na água de beber. Os autores também relataram estruturas histológicas normais no grupo controle, assim como no presente estudo, onde no grupo GC (água deionizada), as lâminas estavam dentro dos padrões de normalidade. No mesmo estudo foram observadas condições patológicas nos grupos que receberam Pb, dentre elas, capilares sinusóides dilatados que também foram observados no GEV do presente estudo. Também foram encontradas características de degeneração de hepatócitos, compatíveis com os achados nos grupos experimentais intoxicados por Pb (GE II, GE III, GE IV e GE V), corroborando a hipótese de que o Pb promove alterações drásticas no tecido hepático.

Pesquisadores observaram infiltrados de linfócitos em fígados de ratos, em um estudo relacionado à hepatotoxicidade, onde os animais foram expostos ao Pb e Cd (PILLAI; PATEL; PANDYA et al., 2009). No presente estudo, foi possível observar a presença de focos inflamatórios em todos os grupos intoxicados com Pb, onde em sua maioria apresentavam células mononucleadas (linfócitos). Em algumas áreas de atividade inflamatória, os hepatócitos apresentavam intensa eosinofilia citoplasmática. Um estudo de 2012, relacionado a danos no fígado também mostrou atividade inflamatória, com presença de linfócitos e desarranjo dos hepatócitos (CRAWFORD, 2012). Outros estudos relatam que a exposição ao Pb causa inflamação periportal grave, o que sugere um efeito similar em humanos, podendo levar a danos no fígado (SIPOS; SZENTMIHÁLYI; FEHÉR et al., 2003; VENNKATESH e SHAMBHARI, 2013).

Um estudo mostrou que doses de nitrato de chumbo podem causar proliferação de células no fígado através do aumento de mitose (COLUMBANO; LEDDA; SIRIGU et al., 1983). Nos grupos intoxicados do presente estudo foi possível encontrar atividade mitótica. Alguns estudos já relataram que a exposição ao Pb pode ser associada também a diversas formas de câncer

(COBANOGLU; DEMIR; SAYIR et al., 2010), cardiotoxicidade (ANSARI; MAAYAH; BAKHEET et al., 2013) e hepatotoxicidade (MUDIPALLI, 2007).

Assim como o núcleo, o citoplasma do hepatócito também reflete até certo ponto o estado funcional da célula. A análise histomorfológica tem como finalidade avaliar a integridade do órgão extirpado, sendo os parâmetros investigados relacionados a lesões celulares reversíveis (degenerações) e também irreversíveis (necrose e apoptose), infiltração inflamatória, fibrose, congestão e outras. Pessoas expostas a envenenamento crônico podem desenvolver diversas alterações dentre elas degeneração de hepatócitos e desarranjo da estrutura normal do fígado, favorecendo a perda da sua funcionalidade (KUMAR; ABBAS e FAUSTO, 2008).

5.5 ANÁLISE PROTEÔMICA

Para analisar comparativamente os géis bidimensionais, a boa reprodutibilidade dos géis possibilita a visualização dos perfis proteicos diferentes e facilita a sobreposição das imagens, feitas no programa de análise dos géis. Isso porque a semelhança do perfil proteico entre as réplicas é essencial para a análise comparativa dos géis bidimensionais. O protocolo de extração escolhido foi bastante satisfatório e apesar de ser um método longo e laborioso, possibilitou a remoção de grande quantidade de interferentes, garantindo géis de boa qualidade, o que pode ser observado através da presença de proteínas ácidas, básicas, de alta e de baixa massa molecular. Ainda com o propósito de se obterem boas réplicas, foi feita uma combinação de amostras de seis animais diferentes, como sugerido por Tilton (TILTON; HAIDACHER; LEJEUNE et al., 2007), o que possibilitou a obtenção de géis bastante semelhantes entre si. No que se refere à concentração de proteína, foram carregados 1000 µg/gel do *pool* de proteínas, e essa quantidade de proteína foi suficiente para garantir uma boa visualização, mesmos de *spots* pouco abundantes. Desta forma, obteve-se um total de 18 géis (figura 14), sendo uma tréplica de cada condição experimental.

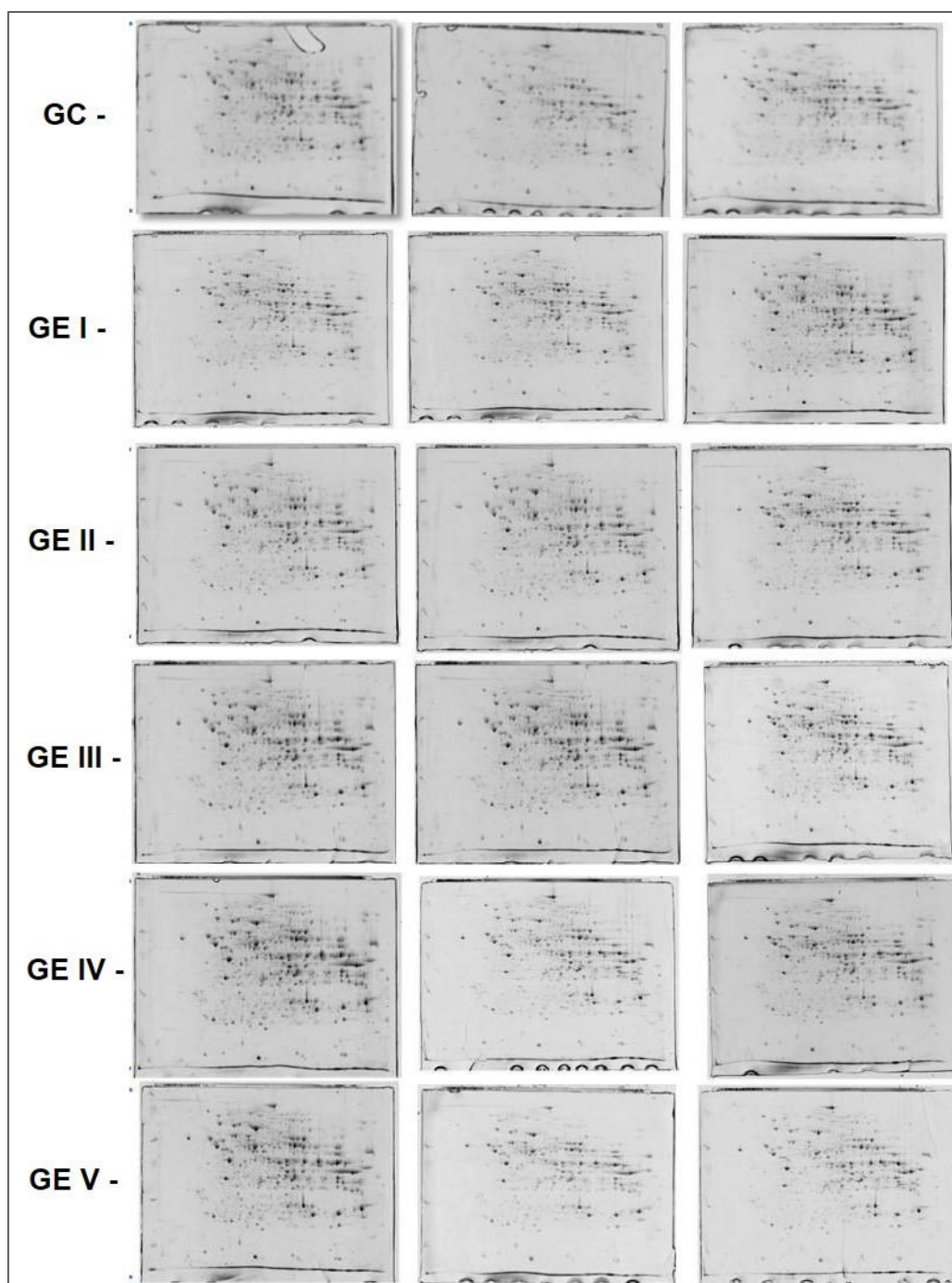


Figura 14. Géis bidimensionais representativos de proteínas hepáticas de ratos, dos grupos, GC (controle); GEI (20 mg/Kg FeSO₄); GEII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); GEIII (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄); GEIV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂); GEV (400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄).

A análise das triplicatas foi realizada por meio do programa *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare), que promoveu uma detecção automática dos *spots*, sendo em seguida iniciado o processo de edição manual com correção, adição e remoção dos *spots*. Desta análise foi obtido o número total de *spots*

protéicos, para cada grupo (figura 15). Um total de 419 *spots* para o GC (água deionizada), 418 para o GEI (FeSO_4), 426 para o GEII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$), 430 para o GEIII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 + \text{FeSO}_4$), 424 para o GEIV (400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) e 428 para o GEV (400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 + \text{FeSO}_4$).

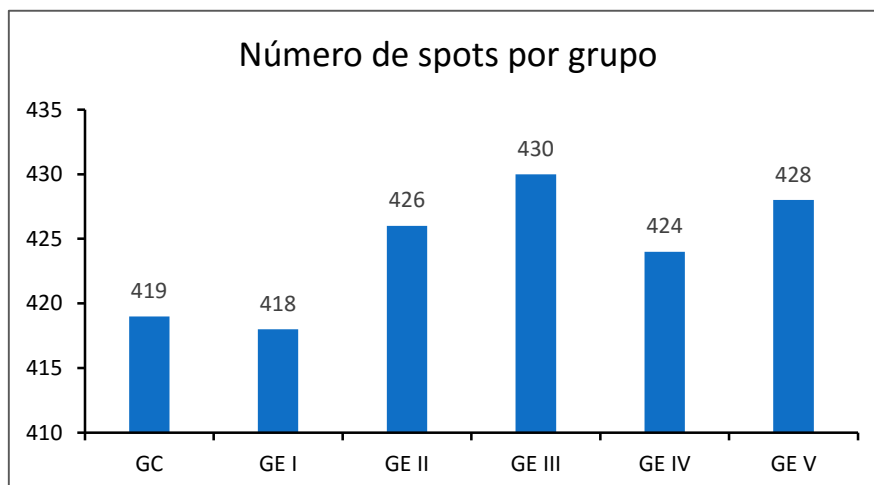


Figura 15. Gráfico representando o número de spots detectados por grupo, nos géis 2D.

Através da análise comparativa, foi observado que 411 *spots* foram coincidentes entre os grupos GC, que recebeu apenas água deionizada, e o GEI que recebeu por gavagem suplementação com sulfato ferroso. Dentre os *spots* comuns aos dois grupos, a ANOVA identificou que 29 *spots* se encontravam diferencialmente expressos ($p < 0,05$). A análise qualitativa revelou que 8 *spots* estavam presentes apenas no grupo controle, e outros 7 apenas no experimental I. Na análise diferencial entre os grupos GC e GEII, houve um total de 414 *spots* coincidentes aos dois grupos e a ANOVA revelou 49 *spots* diferencialmente expressos ($p < 0,05$), que pode ser exemplificada na figura 16. A análise qualitativa revelou 5 *spots* presentes apenas no grupo GC, e 12 *spots* estavam presentes apenas do GEII.

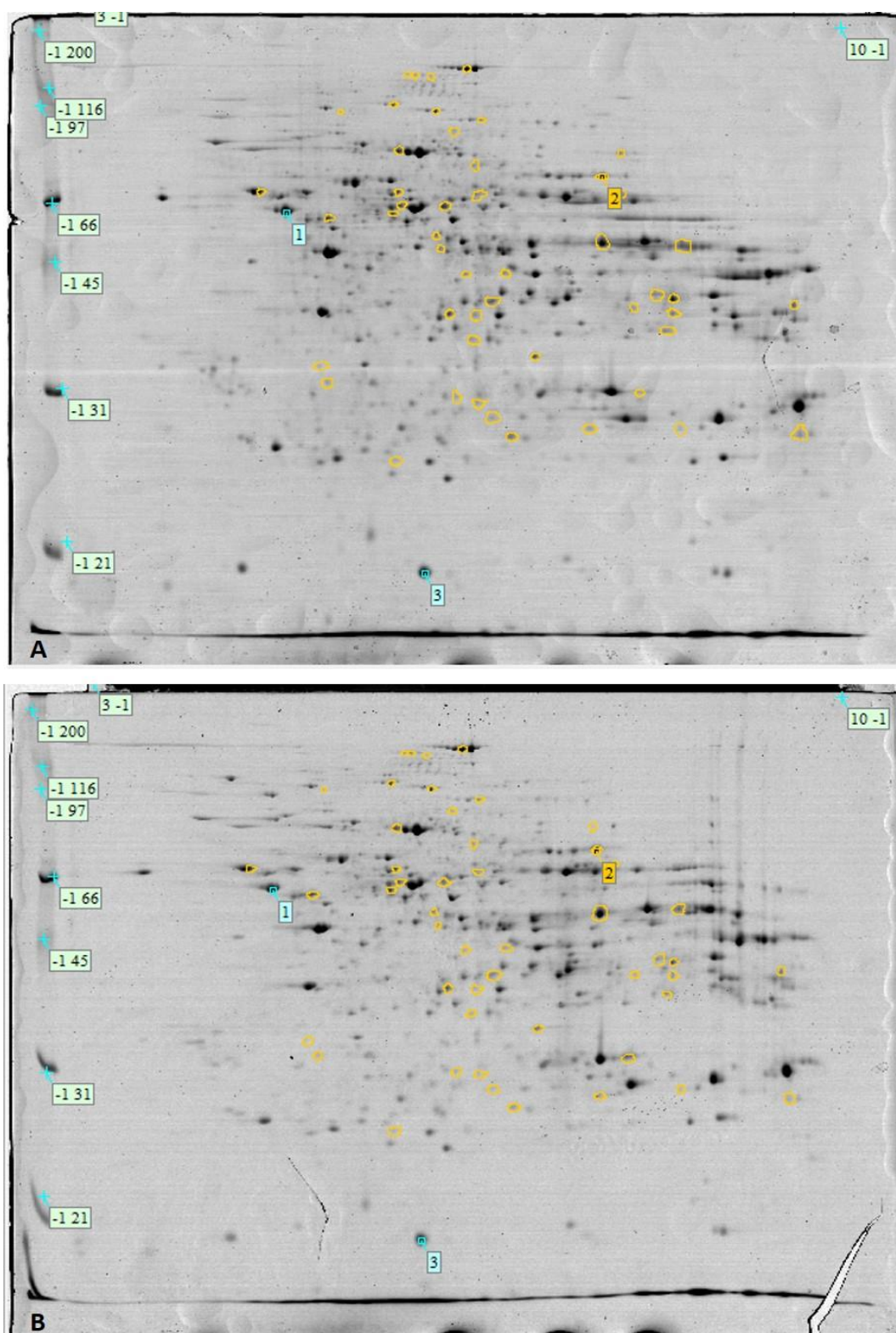


Figura 16. Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeétrica em tiras de pH3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os *spots* circundados em amarelo apresentam diferença de expressão entre os grupos GC (A) e GEII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) (B).

Na comparação entre GC e GEIII, 416 *spots* eram comuns e dentre estes, a ANOVA identificou 64 *spots* com diferença de expressão ($p < 0,05$). A análise qualitativa revelou 3 *spots* presentes apenas no controle e o experimental III apresentando 14 *spots*.

Quando comparado o grupo GC com o GEIV que recebeu uma alta dose de Pb, a análise diferencial mostrou que 414 *spots* coincidentes. Dentre estes *spots*, a ANOVA identificou 60 *spots* diferencialmente expressos ($p < 0,05$). A análise qualitativa revelou 5 *spots* presentes apenas no GC, e o GEIV apresentava 10 *spots* em particular.

Ao compararmos os géis do GC com o último grupo tratado o GEV, foi possível observar 434 *spots* em comum. Dentre estes *spots*, a ANOVA revelou que 60 *spots* apresentaram diferença de expressão ($p < 0,05$). A análise qualitativa mostrou 6 *spots* presentes apenas no GC, e 15 *spots* apenas no GEV.

Em seguida foi realizada a comparação entre os grupos experimentais, GEII e GEIII. Foi possível visualizar 435 *spots* comuns entre os grupos, e a ANOVA revelou que entre eles 40 *spots* eram diferencialmente expressos ($p < 0,05$). Foram observados 4 *spots* apenas no GEII e 6 *spots* apenas no GEIII.

Por fim, foi realizada a comparação entre os 2 últimos grupos experimentais, GEIV e GEV, ou seja, os grupos que receberam maior dose de Pb, diferenciando entre eles a administração do sulfato ferroso (20 mg/Kg FeSO_4). A análise estatística revelou que 433 *spots* eram coincidentes, e a ANOVA identificou 21 *spots* com diferença de expressão ($p < 0,05$). A análise qualitativa entre os grupos mostrou que 5 *spots* estavam presentes apenas no GEIV, e 9 *spots* apenas no GEV. A tabela 5 traz resumidamente o perfil quantitativo dos *spots* entre os grupos.

Tabela 5. Perfil quantitativo de spots proteicos, encontrados no fígado de ratos tratados com diferentes concentrações de ferro e acetato de chumbo.

Comparações	Coincidentes*	Diferença de expressão**
GC vs GE I	411	29
GC vs GE II	414	49
GC vs GE III	416	64
GC vs GE IV	414	60
GC vs GE V	434	60
GE II vs GE III	435	39
GE IV vs GE V	433	21

* Número total de *spots* proteicos presentes em ambos os grupos analisados

** Número de *spots* proteicos com expressão diferencial entre os grupos analisados ($p < 0,05$)

GC (controle); GEI (20 mg/Kg FeSO_4); GEII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$); GEIII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 + \text{FeSO}_4$); GEIV (400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$); GEV (400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 + \text{FeSO}_4$)

Um total de 247 proteínas foram identificadas com sucesso (tabela 6). Foi possível observar a presença de múltiplos *spots* para a mesma proteína, localizados em diferentes posições no gel. Essas variações nos pl e MM podem ser reflexo de eventos celulares tais como modificações pós traducionais, variações alélicas de um mesmo gene (isoformas), mecanismos de *splicing* alternativo e modificações químicas promovidas durante o preparo de amostras (ANDRADE, 2006; PORUBLEVA; VANDER VELDEN; KOTHARI et al., 2001). Do total das proteínas identificadas, foram encontradas 242 no GC, 242 no GEI, 243 no GEII, 245 no GEIII, 242 no GEIV e 242 no GEV.

Tabela 6. Relação geral das proteínas encontradas através da abordagem 2D-PAGE-MS.

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/ pI	
				Exper.	Teórica
Q5U1Y4	Akr1e2	62	1,5-anhydro-D-fructose reductase	40,4/7.48	34/7.22
P35213	Ywhab	84.9	14-3-3 protein beta/alpha	32,5/4.11	28/4.81
P62260	Ywhae	84.9	14-3-3 protein epsilon	32,5/4.11	29/4.63
P68511	Ywhah	84.9	14-3-3 protein eta	32,5/4.11	28/4.81
P61983	Ywhag	84.9	14-3-3 protein gamma	32,5/4.11	28/4.80
P68255	Ywhaq	84.9	14-3-3 protein theta	32,5/4.11	27/4.69
P63102	Ywhaz	84.9	14-3-3 protein zeta/delta	32,5/4.11	27/4.73
O54753	Hsd17b6	60.8	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 6	53,8/5.13	36/8.98
Q64591	Decr1	763	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	36,3/9.56	36/9.08
Q63347	Psmc2	86	26 S protease regulatory subunit 7	57,2/5.85	48/5.59
Q5X178	Ogdh	77	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	110,4/6.41	116/6.30
P11960	Bckdha	744	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial	51,2/6.10	50/7.68
P23457	Akr1c9	916	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	40,0/6.98	37/6.67
O70351	Hsd17b10	6122	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	28,8/9.28	27/8.91
P46953	Haa0	2731	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	35,4/5.43	32/5.57
P29266	Hibadh	157	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	35,6/6.55	35/8.73
P07871	Acaa1b	304	3-ketoacyl-CoA thiolase B_ peroxisomal	39,5/6.65	43/8.53
P13437	Acaa2	749	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	44,1/9.46	41/8.09
P31210	Akr1d1	91	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	42,6/6.87	37/6.18

Cont. tabela 6

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/ pI	
				Exper.	Teórica
P32755	Hpd	534	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	46,5/6.71	45/6.29
Q9JLJ3	Aldh9a1	2615	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	59,8/6.29	53/6.57
P19945	Rplp0	1678	60S acidic ribosomal protein P0	39,4/5.81	34/5.90
Q6DGG1	Abhd14b	85	Abhydrolase domain-containing protein 14B	25,3/5.26	22/5.65
P60711	Actb	1428	Actin, cytoplasmic 1	41,6/5.42	41/5.29
P63259	Actg1	1428	Actin, cytoplasmic 2	46,1/5.20	41/5.31
P68136	Acta1	956	Actin_alpha skeletal muscle	46,1/5.20	42/5.23
P62738	Acta2	956	Actin_aortic smooth muscle	46,1/5.20	42/5.24
P63269	Actg2	956	Actin_gamma-enteric smooth muscle	46,1/5.20	41/5.31
P15650	Acadl	108	Acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial Long-chain specific	47,0/6.44	47/7.63
P15651	Acads	205	Acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial Short-chain specific	44,8/7.10	44/8.47
P70470	Lypla1	283	Acyl-protein thioesterase 1	27/6.38	24/6.04
Q9ER34	Aco2	157	Aconitate hydratase, mitochondrial	91,0/7.8	85/7.87
Q9WU50	Ak4	347	Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial	30,0/8.2	25/7.80
P36972	Aprt	397	Adenine phosphoribosyltransferase	27,4/6.92	19/6.15
P38918	Akr7a3	151	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	40,4/7.48	36/6.80
P50475	Aars	105	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	109,5/5.57	106/5.41
P51635	Akr1a1	911	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	40,4/7.48	36/6.84
Q64564	Adh-3	63	Alcohol dehydrogenase 1	44,1/9.46	39/8.52

Cont. tabela 6

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/ pI	
				Exper.	Teórica
P12711	Adh5	481	Alcohol dehydrogenase class-3	42,7/7,76	39/7,45
Q66HF8	Aldh1b1	75	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	59/5,65	57/6,62
P13601	Aldh1a7	108	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1	61,4/7,96	54/7,10
P11884	Aldh2	839	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	59,8/6,29	56/7,00
Q3T1L0	Aldh16a1	199	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	88,9/5,91	85/5,77
B4F768	Aldh4a1	2163	Aldh4a1 protein	69,0/7,18	62/5,89
Q66HG4	Galm	319	Aldose 1-epimerase- Galm	43,5/6,42	37/6,18
Q64057	Aldh7a1	586	Alpha-aminoacidic semialdehyde dehydrogenase	32,8/5,81	58/7,99
P17475	Serpina1	106	Alpha-1-antitrypsinase	62,7/4,53	46/5,70
Q63041	A1m	94	Alpha-1-macroglobulin	41,6/5,42	167/6,46
P04764	Eno1	83	Alpha-enolase	57,2/5,85	47/6,16
P55260	Anxa4	822	Annexin A4	35,5/5,25	35/5,30
P07824	Arg1	560	Arginase-1	39,5/6,65	34/6,76
P20673	Asl	406	Argininosuccinate lyase	57,0/6,14	51/5,99
P09034	Ass1	760	Argininosuccinate synthase	52,3/7,79	46/7,63
P50298	Nat2	70	Arylamine N-acetyltransferase 1	34,0/5,13	33/5,30
P00507	Got2	173	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	44,1/9,46	47/9,13
P15999	Atp5a1	830	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	61,7/7,64	59/9,29
P19511	Atp5f1	152	ATP synthase F(0)complex subunit b1, mitochondrial	28,0/9,67	28/9,39

Cont. tabela 6

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/pI	
				Exper.	Teórica
P10719	Atp5b	260	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	33,0/4,99	56/5,18
Q77P24	Srprb	267	Ba1-667	101/7,16	107/8,35
Q5XIM0	Bcs1l	73	BCS1-like	47,9/9,05	47/8,30
O09171	Bhmt	1162	Betaine-homocysteine S-methyltransferase	44,8/7,10	44/8,02
P01026	C3	70	C3 Complement C3 (Fragment)	86,0/7,64	18/6,12
P18418	Calr	2168	Calreticulin	65,2/3,59	47/4,33
P07756	Cps1	1082	Carbamoyl-phosphate synthase ammonia, mitochondrial	142,4/6,34	164/6,33
P14141	Ca3	319	Carbonic anhydrase 3	30,0/7,35	29/6,89
P16303	Ces1d	621	Carboxylesterase 1D	66,0/6,66	62/6,10
Q63108	Ces1e	149	Carboxylesterase 1E	69,0/5,65	61/5,64
Q68G49	LOC291863	348	Carboxyl ester hydrolase-LOC291863	66,0/6,65	62/5,9
Q77P52	Cmb1	187	Carboxymethylenebutenolidase homolog -	28,7/6,29	27/6,24
P04762	Cat	1209	Catalase	69,7/7,34	59/7,07
P22734	Comt	2414	Catechol O-methyltransferase-	29,2/4,48	29/5,41
P00787	Ctsb	118	Cathepsin B	33,0/4,99	37/5,36
D4ACB8	Cct8	89	Chaperonin subunit 8	68,9/5,22	59/5,37
Q6Q0N1	Cndp2	274	Cytosolic non-specific dipeptidase	63,7/5,44	52/5,43
Q8VHF5	Cs	149	Citrate synthase, mitochondrial	50,0/8,48	51/8,54
O35796	C1qbp	207	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein mitochondrial	32,9/3,79	30/4,77

Cont. tabela 6

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/pI	
				Exper.	Teórica
Q68FY0	Uqcrc1	114	Cytochrome b-c1 complex subunit 1_mitochondrial	53,0/5,06	52/5,57
Q68FS4	Lap3	158	Cytosol aminopeptidase	63,1/6,49	56/6,78
P28037	Aldh1l1	1783	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	98,2/5,83	98/5,64
Q62651	Ech1	955	Delta (3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	35,5/6,80	36/8,14
P0C2X9	Aldh4a1	2163	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	69,1/6,93	61/7,13
P06214	Alad	90.9	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	39,7/6,53	36/6,31
Q7M0E3	Dstn	323	Destrin	19,0/4,90	18/8,19
Q920D2	Dhfr	450	Dihydrofolate reductase	24,7/7,22	21/6,76
B2GV15	Dbt	119	Dihydropyrimidine branched chain transacylase E2	57,8/6,32	53/8,57
Q01205	Dlst	330	Dihydropyrimidine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex mitochondrial	60,3/5,96	48/8,89
Q6P6R2	Dld	540	Dihydropyrimidine dehydrogenase, mitochondrial	63,9/7,13	54/7,96
Q63150	Dpys	487	Dihydropyrimidine	51,2/6,10	56/6,77
P11348	Qdpr	489	Dihydropteridine reductase	28,8/7,67	25/7,67
Q5RKL4	Dmgdh	942	Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial	94,7/6,55	95/6,77
O55096	Dpp3	69	Dipeptidyl peptidase 3	84,0/5,01	83/5,12
Q9R0T3	Dnajc3	115	DnaJ homolog subfamily C member 3	66,0/5,83	57/5,56
Q6AYH5	Dctn2	111	Dynactin subunit 2	53,8/5,13	44/5,14
Q68FU3	Etfb	732	Electron transfer flavoprotein subunit beta	27,2/5,90	27/7,61
Q68FR6	Eef1g	206	Elongation factor 1-gamma	53,9/6,48	50/6,31

Cont. tabela 6

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/ pI	
				Exper.	Teórica
P05197	Eef2	111	Elongation factor 2	96,0/6,88	95/6,41
P52555	Erp29	133	Endoplasmic reticulum resident protein 29	29,8/6,34	28/6,23
Q66HD0	Hsp90b1	907	Endoplasmic	102,1/4,38	92/4,72
P14604	Echs1	152	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	30,6/6,62	31/8,40
B0BNA7	Eif3i	80	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	41,6/5,42	36/5,38
Q3T1J1	Eif5a	382	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	18,9/4,92	16/5,07
P02793	Ftl1	722	Ferritin light chain 1	24,2/6,24	20/5,98
O88618	Ftcd	2611	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	65,0/5,79	58/5,79
Q66HT1	Aldob	1315	Fructose-bisphosphate aldolase	44,1/9,46	39/8,67
P47819	Gfap	533	Glial fibrillary acidic protein	44,6/6,86	49/5,35
B1H249	Gnpnat1	118	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	25,6/8,03	20/7,59
P05370	G6pdx	150	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase-	68,8/6,23	59/5,97
P10860	Glud1	249	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	61,7/7,64	61/8,05
D3ZT90	Gcdh	94	Glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase	82,0/5,67	49/8,95
P04041	Gpx1	5760	Glutathione peroxidase 1	27,4/6,92	22/7,70
P00502	Gsta1	122	Glutathione S-transferase alpha-1	29,3/9,38	25/8,87
P04903	Gsta2	122	Glutathione S-transferase alpha-2	29,3/9,38	27/8,91
P04904	Gsta3	122	Glutathione S-transferase alpha-3	29,3/9,38	25/8,78
P46418	Gsta5	202	Glutathione S-transferase alpha-5	30,2/9,42	25/8,42

Cont. tabela 6

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/ pI	
				Exper.	Teórica
P04905	Gstm1	197	Glutathione S-transferase Mu 1	28,2/7,13	25/8,97
P08010	Gstm2	963	Glutathione S-transferase Mu 2	28,2/7,13	25/6,91
Q9Z1B2	Gstm5	405	Glutathione S-transferase Mu 5	28,2/7,13	26/6,33
Q9Z339	Gsto1	109	Glutathione S-transferase omega-1	33,0/6,63	27/6,25
P08009	Gstm3	433	Glutathione S-transferase Yb-3	28,2/7,13	25/6,84
Q7M0F7	-----	125	Glutathione transferase class alpha chain 10 (Fragment)	30,2/9,42	12/9,13
P46413	Gss	879	Glutathione synthetase	56,8/5,35	52/5,48
P04797	Gapdh	1233	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	39,8/8,63	35/8,14
Q0V GK3	Glytk	113	Glycerate kinase	61,0/5,80	55/5,84
P13255	Gnmt	6191	Glycine N-methyltransferase	36,5/7,35	32/7,10
Q5I0P2	Gcsh	183	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	18,3/3,59	18/4,98
Q811S9	Gnl3	85	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	31,2/5,61	60/9,25
P63039	Hspd1	2466	Heat shock protein 60 kDa, mitochondrial	63,7/5,22	61/8,05
F1LRV4	Hspa4	193	Heat shock protein 70 kDa 4	109/5,13	94/5,12
Q5XHZ0	Trap1	324	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	80,7/6,31	80/6,56
P82995	Hsp90aa1	103	Heat shock protein HSP 90-alpha	80,7/6,31	84/4,93
Q794E4	Hnrnpf	304	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	53,0/5,06	45/5,30
Q8VHV7	Hnrnp1	124	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	53,0/5,06	49/5,70
Q6AY09	Hnrnp2	181	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	53,0/5,06	49/5,89

Cont. tabela 6

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/pI	
				Exper.	Teórica
Q5D059	Hnmpk	202	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	73,9/5,22	51/5,19
P15865	Hist1h1e	87.3	Histone H1.4	36,4/8,38	21/11,1
P0C0S7	H2afz	84.1	Histone H2A.Z	85,0/5,79	13/10,5
P48721	Hspa9	1834	Hspa9 Stress-70 protein, mitochondrial	82,0/5,46	73/5,97
Q9WVK7	Hadh	885	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase_ mitochondrial	36,4/8,38	34/8,83
O35952	Hagh	86	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	34,0/7,34	34/7,65
P97519	Hmgcl	394	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase_ mitochondrial	36,5/7,35	34/8,69
F1LZJ4	Hyi	77	Hydroxypyruvate isomerase	32,9/5,55	30/5,44
P27605	Hprt1	63.3	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	29,8/6,34	24/6,07
Q711G3	Iah1	351	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	31,2/5,61	28/5,63
P14408	Fh	100	Fumarate hydratase, mitochondrial	54,4/9,04	54/9,06
P41562	Idh1	220	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	52,3/7,79	46/6,53
P12007	Ivd	1235	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	46,1/6,33	46/8,03
Q64602	Aadat	280	Kynurenine/alpha-aminoacidipate aminotransferase, mitochondrial	47,8/8,76	47/8,08
Q58FK9	Ccb12	61	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 3	52,3/7,79	51/8,61
Q811X6	Cry1	113	Lambda-crystallin homolog	38,5/6,35	35/5,94
B2RYJ4	Aasdhpt	82.1	L-aminoacidipate-semialdehyde dehydrogenase	81/5,81	35/6,21
Q64573	-----	431	Liver carboxylesterase 4	69,1/6,93	62/6,29
Q63010	-----	223	Liver carboxylesterase B-1	69,1/6,93	62/6,25

Cont. tabela 6

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/ pI	
				Exper.	Teórica
P04642	Ldha	148	L-lactate dehydrogenase A	38,8,22	36/8,45
P18163	Acs1l	138	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	85/7,01	78/6,60
P02761	Mup	892	Major urinary protein	20,9/5,62	20/5,85
P04636	Mdh2	771	Malate dehydrogenase mitochondrial	37,7/9,46	35/8,93
O88989	Mdh1	134	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	38,2/6,60	36/6,16
P57113	Gstz1	248	Maleylacetoacetate isomerase-	27,8/7,64	23/7,63
Q02253	Aldh6a1	1138	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase mitochondrial	61,4/7,96	57/8,47
Q561S0	Ndufa10	718	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10 mitochondrial	41,7/6,49	40/7,64
P19234	Ndufv2	710	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	27/5,24	27/6,23
Q66HF1	Ndufs1	930	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	85,8/5,40	79/5,65
Q5I0M2	Qprt	67	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	36,5/5,84	31/5,98
F7ESM5	Nit1	183	Nitrilase 1	32,8/5,81	32/5,92
Q497B0	Nit2	4457	Omega-amidase	33,4/7,05	30/6,90
Q3B7D0	Cpox	149	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	42,7/7,76	49/8,80
P10111	Ppia	1857	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	18,6/8,89	17/8,34
Q63716	Prdx1	976	Peroxiredoxin-1	25,6/8,03	22/8,27
Q9Z0V5	Prdx4	241	Peroxiredoxin-4	26,0/8,76	31/6,18

Cont. tabela 6

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/ pI	
				Exper.	Teórica
O35244	Prdx6	1387	Peroxiredoxin-6	27,3/5,76	24/5,64
P97852	Hsd17b4	179	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	39,0/9,40	79/8,77
Q9WVK3	Pecr	478	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	37,7/9,46	32/8,89
Q68G31	Pbid	322	Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein	32,4/6,34	31/5,90
P04176	Pah	90.2	Phenylalanine-4-hydroxylase	57,6/5,62	51/5,76
P31044	Pebp1	1101	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1-	25,3/5,26	20/5,47
M0RB80	Pbp2	78	Phosphatidylethanolamine-binding protein 2-	26,0/5,24	20/8,95
P07379	Pck1	1202	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP]	78,0/6,65	69/6,09
Q499Q4	Pgm1	305	Phosphoglucomutase-1	72,0/6,39	61/6,14
P16617	Pgk1	454	Phosphoglycerate kinase 1	48,0/8,50	44/8,02
Q5I0D5	Lhpp	348	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	32,0/5,24	29/5,24
O35264	Pafah1b2	242	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	31,2/5,61	25/5,57
Q5XIH7	Phb2	1182	Prohibitin-2	36,5/7,35	33/9,83
P67779	Phb	1884	Prohibitin	32,9/5,55	29/5,57
Q68FZ8	Pccb	174	Propionyl coenzyme A carboxylase, beta polypeptide	66,0/6,65	58/7,96
F1M8L5	Pcca	493	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	84,2/6,21	69/6,78
Q63797	Psme1	727	Proteasome activator complex subunit 1-	31,2/5,61	28/5,77
P18422	Psma3	1032	Proteasome subunit alpha type-3	31,1/5,21	28/5,29
P34064	Psma5	120	Proteasome subunit alpha type-5	29,7/4,29	26/4,74

Cont. tabela 6

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/ pI	
				Exper.	Teórica
P60901	PsmA6	149	Proteasome subunit alpha type-6	29,0/6,33	27/6,34
P40307	PsmB2	106	Proteasome subunit beta type-2	24,7/7,22	22/6,96
P34067	PsmB4	244	Proteasome subunit beta type-4	29,2/6,10	29/6,44
D3ZXY4	Aldh8a1	315	Protein Aldh8a1	63,9/7,13	53/7,08
D3ZE31	Ces2a	137	Carboxylic ester hydrolase	69,0/5,65	61/5,76
O88767	Park7	557	Protein deglycase DJ-1	26,3/5,85	19/6,32
P11598	Pdia3	2098	Protein disulfide-isomerase A3	69,0/5,65	56/5,88
Q63081	Pdia6	137	Protein disulfide-isomerase A6	53,8/5,13	48/5,00
P04785	P4hb	803	Protein disulfide-isomerase	66,3/4,43	56/4,82
D4A2K1	Hoga1	508	Protein Hoga1	39,0/8,05	34/8,48
F7EPH4	Ppa1	74	Protein Ppa1	37,1/5,02	32/5,26
M0R8B6	Tubb1	154	Protein Tubb1 - LOC679312, class VI	62,7/4,53	50/5,00
P85973	Pnp	220	Purine nucleoside phosphorylase	35,5/6,62	32/6,46
O35331	Pdxk	123	Pyridoxal kinase	38,0/6,61	34/6,32
P26284	Pdha1	74	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	51,2/6,10	43/8,49
Q6AXX6	Fam213a	115	Redox-regulatory protein FAM213A	33,4/7,05	25/9,19
Q03336	Rgn	1720	Regucalcin	37,1/5,02	33/5,27
Q5XI73	Arhgdia	671	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	33,0/4,99	23/5,10
P29315	Rnh1	311	Ribonuclease inhibitor	53,5/4,25	49/4,67

Cont. tabela 6

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/ pI	
				Exper.	Teórica
P08635	Olah	147	S-acyl fatty acid synthase thioesterase_ medium chain	32,5/4,11	29/5,80
P13444	Mat1a	309	S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	57,2/5,85	43/5,6
Q64380	Sardh	178	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial	101,7/6,11	101/6,15
Q6TXG7	Shmt1	431	Serine hydroxymethyltransferase	64,0/6,67	75/8,11
Q76EQ0	Srr	143	Serine racemase	39,4/5,81	35/5,68
B0BNB9	Htra2	88	Serine peptidase 2	44,0/6,76	49/9,51
P63329	Ppp3ca	125	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	64,7/7,43	58/5,58
P12346	Tf	585	Serotransferrin	89,3/7,04	76/7,14
P02770	Alb	743	Serum albumin	67,7/7,43	68/6,09
Q9WTR7	Sec11c	87.8	Signal peptidase complex catalytic subunit	33,4/7,05	21/9,22
Q68FT5	Bhmt2	77	S-methylmethionine--homocysteine S-methyltransferase	44,8/7,10	38/6,18
P27867	Sord	1458	Sorbitol dehydrogenase	39,5/6,65	38/7,14
P21913	Sdhb	171	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	30,2/9,42	31/8,96
Q0QF18	Sdha	115	Succinate dehydrogenase complex subunit A	79,8/6,51	61/6,04
Q07116	Suox	1194	Sulfite oxidase mitochondrial	66/6,00	60/6,41
P17988	Sult1a1	207	Sulfotransferase 1A1	38,2/6,60	33/6,37
P50237	Sult1c1	712	Sulfotransferase 1C1	38,5/6,35	35/6,10
P07895	Sod2	1338	Superoxide dismutase [Mn]-mitochondrial	25,5/8,62	24/8,96

Cont. tabela 6

UniProtID	Gene	Score	Identidade da proteína	Mm(KDa)/ pI	
				Exper.	Teórica
Q68FQ0	Cct5	158	T-complex protein 1 subunit epsilon	70,7/5,51	59/5,50
Q6P502	Cct3	422	T-complex protein 1 subunit gamma	74,0/6,5	60/6,23
Q66H45	Ttc36	69	Tetratricopeptide repeat protein 36	25,3/5,26	20/5,15
P24329	Tst	2003	Thiosulfate sulfurtransferase	38,3/7,64	33/7,71
Q9Z0V6	Prdx3	104	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	27,0/6,34	28/7,14
Q6P6R6	Tgm2	64	Transglutaminase 2, C polypeptide	86,7/4,83	76/4,95
P46462	Vcp	730	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	95,7/5,10	89/5,14
P50137	Tkt	413	Transketolase	81,0/7,62	67/7,22
P85108	Tubb2a	186	Tubulin beta-2A chain	57,2/5,85	49/4,78
Q3KRE8	Tubb2b	186	Tubulin beta-2B chain	64,7/4,72	49/4,78
Q4QRB4	Tubb3	330	Tubulin beta-3 chain	62,7/4,53	50/4,82
B4F7C2	Tubb4a	334	Tubulin beta-5 chain	62,7/4,53	49/4,78
Q6P9T8	Tubb4b	1217	Tubulin, beta 4	64,7/4,72	49/4,79
Q4QQV0	Tubb6	275	Tubulin, beta 6	62,7/4,53	50/4,78
Q4V8I9	Ugp2	234	UDP-Glucose pyrophosphorylase 2, isoform CRA b	61,4/7,96	57/7,18
P09118	Uox	338	Uricase	38,3/8,62	34/8,19
P04276	Gc	140	Vitamin D-binding protein	63,7/5,22	53/5,65
Q5RKI0	Wdr1	62	WD repeat-containing protein 1	77,7/6,80	66/6,15
Q499R4	Yrdc	66.8	Yrd C domain-containing protein mitochondrial	46,1/5,20	29/5,55
A0JPK3	Zfp57	75.4	Zinc finger protein 57	53,8/5,13	46/10,1

De todas as proteínas identificadas por MS, 40 proteínas foram para a comparação entre os grupos GC x GEI (FeSO_4), 73 proteínas para a comparação GC x GEII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$), 91 proteínas para a comparação GC x GEIII (100 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ + FeSO_4), 84 proteínas para a comparação GC x GEIV (400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$), 99 proteínas para a comparação GC x GEV (400 mg/L $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ + FeSO_4), 52 proteínas para a comparação GEII x GEII e 48 proteínas para a comparação GEIV x GEV. A tabela 7 descreve todas as proteínas com suas respectivas alterações de acordo com as comparações.

Tabela 7. Proteínas com expressão diferencial ($p < 0,05$) em fígados de ratos nas comparações realizadas entre os grupos, identificadas através da abordagem 2D-PAGE-MS.

UniProtID	Gene	Proteína	CxEI	CxEII	CxEIII	CxEIV	CxEV	EIxEIII	EIVxEV
Q5U1Y4	Akr1e2	1,5-anhydro-D-fructose reductase	-	-	-	-	-	-	↑ EV
P35213	Ywhab	14-3-3 protein beta/alpha	-	-	-	-	↓ EV	-	↑ EV
P62260	Ywhae	14-3-3 protein epsilon	-	-	-	-	↓ EV	-	↑ EV
P68511	Ywhah	14-3-3 protein eta	-	-	-	-	↓ EV	-	↑ EV
P61983	Ywhag	14-3-3 protein gamma	-	-	-	-	↓ EV	-	↑ EV
P68255	Ywhaq	14-3-3 protein theta	-	-	-	-	↓ EV	-	↑ EV
P63102	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	-	-	-	-	↓ EV	-	↑ EV
O54753	Hsd17b6	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 6	↓ EI	-	-	↓ EIV	-	-	-
Q64591	Decr1	2,4-dienyl-CoA reductase, mitochondrial	-	-	-	-	-	↓ EIII	-
Q63347	Psmc2	26 S protease regulatory subunit 7	-	-	-	↑ EIV	-	-	↑ EV
Q5X178	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	↓ EI	-	-	↑ EIV	↑ EV	-	-
P11960	Bckdha	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial	-	↑ EII	↓ EIII	-	↑ EV	-	-
O70351	Hsd17b10	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	-	-	↑ EIII	↑ EIV	↑ EV	↑ EIII	-
P46953	Haa0	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	↑ EI	-	↑ EIII	-	-	↓ EIII	-
P29266	Hibadh	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	↓ EI	↓ EII	-	↓ EIV	↓ EV	-	↑ EV
P07871	Acaa1b	3-ketoacyl-CoA thiolase B_ peroxisomal	-	↓ EII	-	-	-	-	-
P13437	Acaa2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	-	↑ EII	-	↓ EIV	↓ EV	-	↑ EV
P31210	Akr1d1	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	-	-	↑ EIII	-	-	-	-
P32755	Hpd	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	↓ EI	-	↓ EIII	-	-	-	-
Q9JLJ3	Aldh9a1	4-trimethylaminobutylaldehyde dehydrogenase	↓ EI	↑ EII	↓ EIII	↑ EIV	↑ EV	↑ EIII	-
P19945	Rplp0	60S acidic ribosomal protein P0	-	-	-	-	-	↑ EIII	-
Q6DGG1	Abhd14b	Abhydrolase domain-containing protein 14B	-	-	↓ EIII	↓ EIV	↓ EV	-	-
A0JPK3	Zfp57	Zinc finger protein 57	↓ EI	-	-	↓ EIV	-	-	-

Cont. da tabela 7

UniProtID	Gene	Proteína	CxEI	CxEII	CxEIII	CxEIV	CxEV	EIIxEIII	EIVxEV
Q5U1Y4	Akr1e2	1,5-anhydro-D-fructose reductase	-	-	-	-	-	-	↑ EV
P35213	Ywhab	14-3-3 protein beta/alpha	-	-	-	-	↓ EV	-	↑ EV
P62260	Ywhae	14-3-3 protein epsilon	-	-	-	-	↓ EV	-	↑ EV
P68511	Ywhah	14-3-3 protein eta	-	-	-	-	↓ EV	-	↑ EV
P61983	Ywhag	14-3-3 protein gamma	-	-	-	-	↓ EV	-	↑ EV
P68255	Ywhaq	14-3-3 protein theta	-	-	-	-	↓ EV	-	↑ EV
P63102	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	-	-	-	-	↓ EV	-	↑ EV
O54753	Hsd17b6	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 6	↓ EI	-	-	↓ EIV	-	-	-
Q64591	Decr1	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	-	-	-	-	-	↓ EIII	-
Q63347	Psmc2	26 S protease regulatory subunit 7	-	-	-	↑ EIV	-	-	↑ EV
Q5X178	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	↓ EI	-	-	↑ EIV	↑ EV	-	-
P11960	Bckdha	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial	-	↑ EII	↓ EIII	-	↑ EV	-	-
O70351	Hsd17b10	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	-	-	↑ EIII	↑ EIV	↑ EV	↑ EIII	-
P46953	Haao	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	↑ EI	-	↑ EIII	-	-	↓ EIII	-
P29266	Hibadh	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	↓ EI	↓ EII	-	↓ EIV	↓ EV	-	↑ EV
P07871	Acaa1b	3-ketoacyl-CoA thiolase B_ peroxisomal	-	↓ EII	-	-	-	-	-
P13437	Acaa2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	-	↑ EII	-	↓ EIV	↓ EV	-	↑ EV
P31210	Akr1d1	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	-	-	↑ EIII	-	-	-	-
P32755	Hpd	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	↓ EI	-	↓ EIII	-	-	-	-
Q9JLJ3	Aldh9a1	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	↓ EI	↑ EII	↓ EIII	↑ EIV	↑ EV	↑ EIII	-
P19945	Rplp0	60S acidic ribosomal protein P0	-	-	-	-	-	↑ EIII	-
Q6DGG1	Abhd14b	Abhydrolase domain-containing protein 14B	-	-	↓ EIII	↓ EIV	↓ EV	-	-
A0JPK3	Zfp57	Zinc finger protein 57	↓ EI	-	-	↓ EIV	-	-	-

Cont. da tabela 7

UniProtID	Gene	Proteína	CxEI	CxEII	CxEIII	CxEIV	CxEV	EIIxEIII	EIVxEV
P60711	Actb	Actin, cytoplasmic 1	-	↓ EII	↓ EIII	↑ EIV	↑ EV	↑ EIII	-
P63259	Actg1	Actin, cytoplasmic 2	-	↓ EII	↓ EIII	↓ EIV	↓ EV	-	-
P68035	Actc1	Actin, alpha cardiac muscle 1	-	↓ EII	↓ EIII	↓ EIV	↓ EV	-	-
P68136	Acta1	Actin_alpha skeletal muscle	-	-	↓ EIII	-	↓ EV	-	-
P62738	Acta2	Actin_aortic smooth muscle	-	↓ EII	↓ EIII	↓ EIV	↓ EV	-	-
P63269	Actg2	Actin_gamma-enteric smooth muscle	-	↓ EII	↓ EIII	↓ EIV	↓ EV	-	-
P15650	Acadl	Acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial Long-chain specific	-	-	↓ EIII	-	-	-	-
P15651	Acads	Acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial Short-chain specific	-	↓ EII	↓ EIII	↓ EIV	-	-	-
P70470	Lypla1	Acyl-protein thioesterase 1	-	-	-	-	-	↓ EIII	-
Q6DGF9	Acbd4	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 4	-	-	-	-	↑ EV	-	↑ EV
P36972	Aprt	Adenine phosphoribosyltransferase	-	↑ EII	↑ EIII	-	↑ EV	↓ EIII	-
P38918	Akr7a3	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	-	-	-	-	-	-	↑ EV
P50475	Aars	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	-	-	↑ EIII	↑ EIV	↑ EV	-	-
P51635	Akr1a1	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	-	-	-	-	-	-	↑ EV
Q64564	Adh-3	Alcohol dehydrogenase 1	-	-	-	↓ EIV	-	-	-
Q66HF8	Aldh1b1	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	-	-	↑ EIII	-	-	-	-
P13601	Aldh1a7	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1	-	-	-	-	↑ EV	-	↑ EV
P11884	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	↓ EI	↑ EII	↓ EIII	↑ EIV	↑ EV	↓ EIII	- C
Q66HG4	Galm	Aldose 1-epimerase-Galm	-	↑ EII	-	-	-	-	-
Q64057	Aldh7a1	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	-	-	-	-	-	-	↑ EV _d
P17475	Serpina1	Alpha-1-antitrypsinase	↓ EI	↑ EII	↓ EIII	-	↓ EV	-	-
Q63041	A1m	Alpha-1-macroglobulin	-	-	↓ EIII	↑ EIV	-	↓ EIII	- abe
P04764	Eno1	Alpha-enolase	-	-	-	↑ EIV	-	-	↑ EV

Cont. da tabela 7

UniProtID	Gene	Proteína	CxEI	CxEII	CxEIII	CxEIV	CxEV	EIxEIII	EIVxEV
P55260	Anxa4	Annexin A4	↑EI	-	↓EIII	-	-	↓EIII	-
P07824	Arg1	Arginase-1	-	↓EII	↓EIII	↓EIV	-	-	-
P20673	Asl	Argininosuccinate lyase	-	-	-	-	-	↑EIII	-
P09034	Ass1	Argininosuccinate synthase	-	↑EII	↑EIII	↓EIV	↑EV	-	-
P00507	Got2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	-	-	-	↓EIV	-	-	-
P15999	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	↓EI	↓EII	-	↓EIV	↑EV	↓EIII	↑EV
B4F768	Aldh4a1	Aldh4a1 protein	-	-	↑EIII	-	-	↓EIII	-
P10719	Atp5b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	-	-	-	-	↓EV	-	-
Q7TP24	Srprb	Ba1-667	↓EI	-	↑EIII	-	↑EV	↑EIII	-
Q5XIM0	Bcs1l	BCS1-like	-	-	-	-	-	-	↓EV
O09171	Bhmt	Betaine-homocysteine S-methyltransferase	↓EI	↑EII	↓EIII	↓EIV	-	↓EIII	↑EV
P01026	C3	C3 Complement C3 (Fragment)	-	↑EII	-	-	-	↓EIII	-
P19511	Atp5f1	ATP synthase F(0)complex subunit b1, mitochondrial	-	-	-	-	↑EV	-	↓EV
P18418	Calr	Calreticulin	-	-	-	-	-	-	↑EV
P07756	Cps1	Carbamoyl-phosphate synthase ammonia, mitochondrial	↓EI	↓EII	↓EIII	↓EIV	↑EV	↑EIII	↓EV
P16303	Ces1d	Carboxylesterase 1D	-	-	-	↑EIV	-	↑EIII	-
Q63108	Ces1e	Carboxylesterase 1E	-	-	-	-	↓EV	↓EIII	-
Q68G49	LOC29163	Carboxyl ester hydrolase-LOC291863	-	-	-	↑EIV	-	↑EIII	-
Q7TP52	Cmb1	Carboxymethylenebutenolidase homolog -	-	-	-	-	-	↓EIII	-
P04762	Cat	Catalase	-	↓EII	↓EIII	↓EIV	↑EV	↑EIII	↓EV
P22734	Comt	Catechol O-methyltransferase-	-	-	-	↓EIV	↑EV	-	-
P00787	Ctsb	Cathepsin B	-	-	-	-	↓EV	-	-
D4ACB8	Cct8	Chaperonin subunit 8	↑EI	-	↓EIII	-	↑EV	-	-

Cont. da tabela 7

UniProtID	Gene	Proteína	CxEI	CxEII	CxEIII	CxEIV	CxEV	EIIxEIII	EIVxEV
Q8VHF5	Cs	Citrate synthase, mitochondrial	-	↑EII	-	-	-	-	-
O35796	C1qbp	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein mitochondrial	↓EI	-	-	↓EIV	↑EV	-	-
Q68FY0	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1_mitochondrial	↓EI	↓EII	-	-	↓EV	-	-
Q68FS4	Lap3	Cytosol aminopeptidase	-	↑EII	-	-	-	↓EIII	-
P28037	Aldh1l1	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	↑EI	↑EII	↓EIII	↓EIV	↓EV	↓EIII	↓EV
Q62651	Ech1	Delta (3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	↑EI	-	↑EIII	-	↑EV	↓EIII	-
P0C2X9	Aldh4a1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	-	↓EII	↓EIII	↓EIV	↓EV	↑EIII	↓EV
P06214	Alad	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	-	-	-	-	↑EV	-	-
Q920D2	Dhfr	Dihydrofolate reductase	-	-	-	↑EIV	-	-	-
B2GV15	Dbt	Dihydrolipoamide branched chain transacylase E2	-	-	↑EIII	-	-	-	-
Q01205	Dist	Dihydrolipoilysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex mitochondrial	-	↓EII	↑EIII	-	↑EV	-	-
Q63150	Dpys	Dihydropyrimidinase	-	↑EII	↓EIII	-	↑EV	-	-
Q5RKL4	Dmgdh	Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial	-	↑EII	-	↓EIV	-	↓EIII	-
O55096	Dpp3	Dipeptidyl peptidase 3	-	-	-	-	↓EV	-	-
Q9R0T3	Dnajc3	DnaJ homolog subfamily C member 3	-	↓EII	-	-	-	↓EIII	-
Q6AYH5	Dctn2	Dynactin subunit 2	↓EI	-	-	↓EIV	-	-	-
Q68FU3	Effb	Electron transfer flavoprotein subunit beta	-	↓EII	-	-	↓EV	-	-
Q68FR6	Eef1g	Elongation factor 1-gamma	-	-	-	-	-	-	↓EV
P05197	Eef2	Elongation factor 2	-	-	↓EIII	-	-	-	-
P52555	Erp29	Endoplasmic reticulum resident protein 29	-	↓EII	↓EIII	-	-	-	-
P14604	Echs1	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	↓EI	-	↓EIII	↓EIV	↓EV	-	-
B0BNA7	Eif3i	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	-	-	↓EIII	↑EIV	-	↓EIII	-

Cont. da tabela 7

UniProtID	Gene	Proteína	CxEI	CxEII	CxEIII	CxEIV	CxEV	EIIxEIII	EIVxEV
Q3T1J1	Eif5a	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	-	-	-	-	-	-	↑ EV
P02793	Ftl1	Ferritin light chain 1	-	-	-	↑ EV	-	-	-
O88618	Ftcd	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	-	↓ EII	↑ EIII	↓ EIV	↓ EV	↓ EIII	-
Q66HT1	Aldob	Fructose-bisphosphate aldolase	-	-	↑ EIII	↓ EIV	-	-	-
P47819	Gfap	Glial fibrillary acidic protein	↓ EI	↓ EII	↑ EIII	↓ EIV	↑ EV	↓ EIII	-
B1H249	Gnpat1	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	-	-	↑ EIII	-	-	-	-
P05370	G6pdx	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase-	-	-	-	-	-	-	↑ EV
P10860	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	↓ EI	-	↓ EIII	↓ EIV	-	↓ EIII	-
D3ZT90	Gcdh	Glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase	-	↑ EII	-	-	↓ EV	-	-
P04041	Gpx1	Glutathione peroxidase 1	-	↑ EII	↑ EIII	-	↑ EV	↓ EIII	-
P00502	Gsta1	Glutathione S-transferase alpha-1	-	-	↑ EIII	↑ EIV	↑ EV	-	-
P04903	Gsta2	Glutathione S-transferase alpha-2	-	-	↑ EIII	↑ EIV	↑ EV	-	-
P04904	Gsta3	Glutathione S-transferase alpha-3	-	-	↑ EIII	↑ EIV	↑ EV	-	-
P04905	Gstm1	Glutathione S-transferase Mu 1	-	-	-	↑ EIV	-	-	↑ EV
P08010	Gstm2	Glutathione S-transferase Mu 2	-	-	-	↑ EIV	-	-	↑ EV
Q9Z1B2	Gstm5	Glutathione S-transferase Mu 5	-	-	-	↑ EIV	-	-	↑ EV
P08009	Gstm3	Glutathione S-transferase Yb-3	-	-	-	↑ EIV	-	-	↑ EV
P04797	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-	↓ EII	↓ EIII	-	-	-	↓ EV
Q0VVK3	Glyctk	Glycerate kinase	-	-	↑ EIII	-	-	-	-
P13255	Gnmt	Glycine N-methyltransferase	-	-	↓ EIII	↓ EIV	-	-	-
Q811S9	Gnl3	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	-	-	-	-	↑ EV	-	↑ EV
P63039	Hspd1	Heat shock protein 60 kDa, mitochondrial	↑ EI	↑ EII	↓ EIII	↓ EIV	↑ EV	-	-
F1LRV4	Hspa4	Heat shock protein 70 kDa 4	-	-	↓ EIII	-	↓ EV	-	-

Cont. da tabela 7

UniProtID	Gene	Proteína	CxEI	CxEII	CxEIII	CxEIV	CxEV	EIIxEIII	EIVxEV
Q794E4	Hnmpf	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	↓ EI	↓ EII	-	↓ EIV	↓ EV	-	-
Q8VHV7	Hnmp1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	-	↓ EII	-	-	↓ EV	-	-
Q6AY09	Hnmp2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	-	↓ EII	-	-	↓ EV	-	-
Q5D059	Hnmpk	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	-	-	↓ EIII	-	-	-	-
P15865	Hist1h1e	Histone H1.4	-	↑ EII	-	-	-	-	-
P0C0S7	H2afz	Histone H2A.Z	↑ EI	-	-	-	-	-	-
Q9WVK7	Hadh	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase_mitochondrial	-	↑ EII	↓ EIII	↓ EIV	↑ EV	-	-
O35952	Hagh	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	-	-	-	-	-	↓ EIII	-
P97519	Hmgcl	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase_mitochondrial	-	-	↓ EIII	↓ EIV	-	-	-
P27605	Hprt1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	-	↓ EII	↓ EIII	-	-	-	-
B0BNB9	Htra2	Serine peptidase 2	-	-	↑ EIII	-	-	-	-
Q711G3	lah1	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	-	-	-	-	↑ EV	-	↑ EV
P12007	lvd	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	↑ EI	↑ EII	↑ EIII	-	↑ EV	↓ EIII	↑ EV
Q64602	Aadat	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial	-	↑ EII	-	-	↓ EV	-	↑ EV
Q811X6	Cry1	Lambda-crystallin homolog	-	↓ EII	-	-	-	-	-
B2RYJ4	Aasdhp1	L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase	↑ EI	-	-	-	-	-	-
Q64573	-----	Liver carboxylesterase 4	-	-	-	-	-	↓ EIII	-
Q63010	-----	Liver carboxylesterase B-1	-	-	-	↑ EIV	-	↑ EIII	-
P04642	Ldha	L-lactate dehydrogenase A	-	↓ EII	↑ EIII	↓ EIV	↓ EV	-	-
P04636	Mdh2	Malate dehydrogenase mitochondrial	-	-	-	-	↑ EV	-	-
O88989	Mdh1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	-	↑ EII	-	↓ EIV	↓ EV	-	-
P57113	Gstz1	Maleylacetoacetate isomerase-	-	↓ EII	-	-	-	-	-
Q02253	Aldh6a1	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase mitochondrial	↓ EI	↑ EII	↑ EIII	↓ EIV	↓ EV	↓ EIII	↑ EV

Cont. da tabela 7

UniProtID	Gene	Proteína	CxEI	CxEII	CxEIII	CxEIV	CxEV	EIIxEIII	EIVxEV
Q66HF1	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	-	-	↑ EIII	-	↓ EV	-	-
Q5I0M2	Qprt	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	-	-	-	-	-	-	↓ EV
F7ESM5	Nit1	Nitrite 1	-	-	-	-	-	-	↑ EV
Q497B0	Nit2	Omega-amidase	-	↑ EII	-	-	-	-	-
P10111	Ppia	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	↓ EI	↑ EII	↓ EIII	↑ EIV	↑ EV	-	-
Q63716	Prdx1	Peroxiredoxin-1	-	-	↑ EIII	↑ EIV	↓ EV	↓ EIII	-
Q9Z0V5	Prdx4	Peroxiredoxin-4	-	-	↑ EIII	↑ EIV	-	↓ EIII	-
Q9WVK3	Pecr	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	-	-	-	-	↑ EV	-	-
Q68G31	Pbld	Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein	-	↓ EII	-	↑ EIV	-	↓ EIII	-
P31044	Pebp1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	-	↓ EII	↓ EIII	↓ EIV	↓ EV	-	-
P07379	Pck1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP]	-	-	-	↓ EIV	-	-	-
Q499Q4	Pgm1	Phosphoglucosyltransferase-1	↓ EI	-	-	↓ EIV	-	-	-
P16617	Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1	-	↑ EII	-	-	-	-	-
Q5I0D5	Lhpp	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	-	↓ EII	-	-	-	-	-
O35264	Pafah1b2	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	-	-	-	-	↑ EV	-	↑ EV
Q5XIH7	Phb2	Prohibitin-2	-	-	↓ EIII	↓ EIV	-	-	-
P67779	Phb	Prohibitin	-	-	↑ EIII	-	-	↓ EIII	-
Q68FZ8	Pccb	Propionyl coenzyme A carboxylase, beta polypeptide	-	-	-	↑ EIV	-	↑ EIII	-
F1M8L5	Pcca	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	-	-	-	-	↑ EV	-	-
Q63797	Psme1	Proteasome activator complex subunit 1-	-	-	-	-	↑ EV	-	↑ EV
P18422	Psma3	Proteasome subunit alpha type-3	-	↑ EII	-	-	-	-	-
P34064	Psma5	Proteasome subunit alpha type-5	↑ EI	-	-	-	-	-	-

Cont. da tabela 7

UniProtID	Gene	Proteína	CxEI	CxEII	CxEII	CxEI	CxEI	CxEII	EIIxEII	EIVxE
			I	I	I	V	V	I	I	V
P60901	PsmA6	Proteasome subunit alpha type-6	-	-	-	-	-	-	-	↑EV
P40307	PsmB2	Proteasome subunit beta type-2	-	-	-	↑EIV	-	-	-	-
D3ZXY4	Aldh8a1	Protein Aldh8a1	-	-	↓EIII	-	-	-	-	-
D3ZE31	Ces2a	Carboxylic ester hydrolase	-	-	-	-	-	-	↑EV	-
O88767	ParK7	Protein deglycase DJJ-1	-	-	-	-	-	↑EIII	-	-
P11598	Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3	-	-	-	-	-	-	↑EV	-
Q63081	Pdia6	Protein disulfide-isomerase A6	-	-	-	↓EIV	-	-	-	-
P04785	P4hb	Protein disulfide-isomerase	-	↑EII	↓EIII	-	-	-	↑EV	-
D4A2K1	Hoga1	Protein Hoga1	-	↓EII	-	-	-	-	-	-
P85973	Pnp	Purine nucleoside phosphorylase	↑EI	-	↑EIII	-	-	-	↑EV	↓EIII
O35331	Pdxk	Pyridoxal kinase	-	↑EII	-	↓EIV	↓EV	-	-	-
P26284	Pdha1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	-	↑EII	↓EIII	-	-	-	↑EV	-
Q6AXX6	Fam213a	Redox-regulatory protein FAM213A	-	↑EII	-	-	-	-	-	-
Q5X173	Arhgdia	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	-	-	-	-	-	-	↑EV	-
P08635	Olah	S-acyl fatty acid synthase thioesterase_ medium chain	-	-	-	-	↓EV	-	-	↑EV
P13444	Mat1a	S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	-	-	-	↑EIV	-	-	-	↑EV
Q64380	Sardh	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial	↓EI	-	-	↑EIV	-	-	-	-
Q6TXG7	Shmt1	Serine hydroxymethyltransferase	-	-	↓EIII	-	-	-	↓EIII	-
P63329	Ppp3ca	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha	-	-	↓EIII	-	-	-	-	-
P12346	Tf	Serotransferrin	-	-	↓EIII	-	-	-	↑EV	↑EV
P02770	Alb	Serum albumin	↓EI	-	↑EIII	↓EIV	↓EV	↑EIII	-	-
Q9WTR7	Sec11c	Signal peptidase complex catalytic subunit	-	↑EII	-	-	-	-	-	-
P09118	Uox	Uricase	-	↓EII	↑EIII	↓EIV	↓EV	-	-	-

Cont. da tabela 7

UniProtID	Gene	Proteína	CxEI	CxEII	CxEIII	CxEIV	CxEV	EIIxEIII	EIVxEV
Q68FT5	Bhmt2	S-methylmethionine--homocysteine S-methyltransferase	-	-	↓ EIII	↓ EIV	-	-	-
P27867	Sord	Sorbitol dehydrogenase	↓ EI	↓ EII	↓ EIII	-	-	↓ EIII	-
Q0QF18	Sdha	Succinate dehydrogenase complex subunit A	-	-	-	↓ EIV	-	-	-
Q07116	Suox	Sulfite oxidase mitochondrial	-	↓ EII	-	-	-	↓ EIII	-
P17988	Sult1a1	Sulfotransferase 1A1	-	↑ EII	-	↓ EIV	↓ EV	-	-
P50237	Sult1c1	Sulfotransferase 1C1	-	↓ EII	-	↓ EIV	↓ EV	-	-
P07895	Sod2	Superoxide dismutase [Mn]-mitochondrial	-	-	↓ EIII	-	-	-	-
Q6P502	Cct3	T-complex protein 1 subunit gamma	-	↓ EII	↑ EIII	-	-	-	-
Q66H45	Ttc36	Tetratricopeptide repeat protein 36	-	-	↓ EIII	↓ EIV	↓ EV	-	-
P24329	Tst	Thiosulfate sulfurtransferase	-	↓ EII	↑ EIII	↓ EIV	↓ EV	-	-
Q9Z0V6	Prdx3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	-	-	-	-	-	↓ EIII	-
Q6P6R6	Tgm2	Transglutaminase 2, C polypeptide	-	-	-	-	-	-	↓ EV
P46462	Vcp	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	-	-	-	↓ EIV	-	-	-
P50137	Tkt	Transketolase	-	↑ EII	-	-	-	↓ EIII	-
P85108	Tubb2a	Tubulin beta-2A chain	↓ EI	-	↑ EIII	↑ EIV	↑ EV	-	↑ EV
Q3KRE8	Tubb2b	Tubulin beta-2B chain	-	-	↑ EIII	-	↑ EV	-	-
Q4QRB4	Tubb3	Tubulin beta-3 chain	↓ EI	-	↑ EIII	-	↑ EV	-	-
Q6P9T8	Tubb4b	Tubulin, beta 4	↓ EI	-	↓ EIII	-	↓ EV	-	-
Q4QQV0	Tubb6	Tubulin, beta 6	↓ EI	-	↓ EIII	-	↓ EV	-	-
Q4V8I9	Ugp2	UDP-Glucose pyrophosphorylase 2, isoform CRA b	-	-	-	-	↑ EV	-	↑ EV
P04276	Gc	Vitamin D-binding protein	-	-	↓ EIII	-	-	-	-
Q499R4	Yrdc	Yrd C domain-containing protein mitochondrial	-	-	↓ EIII	↓ EIV	↓ EV	-	-

↓ - subexpressa; ↑ - superexpressa; C - controle; EI - FeSO₄; EII - 100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂; EIII - 100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄; EIV - 400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂; EV - 400 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄; - não houve diferença.

Aqueles *spots* que tiveram identificação positiva para alguma proteína foram posteriormente submetidos à análise por GFAAS para determinação de Pb e Fe nos *spots*. Tal análise foi realizada na tentativa de encontrar proteínas que possuam a capacidade de se ligar a metais. Após análise, 117 *spots* apresentaram Pb e 44 *spots* apresentaram Fe, descritos na tabela 8.

Tabela 8. Relação de *spots* proteicos contendo Pb ou Fe.

Spot	Gene	Pb	Fe	Spot	Gene	Pb	Fe
5	Tubb2a			60	Prdx6	+	-
	Tubb2b	+	-		65	Gstm1	
Tubb4			Gstm2				
19	Dpys			Gstm5		+	-
	Glud1	+	-	Gstm4			
	Ppp3ca			67	Cmb1	+	+
24	Gcsh	+	-	74	Psma5	+	+
26	Ppia	+	+	79	Gsta5		
31	Dstn	+	+		Sdhb	+	+
32	-----	+	-	84	Ctsb		
34	Ftl 1	+	-		Arhgdia	+	+
38	Etfb	+	-	89	Psma3	+	-
39	Sod2	+	-		Acbd4		
	Abhd14b			Gnl3			
	Pebp1			91	Iah1	+	-
	Pbp2	+	-		Pafah1b2		
40	Ttc36			Psme1			
	Aldob			98	Hyi		
Gnpnat1	+	-	Phb		+	+	
42	Prdx1			99	Aldh7a1		
	Prdx4	+	-		Nit1	+	+
49	Comt	+	-	101	Nit2	+	-
50	Park7	+	-	102	Ech1	+	-
52	Psmb4	+	-	103	Haa0	+	-
54	Aprt	+	-	104	Anxa4	+	+
58	Atp5b	+	+	107	Np	+	-
59	Gstz1	+	-	108	Hibadh	+	+

+ presença ou - ausência do elemento no *spot*

Cont. da tabela 8

Spot	Gene	Pb	Fe	Spot	Gene	Pb	Fe
116	Gfap	+	-	173	Hpd	+	+
118	Qprt	+	+	175	Ivd	+	+
121	Hadh	+	+	189	Bckdha	+	+
122	Gnmt			191	Pdha1		
	Hmgcl	+	-		Eef1g	+	-
127	Phb2			194	Psmc2		
	Mdh1				Eno1	+	+
129	Sult1a1	+	+	199	Mat1a		
	Sult1c1				Gss	+	-
133	Ppa1	+	-	201	Dbt	+	-
136	Uox	+	+	202	Pah	+	-
137	Akr1c9	+	-	207	Aldh9a1	+	-
139	Acaa1b	+	+	209	Dlst	+	-
141	Alad	+	-	212	Atp5a1	+	+
145	Tst	+	+	213	Aldh6a1		
	Gapdh	+	+		Cndp2	+	+
147	Akr1a1			214	Alb	+	+
	Akr7a3	+	-	215	Gc	+	-
148	Akr1cl2			216	Rplp0		
	Akr1d1	+	-		Dld	+	-
151	Htra2			219	Aldh8a1		
	Actb				Lap3	+	-
153	A1m	+	-	220	Serpina1	+	-
	Eif3i			223	Calr	+	+
155	Ndufa10	+	+	229	G6pd	+	-
	Acads			231	Hspd1	+	+
156	Arg1	+	-	232	Ces1e		
	Bhmt				Pdia3	+	+
172	Bhmt2			235	Cct5	+	-
	Galm	+	+	236	Cat	+	-
172	Actg1			240	Aldh4a1	+	-
	Actc1			245	Hnrnpk	+	-
	Acta1	+	+	251	Wdr1	+	-
	Acta2			252	Pck1		
Actg2			Sdha		+	-	

+ presença ou - ausência do elemento no *spot*

Cont. da tabela 8

Spot	Gene	Pb	Fe	Spot	Gene	Pb	Fe
263	Trap1	+	+	351	Uqcrc1	+	+
	Hsp90aa1				Hnrnpf		
266	Pcca	-	+		Hnrnp1		
269	Ndufs1	+	-		Hnrnp2		
271	Tmg2	-	+	353	Hsp90b1	+	+
274	Aldh16a1	-	+	361	Aldh1a7	+	-
278	Tf	+	+		Ugp2		
279	Dmgdh	+	-	364	Adh5	+	-
284	Sardh	+	-		Sord		
285	Vcp	+	-	368	Cpox	+	-
286	Aldh111	+	+		Qdpr		
288	Ogdh	+	-	373	Gsta 1	+	-
292	Aars	+	-		Gsta 2		
295	Cps1	+	-	374	Gsta 3	+	-
301	C1qbp	+	-		Hsd17b10		
304	Dhfr	+	-	390	Ass1	+	+
	Psemb2				ldh1		
305	Ywhab	+	-	392	Kat3	+	-
	Ywhae				Bcs1l		
	Ywhah			396	Adh1	+	-
	Ywhag				Got2		
	Ywhaz				399		
Olah	400	Pbld	+	-			
308	Rnh1	+	-	401	Gsto1	+	-
312	Aadat	+	-	403	Psma6	+	+
	Acaa2			407	Fh	+	-
320	Dpp3	+	-	411	Mdh2	-	+
329	Ces1f	+	-		Pecr		
	Cesl1			416	Decr1	+	-
332	Erp29	+	-	427	Eif5a	-	+
	Hprt1						
346	Aldh2	+	-				
349	P4hb	+	-				
350	Dctn2	+	+				
	Pdia6						
	Zfp57						

+ presença ou - ausência do elemento no *spot*

Os experimentos desenvolvidos no laboratório necessitam ser complementados pelas análises virtuais feitas com o auxílio da computação (HOCHSTRASSER, 1998). A análise e representação de redes biológicas tornou-se uma ferramenta para ajudar entender o papel biológico resultante das possíveis alterações proteicas em situações fisiológicas e patológicas (MILLAN, 2013). Nesse sentido, para compreender o significado biológico dos resultados quantitativos da análise proteômica, as proteínas diferencialmente alteradas entre os diferentes grupos experimentais do presente estudo, foram analisadas de acordo com a categoria “processos biológicos” do *Gene Ontology* (figuras 17-20).

A análise funcional revelou que a maioria das proteínas encontradas estavam associadas a termos do metabolismo. Encaixam-se nesta categoria, por exemplo, proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, carboidratos, síntese de energia lipídeos e ácidos graxos (RISON; HODGMAN e THORNTON, 2000). De maneira geral, proteínas relacionadas ao metabolismo são compreendidas como aquelas cuja função está relacionada com a obtenção de energia e degradação de macromoléculas, além de pequenas moléculas. Portanto, as alterações de expressão nessas proteínas sugerem que o metabolismo pode ser significativamente alterado quando da exposição ao Pb e ao Fe.

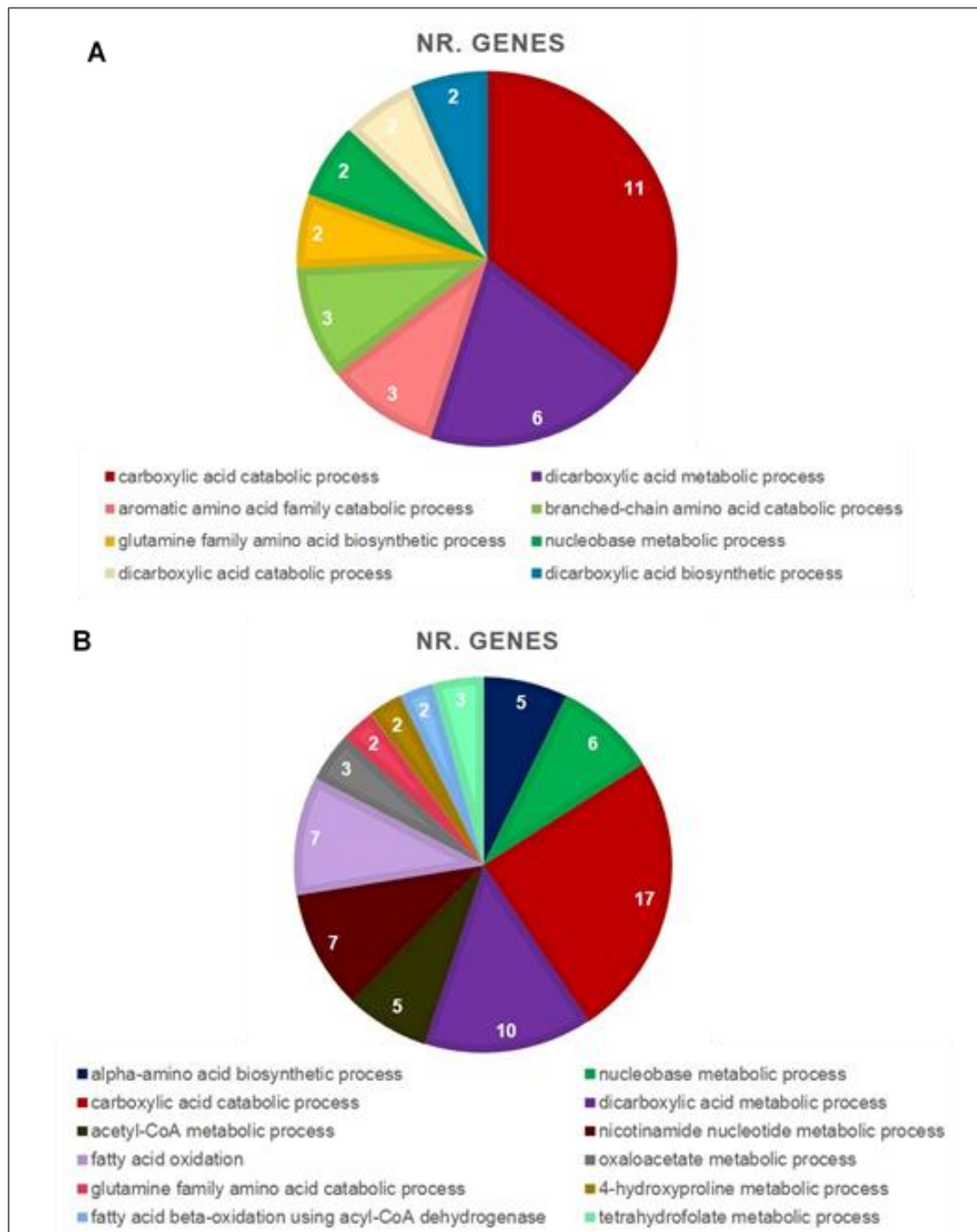


Figura 17. Categorização das proteínas identificadas de acordo com os “processos biológicos”, obtido através do ClueGO. **A-** GC x GEI; **B-** GC x GEII

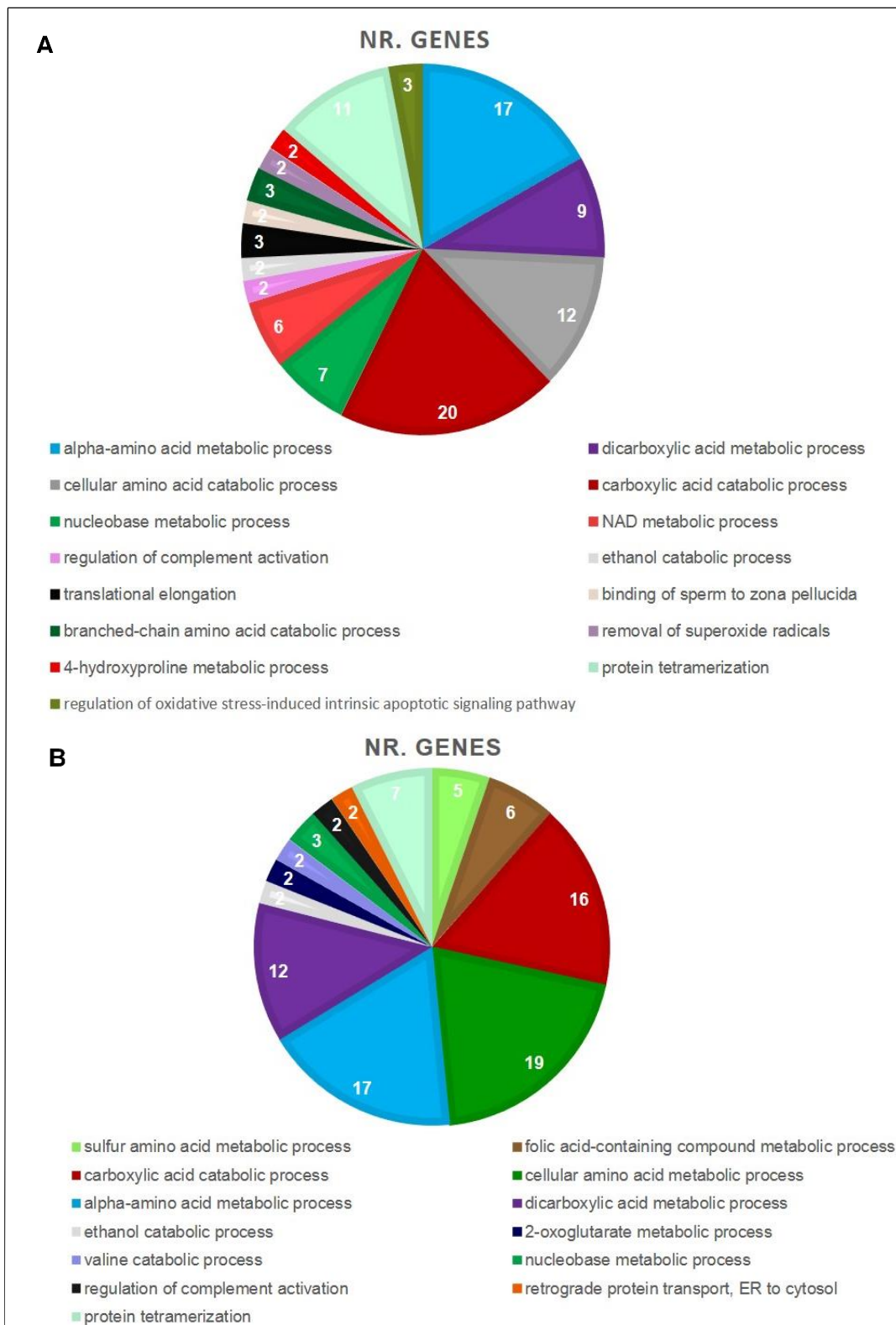


Figura 18. Categorização das proteínas identificadas de acordo com os “processos biológicos”, obtido através do ClueGO. **A-** GC x GEIII; **B-** GC x GEIV.

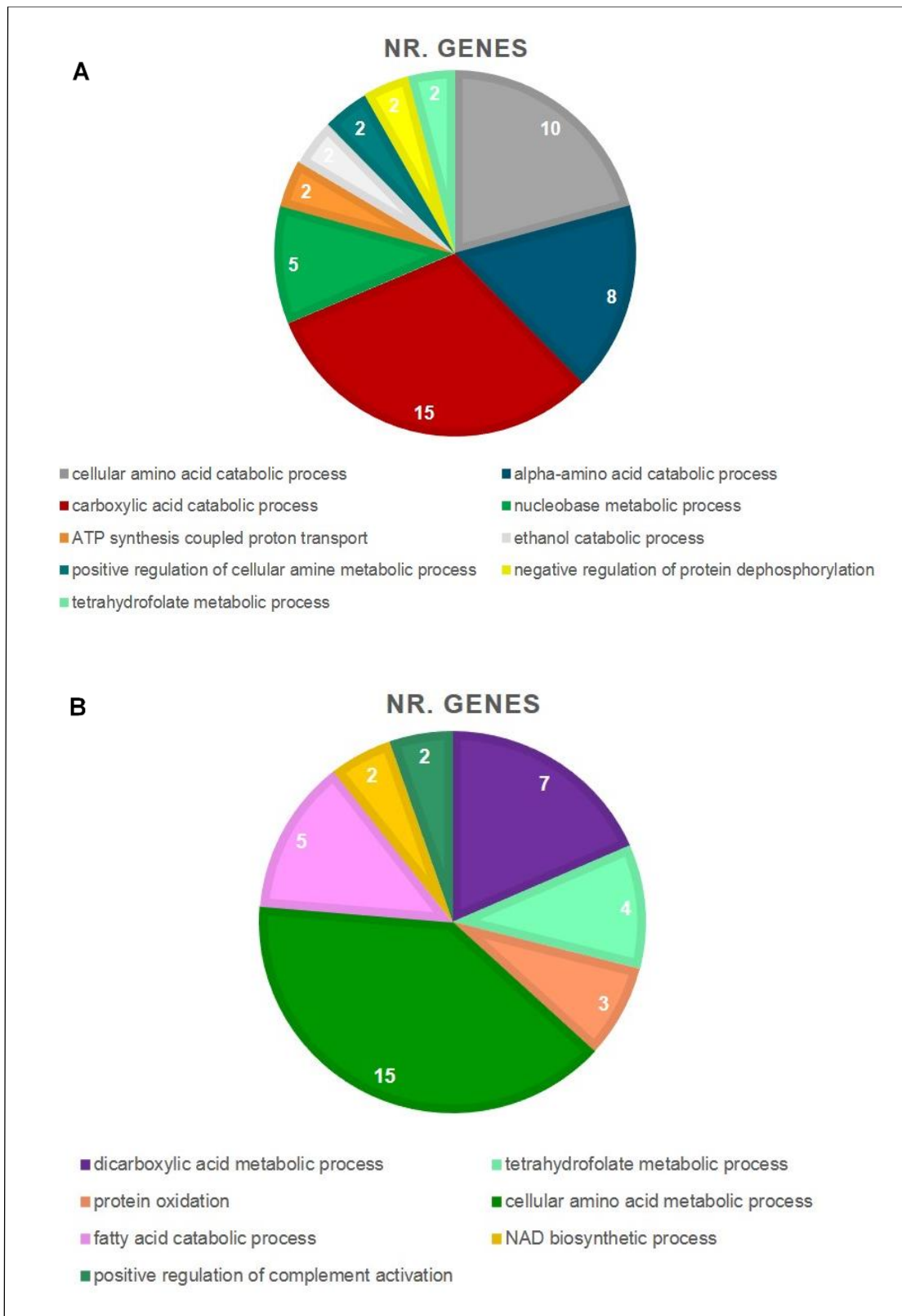


Figura 19. Categorização das proteínas identificadas de acordo com os “processos biológicos”, obtido através do ClueGO. **A-** GC x GEV; **B-** GEII x GEIII.

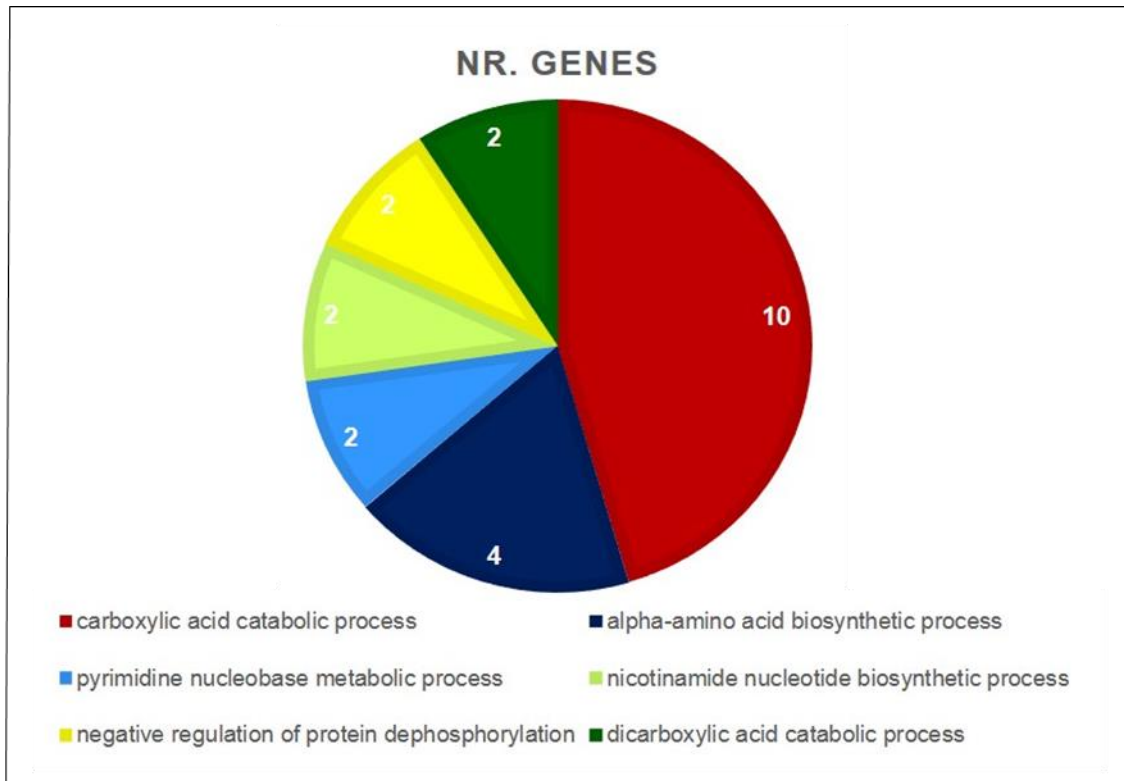


Figura 20. Categorização das proteínas identificadas de acordo com os “processos biológicos”, obtido através do ClueGO. Comparação GEIV x GEV.

Devido à contaminação por substâncias poluentes e/ou tóxicas, quando ocorrem interferências no metabolismo, o estado de saúde dos organismos pode ser afetado. E este estado de saúde pode cair sobre o equilíbrio entre a eliminação e a produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs), originadas do metabolismo normal em seres aeróbios, em mecanismos de defesa antioxidante e na peroxidação de lipídios (DI GIULIO, 1995; VALAVANIDIS; VLAHOIANNI; DASSENAKIS et al., 2006). Quando há aumento na produção dos radicais livres, diminuição dos efeitos protetores ou ambos, a célula fica exposta aos efeitos do estresse oxidativo, que acarretará em danos às macromoléculas celulares como o DNA, proteínas e lipídios, inclusive com danos à membrana celular (BIESALSKI, 2000; KLATT, 2002).

O ajuste do processo oxidativo nos organismos expostos a substâncias químicas ocorre primariamente no fígado, órgão considerado o mais importante, onde enzimas consideradas chave no processo oxidativo são sintetizadas e responsáveis pela defesa contra a geração de EROs (MORENO; PICHARDO; JOS

et al., 2005). Os metais podem alterar o equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e o sistema de proteção antioxidante. Portanto, seus efeitos tóxicos passam a resultar em alterações no funcionamento das células, podendo levá-las à morte (RAND, 1995).

As espécies reativas precisam ser neutralizadas pelos antioxidantes, enzimas responsáveis por esse processo, cujas concentrações encontram-se alteradas na tentativa de proteger as células dos efeitos danosos que possam vir a ocorrer em decorrência das EROs, que muitas vezes são fruto da exposição a poluentes (HALLIWELL, 1999). No presente estudo, foram observadas alterações em alguns agentes antioxidantes, e esses resultados podem indicar a ocorrência do acúmulo destes metais no fígado (Pb e Fe), gerando espécies reativas, desencadeando assim efeitos danosos das EROs.

Uma das enzimas responsáveis pelo equilíbrio oxidativo é a Catalase (CAT), que se encontra em células animais, principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Ela promove a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (HERMES-LIMA, 2004). Observadas tanto em campo como em laboratório, as respostas da CAT a poluentes orgânicos ou inorgânicos podem variar desde a inibição até a sua indução (ROMEO; BENNANI; GNASSIA-BARELLI et al., 2000; SANCHEZ; PALLUEL; MEUNIER et al., 2005). No presente estudo, em todas as comparações entre o grupo controle com os experimentais, a CAT apresentou-se subexpressa em todos os experimentais, e os dados obtidos por GFAAS indicaram a presença de Pb nos *spots* referentes à CAT. Dependendo do agente impactante, o resultado é a inibição enzimática como resultado da redução na transcrição do RNA (WOO; YUM; PARK et al., 2009), mas a inibição da CAT também pode estar associada à ligação de metais aos grupamentos –SH da enzima, assim alterando seus níveis e sua atividade (ATLI e CANLI, 2007; GURER e ERCAL, 2000).

Um estudo de 2009, onde foi avaliado, dentre outros, o efeito da exposição ao Pb durante a gestação e lactação no tecido hepático em ratos, a CAT exibiu uma redução significativa em sua atividade (PILLAI; PATEL; PANDYA et al., 2009). Segundo os autores, a inativação de uma enzima por metais pesados pode também ser atribuída a alterações conformacionais que conduzem à perda de

atividade catalítica. Um fato interessante é que a redução da CAT é acompanhado do aumento da Superóxido Dismutase (SOD), cujo aumento é atribuído à liberação de superóxido O_2^- , produzido por poluentes (ROMEO; BENNANI; GNASSIA-BARELLI et al., 2000). Deste modo, a exposição ao Pb realizada no presente estudo pode ter levado a uma alta produção desse radical, contribuindo também, para a redução da CAT.

A enzima Superóxido dismutase 2 mitocondrial (SOD2), encontrada em mitocôndrias e dependente de Mn, também possui a função de proteger a célula contra o estresse oxidativo, pois catalisa a dismutação do ânion do radical superóxido para peróxido de hidrogênio e água. Em condições de estresse oxidativo, é comum que a SOD2 tenha seus níveis de atividade elevados (HERMES-LIMA, 2004). No atual estudo, foi encontrada subexpressa no grupo experimental III, quando comparada com o controle, o que pode ser prejudicial para a célula, já que uma maior expressão da enzima é esperada para que se possa barrar a formação de radicais livres e para que os níveis de hidroperóxidos diminuam no tecido. Deve-se destacar que neste estudo o *spot* 39 de tecido hepático foi caracterizado como sendo essa enzima (SOD2) e os dados obtidos por GFAAS indicaram Pb incorporado em sua estrutura nos grupos experimentais III (100 mg/L $Pb(C_2H_3O_2)_2 + FeSO_4$) e IV (400 mg/L $Pb(C_2H_3O_2)_2$). As SODs são enzimas Zn dependentes, no entanto, tem sido relatado que o Pb atua na redução de Zn no cérebro, resultando na deficiência de enzimas antioxidantes neste tecido (YASUI e VERITY, 1996). Desse modo a redução da SOD poderia estar associada a esta deficiência de zinco, porém, para comprovar esta hipótese seria interessante fazer uma dosagem de Zn no tecido hepático. O mesmo poderia acontecer com a SOD2, já que o Pb poderia neste caso ocupar o lugar o sítio do Mn.

A glutathiona peroxidase (GPx) é a peroxidase mais importante para a desintoxicação de hidroperóxidos (LACKNER, 2008). A GPX1, tem atividade bem direcionada para equilibrar o estresse oxidativo celular (BRIGELIUS-FLOHE, 2006). Neste estudo, nas comparações onde a CAT encontrou-se subexpressa, a GPx1 foi encontrada superexpressa, indicando que, neste caso, a atuação da GPx pode ter sido o principal mecanismo de defesa antioxidante. O aumento da

expressão de GPx já foi anteriormente observado em fígado de peixes expostos a locais contaminados com metais pesados (AHMAD; PACHECO e SANTOS, 2006). Esse mesmo perfil de expressão para a CAT e a GPx também foi encontrado em fígado de ratos expostos a 0,1% de chumbo na água, (FLORA; PANDE e MEHTA, 2003). Entretanto, há resultados controversos na literatura, justificados pelo fato do Pb reduzir a captação de selênio, que é um cofator para a GPx (SCHRAUZER, 1987; WANG, J.; ZHU; YANG et al., 2013).

A Glutathione S-Transferase (GST) é de ampla ocorrência e compreende uma superfamília de enzimas com funcionalidade múltipla. Representa um grupo de enzimas de detoxificação, as quais são envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo e com a detoxificação de xenobiótico e metais pesados (HAYES e STRANGE, 1995; NEBERT e DALTON, 2006). Um estudo de 2008 analisou o efeito de metais sobre as brânquias e fígado de peixes coletados de locais poluídos, nos quais foram detectados níveis elevados de atividade da GST (FERNANDES; FONTAINHAS-FERNANDES; FERREIRA et al., 2008). A expressão e atividade da GST também foram avaliadas em rins de ratos após exposição ao Pb, e os resultados mostraram que tanto a expressão como atividade estavam aumentadas. Entretanto, este mesmo trabalho reportou uma redução da GST no fígado dos animais (DAGGETT; OBERLEY; NELSON et al., 1998). Estudos observaram que após uma dose aguda de nitrato de Pb, os níveis de GST estavam aumentados no tecido hepático (ROOMI; COLUMBANO; LEDDA-COLUMBANO et al., 1986). Assim, é possível observar que a exposição ao Pb promove alterações da enzima GST em fígado e rins. No presente estudo, enzimas da família GST (GSTA1,2,3; GSTM1,2,3,5) estavam aumentadas no GEIII, GEIV e GEV quando comparado com GC. Essa maior expressão de GST no organismo pode ser uma tentativa de reduzir os efeitos tóxicos causados pelo Pb.

A proteína *Endoplasmic reticulum protein 29* (ERp29) participa em fases iniciais da síntese de proteica, funcionando como uma chaperona que auxilia no enovelamento proteico e distribuição de proteínas. Sua expressão já foi detectada em mais de 30 tecidos diferentes de humanos e ratos, sugerindo que a mesma seja um marcador do retículo endoplasmático, ainda que não se saiba

se ela é expressa em todas as células que contêm essa organela (HUBBARD; MANGUM e MCHUGH, 2004; SHNYDER e HUBBARD, 2002). Em situações onde ocorre estresse metabólico, células de hepatoma de ratos expressaram altos níveis de ERp29, sugerindo que essa proteína é um membro de resposta ao estresse no retículo endoplasmático (ER) (MKRTCHIAN; BARYSHEV; MATVIJENKO et al., 1998). Foi observado ainda que quando células são submetidas a estresse com radiação (Zhang, B.; Wang; Yang et al., 2008), homocisteína (Hung; Wang; Pan et al., 2009), ou dopamina (Dukes; Van Laar; Cascio et al., 2008), também ocorre um aumento expressivo na expressão ERp29, indicando um potencial papel protetor contra estresse celular.

Esta proteína foi encontrada subexpressa nas comparações entre grupo controle e os grupos experimentais II (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂) e III (100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂ + FeSO₄). A ERp29 interage com a GRP78, é uma proteína ligante de Ca²⁺ conhecida por formar complexos com proteínas que são processadas através do ER, e que possuem propriedades de proteção celular causadas pela perturbação da homeostase do ER (FANG; WANG; HUANG et al., 2014; JAMORA; DENNERT e LEE, 1996; LITTLE; RAMAKRISHNAN; ROY et al., 1994). A baixa expressão da ERp29 encontrada no tecido hepático do presente estudo, pode ter um impacto negativo na síntese proteica, levando a um acúmulo de proteínas desenoveladas (unfolding) no ER induzindo ao estresse do ER. Esse acúmulo de proteínas desenoveladas leva ainda ao aumento de EROs, causando desbalanceamento do sistema antioxidante. Um recente estudo utilizando a abordagem proteômica para avaliar o risco hepatotóxico causado pelo acetato de chumbo através da exposição pela pele, mostrou alterações mais significativas em proteínas envolvidas no enovelamento proteico, estresse do ER e apoptose na presença do Pb. O Pb pode induzir um desequilíbrio oxidativo, causar comprometimento proteico podendo resultar em estresse do ER seguido de lesões hepáticas (FANG; WANG; HUANG et al., 2014).

A Arginase 1 (ARG1) e Carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) foram encontradas subexpressas nas comparações dos grupos experimentais (exceto GV) com o grupo controle. A ARG1 é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise da L-arginina em L-ornitina e uréia, sendo expressa primariamente no fígado e

eritrócitos (CHRISTIANSON, 2005). Após avaliações e confrontação com outras enzimas, o aumento desta foi o mais sensível para indicar danos hepáticos (IKEMOTO; TSUNEKAWA; TODA et al., 2001), e por isso é utilizada como marcador específico de fígado, podendo refletir não somente em ocorrência precoce de lesão hepática, como também lesão tardia terminal. A CPS1 é uma enzima mitocondrial do tecido hepático que catalisa a conversão da amônia e bicarbonato em carbamil fosfato, o primeiro passo no ciclo da ureia.

A inibição dessas enzimas aumenta os níveis de arginina e o óxido nítrico (NO) (CURE; CUMHUR CURE; TUMKAYA et al., 2014). A redução na expressão dessas enzimas nos grupos intoxicados é mais um indicativo de danos hepáticos. Correlacionando com os possíveis mecanismos intracelulares de entrada de Pb e sabendo que a ARG1 é uma metaloenzima (requer Mg^{+2}), existe a possibilidade do Pb ter ocupado o lugar do Mg^{+2} , assim diminuindo a expressão da mesma. A literatura não relata a interação dessa metaloproteína com metais potencialmente tóxicos, no entanto nossos dados de GFAAS, revelaram Pb no *spot* 155, caracterizado como ARG1. Além disso, a intoxicação pelo Pb pode ter induzido a depleção da CPS1 mitocondrial. Os mecanismos relacionados a essa depleção ainda são desconhecidos, mas tem sido sugerido que pode ser relacionada com a remoção de mitocôndrias, danificadas pelo estresse oxidativo, por autofagia (CROUSER; JULIAN; HUFF et al., 2006).

A *ATP synthase mitochondrial*, é uma ATPase composta por dois domínios estruturais F_0F_1 . Sendo a F_0 um complexo integral de membrana localizado na membrana interna da mitocôndria e está envolvido na translocação dos prótons provenientes da cadeia respiratória. Já a porção F_1 é um complexo extramembranar voltado para a matriz mitocondrial, formado por nove subunidades com composição $\alpha_3\beta_3\delta\epsilon$ (CHOU; WU; TSAI et al., 2011; COLLINSON; FEARNLEY; SKEHEL et al., 1994; NELSON e COX, 2002). As subunidades α e β são estruturalmente similares, cada unidade composta por três domínios: um N-terminal pequeno, um domínio de ligação a nucleotídeo e um domínio C-terminal helicoidal. Contudo, apenas a subunidade β apresenta mudanças conformacionais cruciais para a síntese de ATP (LEYVA; BIANCHET e AMZEL, 2003; NELSON e COX, 2002). No presente trabalho foram identificadas a *ATP synthase*

subunit alpha e beta mitochondrial, que estavam subexpressas nos grupos experimentais com relação ao grupo controle. Também foi identificada a *ATP synthase F(0)complex subunit b1,mitochondrial*, que encontrou-se superexpressa no GEV quando comparado ao controle. Entretanto essa mesma proteína apresentou-se subexpressa no GEV quando comparado com GEIV.

Estudos demonstram que a redução na expressão de *ATP synthase* pode provocar em regulação negativa da expressão de proteínas, redução da síntese de ATP e dano ao DNA nuclear, em função do prejuízo da função mitocondrial, o que pode ser parcialmente revertido pela administração de vitamina E (LU; PAN; KAO et al., 2004; REED; PERLUIGI; SULTANA et al., 2008). A diminuição da expressão da *ATP synthase* nos grupos experimentais, pode indicar que as concentrações recebidas de Pb, mesmo com as doses de Fe, podem ter reduzido a síntese de ATP, afetando todas as funções celulares dependentes desta, assim podendo promover consideráveis prejuízos energéticos. Uma diminuição da atividade dessa enzima foi relatada no estudo de Sharma e colaboradores (SHARMA; RAGHUVANSHI; JASWAL et al., 2015), e segundo os autores a acentuada perda de atividade de ATPases em ratos intoxicados, pode ser devida à interação do Pb com grupamento sulfidrílica da enzima. Nossos resultados indicam que o Pb não atrapalha a atividade da enzima, mas também reduz a sua expressão no tecido hepático.

Entretanto, foi observado um aumento na expressão dessa proteína no GEV, que pode ser explicado pelo fenômeno de apoptose. Os animais desse grupo recebem a maior quantidade de Pb concomitantemente com o Fe, o que pode ter induzido a apoptose mais facilmente. A apoptose é um processo que requer energia para que a célula seja capaz de ativar os mecanismos essenciais a morte programada, e, portanto, requer maior conteúdo de ATP. Uma vez que estes passos são finalizados a necessidade de energia deixa de existir e os níveis de ATP começam a cair gradualmente (SINGH e KHAR, 2005). Assim é possível que esse aumento da *ATP synthase* no GEV indique que o tecido hepático possa ter sofrido danos severos induzindo a apoptose dos hepatócitos.

As *Adenylate kinase (AK)*, são fosfotransferases que catalisam a reação de conversão de ATP e AMPc em duas moléculas de ADP, sendo esta reação

Mg⁺²-dependente e essencial em muitos processos celulares. A AK4, é a quarta enzima identificada da família das AKs, e ao contrário das outras AKs que são distribuídas por todos os tecidos, sua expressão tem sido relatada como sendo mais elevada no rim, moderada no coração e fígado, e mais baixa no cérebro (NOMA; FUJISAWA; YAMASHIRO et al., 2001; YONEDA; SATO; MAEDA et al., 1998). Sua função no organismo ainda não está clara, uma vez que *in vitro* apresentou baixa atividade enzimática (SCHULZ, 1987; SCHULZ; SCHILTZ; TOMASSELLI et al., 1986). Um estudo que investigou através da proteômica, a expressão proteica de quatro comprovados hepatocínicos, com o intuito de achar biomarcadores em comum. Dentre as oito proteínas em comum, as quais eram possíveis candidatas a biomarcadores, estava a AK4 (YAMAMOTO; KIKKAWA; YAMADA et al., 2006). No presente estudo, esta enzima foi encontrada apenas nos grupos experimentais que receberam Pb suplementado com Fe (GEIII e GEV), resultados que reforçam a probabilidade desta enzima atuar como protetora de danos de hepatotoxicidade.

A *S-adenosyl-L-methionine* (SAM) é um precursor chave da produção da Glutathiona hepática (GSH), além de ser um doador de metil para a maioria das reações de transmetilação. A Metionina Adenosiltransferase (MAT) é uma enzima que participa do metabolismo do aminoácido metionina, catabolizando a metionina em SAM. Posteriormente ocorre a transferência do grupo metil da SAM, sendo esta convertida a *S-adenosilhomocisteína* (SAH) e, posteriormente, hidrolisada a homocisteína. Portanto, a homocisteína (metabólito da metionina, e contém um grupamento SH-) é um aminoácido formado exclusivamente a partir da desmetilação da metionina. Além dessa via, a metionina pode ser novamente sintetizada a partir da homocisteína, pela ação da *Betaine-homocysteine S-methyltransferase* (BMHT), assim mantendo a homeostase da metionina e homocisteína (MATO; MARTINEZ-CHANTAR e LU, 2008).

Em um estudo sobre os efeitos da deficiência de zinco no metabolismo da metionina em fígados de ratos, os autores relatam a redução na utilização dos grupos metil, resultando na supressão de metilação. Isso pode ocorrer devido ao fato de a enzima BMHT ser uma metaloenzima zinco-dependente (WALLWORK e DUERRE, 1985). No presente estudo foram encontradas enzimas que participam

do metabolismo da metionina a MAT1A (*S-adenosylmethionine synthase isoform type-1*) e as BMHT e BMHT2. Ambas são consideradas *metal binding* e estão associadas a cofatores (Zn^{+2} , Mg^{+2}). Exceto no grupo II, as betaínas foram encontradas subexpressas em todos os grupos intoxicados comparados ao controle. Isso pode ser reflexo da habilidade que o Pb tem de substituir cátions polivalentes em seus sítios de ligação, impedido a correta formação da proteína. Alterações na expressão dessas metiltransferases podem causar desordem na via de remetilação da homocisteína a metionina ou na sua transulfuração a cisteína (UELAND e REFSUM, 1989). Supreendentemente a MAT1A estava superexpressa no grupo IV (400 mg/L $Pb(C_2H_3O_2)_2$). É possível que esse fato tenha sido um mecanismo de proteção desencadeado pela presença da alta concentração. A presença elevada da MAT1A leva ao acúmulo de SAM, cujo efeito hepatoprotetor já foi comprovado anteriormente perante a exposição crônica ao etanol (FEO; PASCALE; GARCEA et al., 1986; FEO; PIRISI; GARCEA et al., 1982; PASCALE; PIRISI; DAINO et al., 1982).

A *Catechol-O-methyltransferase* (COMT) é uma enzima relacionada ao metabolismo das catecolaminas e hormônios catecóis, cuja função é catalisar a transferência do grupo metil do SAM para o grupo hidroxila dos catecóis (dopamina, norepinefrina) durante o processo de metabolização dessas substâncias (WEINSHILBOUM; OTTERNESS e SZUMLANSKI, 1999). Camundongos com deficiência de COMT exibem um aumento nos níveis de DOPAC (Ácido 3,4-diidroxifenilacético), que é um metabólito da dopamina (HUOTARI; GOGOS; KARAYIORGOU et al., 2002). A análise proteômica em fígados de ratos COMT-*Knockout* (KO) revelou que várias proteínas ligadas à resposta ao estresse estavam alteradas e que essas alterações contribuem para um prejuízo na regulação homeostática do fígado (TENORIO-LARANGA; MANNISTO; KARAYIORGOU et al., 2009). No presente estudo, essa enzima foi encontrada subexpressa nos GEIV e GEV quando comparadas com o controle. E nesses mesmos grupos experimentais foram encontradas concentrações de Pb nos *spots* proteicos através da GFAAS. Deste modo, é possível que alterações na estrutura da proteína pela presença do Pb levem à rápida degradação dessa proteína.

A maior parte do Pb circulante está associada aos eritrócitos (KOSNETT, 2003) e cerca de 5 a 10% do Pb-S está no plasma, provavelmente ligado à albumina, α_2 -globulina ou como íons livres (GOYER, 1996). A albumina do soro é a principal proteína do plasma, desempenha também papel na manutenção do equilíbrio ácido-básico, no transporte de uma variedade de substâncias fisiológicas, na distribuição e metabolismo de diferentes substâncias endógenas e exógenas e ainda como reservatório de aminoácidos. O nível de albumina no soro é um dos vários parâmetros clínicos do estado de saúde geral, existindo uma correlação acentuada entre baixos níveis de albumina e incidência de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados (WHICHER e SPENCE, 1987). É uma proteína que se liga a metais, sendo a maior transportadora de zinco no plasma sanguíneo (PETERS, 1996). A albumina foi identificada nesse estudo, apresentando-se subexpressa nos GEII, GEIV e GEV quando comparadas ao GC. Essa redução na expressão da albumina no fígado pode ser resultado da inibição na síntese proteica causada pela presença dos metais. Esses resultados corroboram os achados de (ABDOU e NEWAIRY, 2006; GOPAL; PARVATHY e BALASUBRAMANIAN, 1997), que estipularam que a redução da albumina no sangue e fígado poderia ser atribuída a alterações no metabolismo da proteína e de aminoácidos livres bem como à sua síntese no fígado. Mas também poderia estar relacionada com possível efeito protetor da albumina, como visualizado anteriormente *in vitro*, onde células foram expostas ao Pb e tratadas com BSA. Os resultados mostraram uma redução na toxicidade do Pb na presença da BSA (NAQVI; LU; NAQVI et al., 2011). No *spot* correspondente a esta proteína, mesmo em baixa quantidade, foi encontrado Pb nas análises dos GEIV e GEV. Isso porque os íons Pb interagem fortemente com a albumina, e essa interação pode acarretar na perda de carga dos sítios de ligação da albumina, devido à carga do Pb. Como resultado, a repulsão de Coulomb deixa de existir dando origem a interações dipolo que atuam como o principal contribuinte para promover a aglomeração proteica (LIU, P.; XIAO; LI et al., 2007; SAHA e YAKOVLEV, 2010).

Outra enzima encontrada alterada no presente estudo foi a *Delta-aminolevulinic acid dehydratase* (ALAD), que é uma enzima dependente de Zn e

participa da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos como a heme. A ALAD possui uma alta afinidade por Pb, podendo esse ocupar o sítio do Zn na molécula de ALAD. Esse fenômeno resulta num potente efeito inibitório dessa enzima, sendo a medição da sua atividade utilizada como um marcador da exposição ao Pb (CHISOLM; THOMAS e HAMILL, 1985; RABINOWITZ; WETHERILL e KOPPLE, 1976; WARREN; COOPER; WOOD et al., 1998). O resultado é um acúmulo do seu substrato, o ácido 5-aminolevulínico (ALA), que por sua vez é associado a neuropatogênias provocadas pelo envenenamento pelo Pb (WARREN; COOPER; WOOD et al., 1998). Surpreendentemente, a ALAD foi encontrada superexpressa no GEV quando comparado com o controle. É possível que diante do acúmulo de ALA, o organismo aumente a produção da ALAD na tentativa de compensar os efeitos inibitórios do Pb pelo aumento na quantidade de enzima. O aumento na expressão dessa enzima também foi vista em eritrócitos de ratos submetidos a exposição ao Pb (FUJITA; ORII e SANO, 1981).

De maneira geral os dados obtidos no presente estudo demonstram que o Pb foi capaz de induzir alterações em proteínas envolvidas nos processos de síntese e endereçamento de proteínas, ciclo celular, via glicolítica, ciclo do ácido cítrico, transporte celular, metabolismo de lipídeos, metabolismo de aminoácidos, dentre outras. Muitas proteínas tiveram sua expressão diminuída, o que pode ser resultado da rápida degradação ou ainda da inibição da síntese proteica, induzidas pela presença do Pb (FARKAS, 1975; HEO; MONDAL; GAO et al., 2007; OTZEN; BARCISZEWSKI e CLARK, 1994; SUI; ZHANG; ZHANG et al., 2015).

Sabe-se que a estrutura de uma proteína determina não somente suas propriedades catalíticas, mas também a sua estabilidade intracelular, onde perturbações na estrutura proteica levam à sua degradação (GOLDBERG, 1972; GOLDBERG e DICE, 1974). O fato de o Pb ter sido encontrado em alguns *spots* proteicos pode ter levado a mudanças conformacionais que são reconhecidas pela maquinaria de degradação proteica, contribuindo para a redução da expressão de certas proteínas. A síntese proteica é altamente dependente da presença de moléculas intactas de RNA ribossômico, mensageiro e transportador. O Pb é conhecido por ser um potente agente de degradação de RNA (AETHRANIS e FARKAS, 1995; FARKAS, 1975; LIU, C.; YU; SHI et al., 2007).

Assim, a diminuição na expressão proteica poderia ainda ser explicada pela ação do Pb no RNA, levando à inibição da síntese proteica.

Há muitos questionamentos em relação a um limite de segurança para exposição ao Pb, uma vez que pesquisas experimentais e clínicas mostraram uma relação entre concentrações baixas de Pb no sangue (menores que 10,0 µg/dL) e aumento do estresse oxidativo (GONICK; DING; BONDY et al., 1997; SOLLIWAY; SCHAFFER; PRATT et al., 1996; VAZIRI e KHAN, 2007). Os resultados aqui apresentados demonstram que mesmo estando em baixa dose no sangue total (cerca de 10 µg/dL), o Pb resultou em alterações de diversas proteínas. Sabe-se que o Pb é capaz de aumentar a quantidade de radicais superóxido e de peróxido de hidrogênio, entretanto os dados da literatura com relação ao sistema antioxidante são contraditórios, tendo relatos em que há um aumento na produção de enzimas antioxidantes, bem como estudos que relatam uma diminuição dessas enzimas como parte dos efeitos tóxicos causados pelo Pb (ABBOTT, 1999; ADEGBESAN e ADENUGA, 2007; KACZMAREK-WDOWIAK; ANDRZEJAK; SKOCZYNSKA et al., 2004; MOUSA; AL-QARAWI; ALI et al., 2002; NEHRU e KANWAR, 2004; NI; HOU; BARTON et al., 2004; SANDHIR e GILL, 1995; SUGAWARA; NAKAMURA; MIYAKE et al., 1991). O fato é que no presente estudo várias proteínas que compõem o sistema antioxidante foram encontradas subexpressas, indicando um comprometimento desse sistema, o que pode levar a danos hepáticos severos se a situação não for revertida.

Apesar da deficiência de Fe ser associada a maior absorção do Pb (ALABDULLAH; BAREFORD; BRAITHWAITE et al., 2005; MAHAFFEY, 1983; WOLF; JIMENEZ e LOZOFF, 2003) o esperado efeito protetor do Fe não foi confirmado nem através da análise de Pb no sangue, nem pelo estudo proteômico, pois o Fe sozinho também foi capaz de prover alterações no perfil de expressão das proteínas. Apesar de ser um elemento essencial, o Fe em excesso tem um efeito altamente tóxico, reagindo com as EROs pelas reações de Fenton e Haber-Weiss (figura 21), gerando de radicais OH⁻, que por sua vez aumentam peroxidação lipídica em organelas e membranas celulares, oxidação dos aminoácidos, quebra das fitas de DNA e fragmentação de proteínas (ANDERSON e SHAH, 2013; KOPPENOL, 2001), efeitos comprovados através da exposição

crônica de ratos ao Fe, onde foi demonstrado um aumento de peroxidação lipídica em hepatócitos (BACON; BRITTENHAM; TAVILL et al., 1983; BACON; TAVILL; BRITTENHAM et al., 1983). Zhang e colaboradores (ZHANG, Y.; HUANG; DENG et al., 2012) verificaram que o excesso de Fe induz, além do estresse oxidativo, o estresse nitrosativo, isto é a produção de espécies reativas de nitrogênio, em fígado de ratos, aumentando o dano hepático. Portanto, fica claro que o Fe não deve ser utilizado como estratégia terapêutica para reduzir a intoxicação pelo Pb, pelo menos na dose empregada no presente estudo.

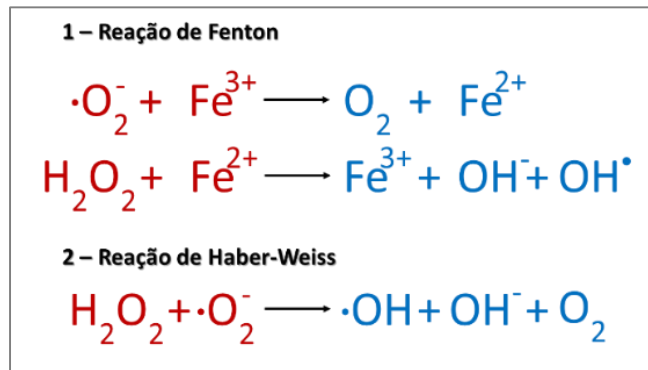


Figura 21. Diagrama esquemático das reações de Fenton e Haber-Weiss. O ferro é um cofactor catalítico potente, que aumenta a produção de radicais de superóxido, que pode causar dano celular (adaptado de (ANDERSON e SHAH, 2013).

Conclusão

6 CONCLUSÃO

O Pb apresentou um papel deletério no tecido hepático dos grupos submetidos a intoxicação por este metal. Foram encontradas alterações até mesmo em dosagens mais baixas no sangue (em torno 10 µg/dL), aqui representado pelos grupos que receberam 100 mg/L Pb(C₂H₃O₂)₂. Ao contrário do esperado, o Fe, na dosagem empregada, não foi capaz de reduzir significativamente os níveis de Pb sanguíneo ou hepático. Alterações histomorfológicas, foram vistas em todos os grupos experimentais intoxicados pelo Pb, podendo refletir no estado funcional do tecido. Por meio da análise proteômica foram encontradas alterações em todos os grupos intoxicados. O Pb foi capaz de induzir alterações na expressão de várias proteínas, como proteínas relacionadas ao sistema antioxidante e síntese proteica. O fato de todos os grupos experimentais intoxicados apresentarem alterações, sugere que o Fe não deve ser adotado como medida terapêutica para redução da absorção de Pb, pelo menos na dose empregada no presente estudo.

Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. **Nature**, 402, 6763, 715-720, 1999.

ABDOU, H.;NEWAIRY, A. Hepatic and reproductive toxicity of lead in female rats and attenuation by flaxseed lignans. **Journal of Medical Research Institute**, 27, 295-302, 2006.

ACCLPP, A. C. o. C. L. P. P. (2012). Low level lead exposure harms children: a renewed call for primary prevention. US Department of Health and Human Services, C., Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. Atlanta, GA.

ADEGBESAN, B. O.;ADENUGA, G. A. Effect of lead exposure on liver lipid peroxidative and antioxidant defense systems of protein-undernourished rats. **Biol Trace Elem Res**, 116, 2, 219-225, 2007.

ADHIKARI, A.;PENATTI, C. A.;RESENDE, R. R.;ULRICH, H.;BRITTO, L. R.;BECHARA, E. J. 5-Aminolevulinate and 4, 5-dioxovalerate ions decrease GABA(A) receptor density in neuronal cells, synaptosomes and rat brain. **Brain Res**, 1093, 1, 95-104, 2006.

ADONAYLO, V. N.;OTEIZA, P. I. Pb²⁺ promotes lipid oxidation and alterations in membrane physical properties. **Toxicology**, 132, 1, 19-32, 1999.

AETHRANIS, C. A.;FARKAS, W. Does the Pb(2+)-catalyzed depolymerization of RNA occur in vivo. **Nucleic Acids Symp Ser**, 33, 109-114, 1995.

AHAMED, M.;SIDDIQUI, M. K. Environmental lead toxicity and nutritional factors. **Clin Nutr**, 26, 4, 400-408, 2007.

AHMAD, I.;PACHECO, M.;SANTOS, M. A. Anguilla anguilla L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). **Chemosphere**, 65, 6, 952-962, 2006.

AISEN, P. Current concepts in iron metabolism. **Clin Haematol**, 11, 2, 241-257, 1982.

AL-BIDERI, A. Histopathological study on the effect of antioxidants (vitamin E and selenium) in hepatotoxicity induced by lead acetate in rats. **Al-Qadisiah Medical Journal**, 7, 12, 142-155, 2011.

ALABDULLAH, H.;BAREFORD, D.;BRAITHWAITE, R.;CHIPMAN, K. Blood lead levels in iron-deficient and noniron-deficient adults. **Clin Lab Haematol**, 27, 2, 105-109, 2005.

ALLOWAY, B. J. Heavy metals in soils. Academic, B. New Delhi: 1993. 339.

ANDERSON, E. R.; SHAH, Y. M. Iron homeostasis in the liver. **Compr Physiol**, 3, 1, 315-330, 2013.

ANDRADE, A. **Sequeciamento, identificação e análise das proteínas do caule de mudas de Eucalyptus grandis**. Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, 2006.

ANSARI, M. A.; MAAYAH, Z. H.; BAKHEET, S. A.; EL-KADI, A. O.; KORASHY, H. M. The role of aryl hydrocarbon receptor signaling pathway in cardiotoxicity of acute lead intoxication in vivo and in vitro rat model. **Toxicology**, 306, 40-49, 2013.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 145, 2, 282-287, 2007.

ATSDR, A. f. T. S. a. D. R.-. (1988). Methods and alternatives for reducing environmental lead exposure for young children and related risk groups. In: *The Nature and Extent of Lead Poisoning in Children in the United States: A Report to Congress*, Chapter IX. US: Department of Health and Human Services, P. H. S.

ATSDR, A. f. T. S. a. D. R.-. (1992). Case studies in environmental medicine-lead toxicity. US: Department of Health and Human Services, P. H. S. Atlanta.

ATSDR, A. f. T. S. a. D. R.-. (1999). Toxicological profile for lead. US Department of Health and Human Services, P. H. S.

ATSDR, A. f. T. S. a. D. R.-. (2007). Toxicological profile for lead. US Department of Health and Human Services, P. H. S.

BACON, B. R.; BRITTENHAM, G. M.; TAVILL, A. S.; MCLAREN, C. E.; PARK, C. H.; RECKNAGEL, R. O. Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic dietary iron overload is dependent on hepatic iron concentration. **Trans Assoc Am Physicians**, 96, 146-154, 1983.

BACON, B. R.; TAVILL, A. S.; BRITTENHAM, G. M.; PARK, C. H.; RECKNAGEL, R. O. Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. **J Clin Invest**, 71, 3, 429-439, 1983.

BAGCHI, D.; PREUSS, H. G. Effects of acute and chronic oval exposure of lead on blood pressure and bone mineral density in rats. **J Inorg Biochem**, 99, 5, 1155-1164, 2005.

BAGHURST, P. A.; MCMICHAEL, A. J.; VIMPANI, G. V.; ROBERTSON, E. F.; CLARK, P. D.; WIGG, N. R. Determinants of blood lead concentrations of pregnant women living in Port Pirie and surrounding areas. **Med J Aust**, 146, 2, 69-73, 1987.

BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; GUTOWSKA, I.; RYBICKA, M.; NOWACKI, P.; CHLUBEK, D. Neurotoxicity of lead. Hypothetical molecular mechanisms of synaptic function disorders. **Neurol Neurochir Pol**, 46, 6, 569-578, 2012.

BARBOSA, F., JR.;CORREA RODRIGUES, M. H.;BUZALAF, M. R.;KRUG, F. J.;GERLACH, R. F.;TANUS-SANTOS, J. E. Evaluation of the use of salivary lead levels as a surrogate of blood lead or plasma lead levels in lead exposed subjects. **Arch Toxicol**, 80, 10, 633-637, 2006.

BATISTA, B. L.;GROTTO, D.;RODRIGUES, J. L.;SOUZA, V. C.;BARBOSA, F., JR. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Anal Chim Acta**, 646, 1-2, 23-29, 2009.

BEARD, J. L.;CONNOR, J. R. Iron status and neural functioning. **Annu Rev Nutr**, 23, 41-58, 2003.

BEARD, J. L.;DAWSON, H.;PINERO, D. J. Iron metabolism: a comprehensive review. **Nutr Rev**, 54, 10, 295-317, 1996.

Beaumont C, B. P., Beuzard Y, Brugnara C (2006). Disorders of iron homeostasis, erythrocytes,erythropoiesis. Forum Service Editore. Genova, Italy: 393-406.

Bechara, E. J. H. (2004). Chumbo, Intoxicação e violência. In:Informativo Conselho Regional de Química-V Região, Conselho Regional de Química: 8-10.

BELLINGER, D. C. Very low lead exposures and children's neurodevelopment. **Curr Opin Pediatr**, 20, 2, 172-177, 2008.

BERNE, R.;LEVY, M.;KOEPPEN, B.;STANTON, B. **Fisiologia**. 5. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BEVERIDGE, T. J.;HUGHES, M. N.;LEE, H.;LEUNG, K. T.;POOLE, R. K.;SAVVAIDIS, I.;SILVER, S.;TREVORS, J. T. Metal-microbe interactions: contemporary approaches. **Adv Microb Physiol**, 38, 177-243, 1997.

BEYERSMANN, D. Interactions in metal carcinogenicity. **Toxicol Lett**, 72, 1-3, 333-338, 1994.

BIESALSKI, H. K. The role of antioxidants in nutritional support. **Nutrition**, 16, 7-8, 593-596, 2000.

BINDEA, G.;MLECNIK, B.;HACKL, H.;CHAROENTONG, P.;TOSOLINI, M.;KIRILOVSKY, A.;FRIDMAN, W. H.;PAGES, F.;TRAJANOSKI, Z.;GALON, J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. **Bioinformatics**, 25, 8, 1091-1093, 2009.

BLACKSTOCK, W. P.;WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends Biotechnol**, 17, 3, 121-127, 1999.

BOVELL-BENJAMIN, A. C.;GUINARD, J. X. Novel approaches and application of contemporary sensory evaluation practices in iron fortification programs. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 43, 4, 379-400, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, 248-254, 1976.

BRADMAN, A.;ESKENAZI, B.;SUTTON, P.;ATHANASOULIS, M.;GOLDMAN, L. R. Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated environments. **Environ Health Perspect**, 109, 10, 1079-1084, 2001.

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

BRIGELIUS-FLOHE, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. **Biol Chem**, 387, 10-11, 1329-1335, 2006.

CAMPOS, R. C. D. Avaliação do Conteúdo de Metais em Plantas de Uso na Medicina Popular e em seus Extratos Aquosos. **Ciênc.Tecnol.Aliment.**, 16, 3, 184-187, 1996.

CANDIANO, G.;BRUSCHI, M.;MUSANTE, L.;SANTUCCI, L.;GHIGGERI, G. M.;CARNEMOLLA, B.;ORECCHIA, P.;ZARDI, L.;RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, 25, 9, 1327-1333, 2004.

CANFIELD, R. L.;HENDERSON, C. R., JR.;CORY-SLECHTA, D. A.;COX, C.;JUSKO, T. A.;LANPHEAR, B. P. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. **N Engl J Med**, 348, 16, 1517-1526, 2003.

CDC, C. C. f. D. C. a. P. (2012). CDC response to Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention recommendations in "Low level lead exposure harms children: a renewed call for primary prevention. Services, U. D. o. H. a. H. Atlanta, GA.

CDC., C. f. D. C. a. P.-. (1991). Preventing Lead Poisoning in Young Children. <http://www.cdc.gov/nceh/lead/Publications/books/plpyc/contents.hmt>.

CELIK, A.;OGENLER, O.;COMELEKOGLU, U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. **Mutagenesis**, 20, 6, 411-415, 2005.

CHIDO, L. M.;COVINGTON, C.;SOKOL, R. J.;HANNIGAN, J. H.;JANNISE, J.;AGER, J.;GREENWALD, M.;DELANEY-BLACK, V. Blood lead levels and specific attention effects in young children. **Neurotoxicol Teratol**, 29, 5, 538-546, 2007.

CHIDO, L. M.;JACOBSON, S. W.;JACOBSON, J. L. Neurodevelopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels. **Neurotoxicol Teratol**, 26, 3, 359-371, 2004.

CHISOLM, J. J.; THOMAS, D. J.; HAMILL, T. G. Erythrocyte Porphobilinogen Synthase Activity as an Indicator of Lead-Exposure in Children. **Clinical Chemistry**, 31, 4, 601-605, 1985.

CHOI, J. W.; KIM, S. K. Association between blood lead concentrations and body iron status in children. **Arch Dis Child**, 88, 9, 791-792, 2003.

CHOU, J. L.; WU, C. H.; TSAI, C. Y.; CHANG, A. Y.; CHAN, S. H. Proteomic investigation of a neural substrate intimately related to brain death. **Proteomics**, 11, 2, 239-248, 2011.

CHRISTIANSON, D. W. Arginase: structure, mechanism, and physiological role in male and female sexual arousal. **Acc Chem Res**, 38, 3, 191-201, 2005.

COBANOGLU, U.; DEMIR, H.; SAYIR, F.; DURAN, M.; MERGAN, D. Some mineral, trace element and heavy metal concentrations in lung cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, 11, 5, 1383-1388, 2010.

COLLINSON, I. R.; FEARNLEY, I. M.; SKEHEL, J. M.; RUNSWICK, M. J.; WALKER, J. E. ATP synthase from bovine heart mitochondria: identification by proteolysis of sites in F₀ exposed by removal of F₁ and the oligomycin-sensitivity conferral protein. **Biochem J**, 303 (Pt 2), 639-645, 1994.

COLUMBANO, A.; LEDDA, G. M.; SIRIGU, P.; PERRA, T.; PANI, P. Liver cell proliferation induced by a single dose of lead nitrate. **Am J Pathol**, 110, 1, 83-88, 1983.

CORDEIRO R, L. F. E., SALGADO PET, SANTOS CO, CONSTANTINO L, MALATESTA MLLS. Distúrbios neurológicos em trabalhadores com baixos níveis de chumbo no sangue. II-Disfunções neurocomportamentais. **Rev.Saúde Pública**, 30, 358-363, 1996.

COSTA DE ALMEIDA, G. R.; PEREIRA SARAIVA MDA, C.; BARBOSA, F., JR.; KRUG, F. J.; CURY, J. A.; ROSARIO DE SOUSA MDA, L.; RABELO BUZALAF, M. A.; GERLACH, R. F. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. **Environ Res**, 104, 3, 337-345, 2007.

CRAWFORD, J. M. Histologic findings in alcoholic liver disease. **Clin Liver Dis**, 16, 4, 699-716, 2012.

CROUSER, E. D.; JULIAN, M. W.; HUFF, J. E.; STRUCK, J.; COOK, C. H. Carbamoyl phosphate synthase-1: a marker of mitochondrial damage and depletion in the liver during sepsis. **Crit Care Med**, 34, 9, 2439-2446, 2006.

CURE, E.; CUMHUR CURE, M.; TUMKAYA, L.; KALKAN, Y.; AYDIN, I.; KIRBAS, A.; YILMAZ, A.; YUCE, S.; YUCEL, A. F. Adalimumab ameliorates abdominal aorta cross clamping which induced liver injury in rats. **Biomed Res Int**, 2014, 907915, 2014.

DAGGETT, D. A.; OBERLEY, T. D.; NELSON, S. A.; WRIGHT, L. S.; KORNGUTH, S. E.; SIEGEL, F. L. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. **Toxicology**, 128, 3, 191-206, 1998.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. Hoboken: Wiley-interscience, 2007.

DE ALMEIDA, G. R.; DE SOUZA GUERRA, C.; TANUS-SANTOS, J. E.; BARBOSA, F., JR.; GERLACH, R. F. A plateau detected in lead accumulation in subsurface deciduous enamel from individuals exposed to lead may be useful to identify children and regions exposed to higher levels of lead. **Environ Res**, 107, 2, 264-270, 2008.

DEMASI, M.; COSTA, C. A.; PASCUAL, C.; LLESUY, S.; BECHARA, E. J. Oxidative tissue response promoted by 5-aminolevulinic acid promptly induces the increase of plasma antioxidant capacity. **Free Radic Res**, 26, 3, 235-243, 1997.

DI GIULIO, R., BENSON, W.H., SANDERS B.M., VAN VELD P.A. **Biochemical mechanisms: Metabolism, adaptation and toxicity**. Washington: Taylor & Francis, 1995. 523-562.

DONOVAN, A.; ROY, C. N.; ANDREWS, N. C. The ins and outs of iron homeostasis. **Physiology (Bethesda)**, 21, 115-123, 2006.

DRASCH, G. A. Lead burden in prehistorical, historical and modern human bones. **Sci Total Environ**, 24, 3, 199-231, 1982.

DUKES, A. A.; VAN LAAR, V. S.; CASCIO, M.; HASTINGS, T. G. Changes in endoplasmic reticulum stress proteins and aldolase A in cells exposed to dopamine. **J Neurochem**, 106, 1, 333-346, 2008.

Air quality criteria document for lead(Pb). Washington DC, 1986. 264-267

FAIRBANKS, V.; BEUTLER, E. Iron metabolism. Beutler E, L. M., Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams- Hematology**. New York: Mcgraw-Hill, 2001. 295-304.

FANG, J. Y.; WANG, P. W.; HUANG, C. H.; HUNG, Y. Y.; PAN, T. L. Evaluation of the hepatotoxic risk caused by lead acetate via skin exposure using a proteomic approach. **Proteomics**, 14, 21-22, 2588-2599, 2014.

FARKAS, W. R. Effect of plumbous ion on messenger RNA. **Chem Biol Interact**, 11, 4, 253-263, 1975.

FEO, F.; PASCALE, R.; GARCEA, R.; DAINO, L.; PIRISI, L.; FRASSETTO, S.; RUGGIU, M. E.; DI PADOVA, C.; STRAMENTINOLI, G. Effect of the variations of S-adenosyl-L-methionine liver content on fat accumulation and ethanol metabolism in ethanol-intoxicated rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, 83, 2, 331-341, 1986.

FEO, F.; PIRISI, L.; GARCEA, R.; DAINO, L.; PASCALE, R.; ZANETTI, S.; BIOCICA, M. E.; FRASSETTO, S.; CANUTO, R. A.; SATTA, A. The Role of Phosphatidylethanolamine

Methylation in the Synthesis of Phosphatidylcholine in Acute Ethanol Intoxication. **Research Communications in Substances of Abuse**, 3, 4, 499-502, 1982.

FERNANDES, C.;FONTAINHAS-FERNANDES, A.;FERREIRA, M.;SALGADO, M. A. Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. **Arch Environ Contam Toxicol**, 55, 2, 262-269, 2008.

FERREIRA, M. C. D. F. **Efeito do acetato de chumbo associado ou não ao sulfato ferroso em cérebro de ratos: análise das enzimas antioxidantes.** Doutorado -, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru, 2012.

FLORA, S. J.;PANDE, M.;MEHTA, A. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. **Chem Biol Interact**, 145, 3, 267-280, 2003.

FUJITA, H.;ORII, Y.;SANO, S. Evidence of increased synthesis of delta-aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead-poisoned rats. **Biochim Biophys Acta**, 678, 1, 39-50, 1981.

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

GAUTAM, P.;FLORA, S. J. Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. **Nutrition**, 26, 5, 563-570, 2010.

GE-HEALTHCARE. **2-D Electrophoreses: Principles and methods.** Buckinghamshire GE Healthcare, 2004.

GILMORE, K.;WILSON, M. The use of chloromethyl-X-rosamine (Mitotracker red) to measure loss of mitochondrial membrane potential in apoptotic cells is incompatible with cell fixation. **Cytometry**, 36, 4, 355-358, 1999.

GODWIN, H. A. The biological chemistry of lead. **Curr Opin Chem Biol**, 5, 2, 223-227, 2001.

GOLDBERG, A. L. Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli* (protein breakdown-protein structure-mistranslation-amino acid analogs-puromycin). **Proc Natl Acad Sci U S A**, 69, 2, 422-426, 1972.

GOLDBERG, A. L.;DICE, J. F. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. **Annu Rev Biochem**, 43, 0, 835-869, 1974.

GOMES, V. E.;ROSARIO DE SOUSA MDA, L.;BARBOSA, F., JR.;KRUG, F. J.;PEREIRA SARAIVA MDA, C.;CURY, J. A.;GERLACH, R. F. In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. **Sci Total Environ**, 320, 1, 25-35, 2004.

GONICK, H. C.;DING, Y.;BONDY, S. C.;NI, Z.;VAZIRI, N. D. Lead-induced hypertension: interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. **Hypertension**, 30, 6, 1487-1492, 1997.

GOPAL, V.;PARVATHY, S.;BALASUBRAMANIAN, P. Effect of heavy metals on the blood protein biochemistry of the fish *Cyprinus carpio* and its use as a bio-indicator of pollution stress. **Environmental monitoring and assessment**, 48, 2, 117-124, 1997.

GOYER, R. A. Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. **Environ Health Perspect**, 104, 10, 1050-1054, 1996.

GRATTAGLIANO, I.;BONFRATE, L.;DIOGO, C. V.;WANG, H. H.;WANG, D. Q.;PORTINCASA, P. Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: certainties and doubts. **World J Gastroenterol**, 15, 39, 4865-4876, 2009.

GRAVES, P. R.;HAYSTEAD, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol Mol Biol Rev**, 66, 1, 39-63; table of contents, 2002.

GROTTO, H. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev.Bras.Hematol.Hemoter**,, 30, 5, 390-397, 2008.

GUNSHIN, H.;MACKENZIE, B.;BERGER, U. V.;GUNSHIN, Y.;ROMERO, M. F.;BORON, W. F.;NUSSBERGER, S.;GOLLAN, J. L.;HEDIGER, M. A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature**, 388, 6641, 482-488, 1997.

GURER, H.;ERCAL, N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? **Free Radic Biol Med**, 29, 10, 927-945, 2000.

GUTTERIDGE, J. M.;WEST, M.;ENEFF, K.;FLOYD, R. A. Bleomycin-iron damage to DNA with formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and base propenals. Indications that xanthine oxidase generates superoxide from DNA degradation products. **Free Radic Res Commun**, 10, 3, 159-165, 1990.

GUYTON, A.;HALL, J. **General principles of gastrointestinal function-motility, nervous control and blood circulation**. Philadelphia, WB: Saunders Company, 1996. 793-813.

Halliwell, B. G., J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press: 936.

HAMMAD, T. A.;SEXTON, M.;LANGENBERG, P. Relationship between blood lead and dietary iron intake in preschool children. A cross-sectional study. **Ann Epidemiol**, 6, 1, 30-33, 1996.

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

HAYES, J. D.;STRANGE, R. C. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. **Free Radic Res**, 22, 3, 193-207, 1995.

HECKER, M.;BECHER, D.;FUCHS, S.;ENGELMANN, S. A proteomic view of cell physiology and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Int J Med Microbiol**, 300, 2-3, 76-87, 2010.

HEO, Y.;MONDAL, T. K.;GAO, D.;KASTEN-JOLLY, J.;KISHIKAWA, H.;LAWRENCE, D. A. Posttranscriptional inhibition of interferon-gamma production by lead. **Toxicol Sci**, 96, 1, 92-100, 2007.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry:role of free radicals**. Wiley-Liss, 2004. 319-368.

HOCHSTRASSER, D. F. Proteome in perspective. **Clin Chem Lab Med**, 36, 11, 825-836, 1998.

HOFFBRAND, A.;PETTIT, F.;MOSS, P. **Essential Hematology**. Oxford (UK): Blackwell Publishing, 2006.

HSIAO, C. Y.;WU, H. D.;LAI, J. S.;KUO, H. W. A longitudinal study of the effects of long-term exposure to lead among lead battery factory workers in Taiwan (1989-1999). **Sci Total Environ**, 279, 1-3, 151-158, 2001.

HUANG, D. W.;SHERMAN, B. T.;TAN, Q.;COLLINS, J. R.;ALVORD, W. G.;ROAYAEI, J.;STEPHENS, R.;BASELER, M. W.;LANE, H. C.;LEMPICKI, R. A. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. **Genome Biol**, 8, 9, R183, 2007.

HUBBARD, M. J.;MANGUM, J. E.;MCHUGH, N. J. Purification and biochemical characterization of native ERp29 from rat liver. **Biochem J**, 383, Pt. 3, 589-597, 2004.

HUNG, Y. C.;WANG, P. W.;PAN, T. L.;BAZYLAK, G.;LEU, Y. L. Proteomic screening of antioxidant effects exhibited by radix *Salvia miltiorrhiza* aqueous extract in cultured rat aortic smooth muscle cells under homocysteine treatment. **J Ethnopharmacol**, 124, 3, 463-474, 2009.

HUOTARI, M.;GOGOS, J. A.;KARAYIORGOU, M.;KOPONEN, O.;FORSBERG, M.;RAASMAJA, A.;HYTTINEN, J.;MANNISTO, P. T. Brain catecholamine metabolism in catechol-O-methyltransferase (COMT)-deficient mice. **Eur J Neurosci**, 15, 2, 246-256, 2002.

IKEMOTO, M.;TSUNEKAWA, S.;TODA, Y.;TOTANI, M. Liver-type arginase is a highly sensitive marker for hepatocellular damage in rats. **Clin Chem**, 47, 5, 946-948, 2001.

JACOB, L. C. B. **Efeitos da Exposição Simultânea Ao Chumbo e Ao Ruído Sobre O Sistema Nervoso Auditivo Central Em Trabalhadores De Uma**

Fábrica de Baterias. Tese de Doutorado -, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

JAMORA, C.;DENNERT, G.;LEE, A. S. Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93, 15, 7690-7694, 1996.

JUNQUEIRA, L.;CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a. Rio de Janeiro: 2008. 324-34.

JUNQUEIRA, L.;CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

JURDZIAK, M.;GAC, P.;MARTYNOWICZ, H.;POREBA, R. Function of respiratory system evaluated using selected spirometry parameters in persons occupationally exposed to lead without evident health problems. **Environ Toxicol Pharmacol**, 39, 3, 1034-1040, 2015.

KACZMAREK-WDOWIAK, B.;ANDRZEJAK, R.;SKOCZYNSKA, A.;MLYNEK, V. [The effect of chronic exposure to lead and cadmium on lipid peroxidation in the rat brain]. **Med Pr**, 55, 5, 403-410, 2004.

KAUFMANN, R. B.;CLOUSE, T. L.;OLSON, D. R.;MATTE, T. D. Elevated blood lead levels and blood lead screening among US children aged one to five years: 1988-1994. **Pediatrics**, 106, 6, E79, 2000.

KIM, H. S.;LEE, S. S.;HWANGBO, Y.;AHN, K. D.;LEE, B. K. Cross-sectional study of blood lead effects on iron status in Korean lead workers. **Nutrition**, 19, 7-8, 571-576, 2003.

KLAASSEN, C. Metais pesados e seus antagonistas. Rio de Janeiro: 1991. 1061-1065.

KLATT, P. L., S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. **European Journal of Biochemistry**, 267, 4928-4944, 2002.

KLOSE, J.;SPIELMANN, H. Gel isoelectric focusing of mouse lactate dehydrogenase: heterogeneity of the isoenzymes A4 and X4. **Biochem Genet**, 13, 9-10, 707-720, 1975.

KOPPENOL, W. H. The Haber-Weiss cycle--70 years later. **Redox Rep**, 6, 4, 229-234, 2001.

KOSNETT, M. J. Intoxicação por metais pesados e quelantes. Rio de Janeiro: 2003. 867-870.

Krug, F. J. N., J.A; Oliveira, P.V. (2004). Espectrometria de Absorção Atômica Parte 1-Fundamentos e Atomização com Chama. ESALQ: 40.

KUMAR, V.;ABBAS, A.;FAUSTO, N. **Bases Patológicas das Doenças**. 8. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LACKNER, R. "**Oxidative stress**" in fish by environmental pollutants. Birkhäuser Verlag, 2008. 203-224.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 5259, 680-685, 1970.

Lajunen, L. H. J.;Perämäki, P. (1992). Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission. Chemistry, T. R. S. o., Cambridge: 342.

LANPHEAR, B. P.;DIETRICH, K.;AUIINGER, P.;COX, C. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dL in US children and adolescents. **Public Health Rep**, 115, 6, 521-529, 2000.

LE, T. H.;LIM, E. S.;HONG, N. H.;LEE, S. K.;SHIM, Y. S.;HWANG, J. R.;KIM, Y. H.;MIN, J. Proteomic analysis in *Daphnia magna* exposed to As(III), As(V) and Cd heavy metals and their binary mixtures for screening potential biomarkers. **Chemosphere**, 93, 10, 2341-2348, 2013.

LEE, W. M. Acute liver failure in the United States. **Semin Liver Dis**, 23, 3, 217-226, 2003.

LEYVA, J. A.;BIANCHET, M. A.;AMZEL, L. M. Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F1-ATPase (Review). **Mol Membr Biol**, 20, 1, 27-33, 2003.

LIDSKY, T. I.;SCHNEIDER, J. S. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. **Brain**, 126, Pt 1, 5-19, 2003.

LIMA, P. M.;NEVES RDE, C.;DOS SANTOS, F. A.;PEREZ, C. A.;DA SILVA, M. O.;ARRUDA, M. A.;DE CASTRO, G. R.;PADILHA, P. M. Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SRXRF and FAAS after 2D-PAGE separation: Preliminary results. **Talanta**, 82, 3, 1052-1056, 2010.

LIPPMANN, M. 1989 Alice Hamilton lecture. Lead and human health: background and recent findings. **Environ Res**, 51, 1, 1-24, 1990.

LITTLE, E.;RAMAKRISHNAN, M.;ROY, B.;GAZIT, G.;LEE, A. S. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, 4, 1, 1-18, 1994.

LIU, C.;YU, K.;SHI, X.;WANG, J.;LAM, P. K.;WU, R. S.;ZHOU, B. Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquat Toxicol**, 82, 2, 135-143, 2007.

LIU, P.;XIAO, H. Y.;LI, X.;RUAN, L. F.;ZHANG, C. C. Calorimetric study of nonspecific interaction between lead ions and bovine serum albumin. **Biological Trace Element Research**, 118, 2, 97-103, 2007.

LU, T.;PAN, Y.;KAO, S. Y.;LI, C.;KOHANE, I.;CHAN, J.;YANKNER, B. A. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. **Nature**, 429, 6994, 883-891, 2004.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3ª. New York: Mac Graw Hill, 1968.

LYN, P. Lead toxicity, a review of the literature.Part I: exposure, evaluation and treatment. **Altern Med Rev**, 11, 2-22, 2006.

MAHAFFEY, K. R. Biototoxicity of lead: influence of various factors. **Fed Proc**, 42, 6, 1730-1734, 1983.

MAINENTI, H. **Correlação entre a exposição ao chumbo e a atividade enzimática ácido delta aminolevulínico desidratase (ALA-D) paratormônio(PTH) e fatores nutricionais em crianças**. Mestrado -, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca., Rio de Janeiro, 2006.

MATO, J. M.;MARTINEZ-CHANTAR, M. L.;LU, S. C. Methionine metabolism and liver disease. **Annu Rev Nutr**, 28, 273-293, 2008.

MATTOS, A.;DANTAS-CORRÊA, E. **Tratado de hepatologia**. 1ª. Rio de Janeiro: 2010.

MERZENICH, H.;HARTWIG, A.;AHRENS, W.;BEYERSMANN, D.;SCHLEPEGRELL, R.;SCHOLZE, M.;TIMM, J.;JOCKEL, K. H. Biomonitoring on carcinogenic metals and oxidative DNA damage in a cross-sectional study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 10, 5, 515-522, 2001.

MILLAN, P. P. Visualization and analysis of biological networks. **Methods Mol Biol**, 1021, 63-88, 2013.

MIN, M. Y. O.;SINGER, L. T.;KIRCHNER, H. L.;MINNES, S.;SHORT, E.;HUSSAIN, Z.;NELSON, S. Cognitive development and low-level lead exposure in poly-drug exposed children. **Neurotoxicology and Teratology**, 31, 4, 225-231, 2009.

Portaria nº24/GM, de 29 de dezembro de 1994, Norma Regulamentadora 7. Brasília, DF, 1994.

MKRTCHIAN, S.;BARYSHEV, M.;MATVIJENKO, O.;SHARIPO, A.;SANDALOVA, T.;SCHNEIDER, G.;INGELMAN-SUNDBERG, M. Oligomerization properties of ERp29, an endoplasmic reticulum stress protein. **FEBS Lett**, 431, 3, 322-326, 1998.

MONSEN, E. R. The ironies of iron. (vol 69, pg 831, 1999). **American Journal of Clinical Nutrition**, 70, 3, 425-425, 1999.

MONTEIRO, H. P.;BECHARA, E. J. H.;ABDALLA, D. S. P. Free-Radicals Involvement in Neurological Porphyrias and Lead-Poisoning. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 103, 1, 73-83, 1991.

MOORE, D. F.;SEARS, D. A. Pica, Iron-Deficiency, and the Medical History. **American Journal of Medicine**, 97, 4, 390-393, 1994.

MOREIRA, F. R.;MOREIRA, J. C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para sua saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, 9, 167-181, 2004a.

MOREIRA, F. R.;MOREIRA, J. C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos a saúde. **Quím Nova**, 27, 2, 251-260, 2004b.

MOREIRA, M. F. R.;NEVES, E. B. Uso do chumbo em urina como indicador de exposição e sua relação com chumbo no sangue. **Cad.Saúde Pública**, 24, 9, 2151-2159, 2008.

MORENO, I.;PICHARDO, S.;JOS, A.;GOMEZ-AMORES, L.;MATE, A.;VAZQUEZ, C. M.;CAMEAN, A. M. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. **Toxicol**, 45, 4, 395-402, 2005.

MORGAN, R. E.;GARAVAN, H.;SMITH, E. G.;DRISCOLL, L. L.;LEVITSKY, D. A.;STRUPP, B. J. Early lead exposure produces lasting changes in sustained attention, response initiation, and reactivity to errors. **Neurotoxicol Teratol**, 23, 6, 519-531, 2001.

MOSTAFA, G. A.;EL-SHAHAWI, H. H.;MOKHTAR, A. Blood lead levels in Egyptian children from high and low lead-polluted areas: impact on cognitive function. **Acta Neurol Scand**, 120, 1, 30-37, 2009.

MOUSA, H. M.;AL-QARAWI, A. A.;ALI, B. H.;ABDEL RAHMAN, H. A.;ELMOUGY, S. A. Effect of lead exposure on the erythrocytic antioxidant levels in goats. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med**, 49, 10, 531-534, 2002.

MUDIPALLI, A. Lead hepatotoxicity & potential health effects. **Indian J Med Res**, 126, 6, 518-527, 2007.

NAKAMURA, M. S. Intoxicação por chumbo. **Rev.Oxidologia**, 37-42, 2002.

Naqvi, S. H.;Lu, Y.;Naqvi, W.;He, R. (2011). Treatment of Bovine Serum Albumin with Heavy Metal Lead rescued the SH-SH5Y Cells from the Toxicity of Lead. Proceedings of International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB 2011).

NEBERT, D. W.;DALTON, T. P. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. **Nat Rev Cancer**, 6, 12, 947-960, 2006.

NEEDLEMAN, H. Lead poisoning. **Annu Rev Med**, 55, 209-222, 2004.

NEHRU, B.;KANWAR, S. S. N-acetylcysteine exposure on lead-induced lipid peroxidative damage and oxidative defense system in brain regions of rats. **Biological Trace Element Research**, 101, 3, 257-264, 2004.

NELSON, D. L.;COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3a ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NEUHOFF, V.;AROLD, N.;TAUBE, D.;EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, 9, 6, 255-262, 1988.

NI, Z.;HOU, S.;BARTON, C. H.;VAZIRI, N. D. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. **Kidney Int**, 66, 6, 2329-2336, 2004.

NOMA, T.;FUJISAWA, K.;YAMASHIRO, Y.;SHINOHARA, M.;NAKAZAWA, A.;GONDO, T.;ISHIHARA, T.;YOSHINOBU, K. Structure and expression of human mitochondrial adenylate kinase targeted to the mitochondrial matrix. **Biochem J**, 358, Pt 1, 225-232, 2001.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, 250, 10, 4007-4021, 1975.

OLYMPIO, K. P.;OLIVEIRA, P. V.;NAOZUKA, J.;CARDOSO, M. R.;MARQUES, A. F.;GUNTHER, W. M.;BECHARA, E. J. Surface dental enamel lead levels and antisocial behavior in Brazilian adolescents. **Neurotoxicol Teratol**, 32, 2, 273-279, 2010.

OLYMPIO, K. P. K. **Exposição a chumbo e comportamento anti-social em adolescentes**. Doutorado - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo., 2009.

OSTAPOWICZ, G.;FONTANA, R. J.;SCHIODT, F. V.;LARSON, A.;DAVERN, T. J.;HAN, S. H.;MCCASHLAND, T. M.;SHAKIL, A. O.;HAY, J. E.;HYNAN, L.;CRIPPIN, J. S.;BLEI, A. T.;SAMUEL, G.;REISCH, J.;LEE, W. M.;GROUP, U. S. A. L. F. S. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. **Ann Intern Med**, 137, 12, 947-954, 2002.

OTZEN, D. E.;BARCISZEWSKI, J.;CLARK, B. F. Dual hydrolytic role for Pb(II) ions. **Biochimie**, 76, 1, 15-21, 1994.

PAOLIELLO, M. C., A.A.M. **Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos**. 2001.

PASCAL, R.;PIRISI, L.;DAINO, L.;FRASSETTO, S.;ZANETTI, S.;LASPINA, V.;GARCEA, R.;CHIANDUSSI, L.;BARTOLI, E.;FEO, F. Role of Transmethylase Pathway in Alcoholic Liver Steatosis. **Gastroenterologie Clinique Et Biologique**, 6, 10, 823-824, 1982.

PAYTON, M.;RIGGS, K. M.;SPIRO, A., 3RD;WEISS, S. T.;HU, H. Relations of bone and blood lead to cognitive function: the VA Normative Aging Study. **Neurotoxicol Teratol**, 20, 1, 19-27, 1998.

PEIJNENBURG, W. J.;JAGER, T. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues. **Ecotoxicol Environ Saf**, 56, 1, 63-77, 2003.

PETERS, T. All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications **Academic Press**, 1996.

PIERCE, W. M.;CAI, J. Applications of mass spectrometry in proteomics. **Contrib Nephrol**, 141, 40-58, 2004.

PILLAI, P.;PATEL, R.;PANDYA, C.;GUPTA, S. Sex-specific effects of gestational and lactational coexposure to lead and cadmium on hepatic phase I and phase II xenobiotic/steroid-metabolizing enzymes and antioxidant status. **J Biochem Mol Toxicol**, 23, 6, 419-431, 2009.

PORUBLEVA, L.;VANDER VELDEN, K.;KOTHARI, S.;OLIVER, D. J.;CHITNIS, P. R. The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. **Electrophoresis**, 22, 9, 1724-1738, 2001.

RABINOWITZ, M. B. Relating tooth and blood lead levels in children. **Bull Environ Contam Toxicol**, 55, 6, 853-857, 1995.

RABINOWITZ, M. B.;WETHERILL, G. W.;KOPPLE, J. D. Kinetic-Analysis of Lead Metabolism in Healthy Humans. **Journal of Clinical Investigation**, 58, 2, 260-270, 1976.

RAND, G. W., P.G; MCCARTY, L.S. **Introduction to aquatic toxicology**. Taylor & Francis, 1995. 3-70.

REED, T.;PERLUIGI, M.;SULTANA, R.;PIERCE, W. M.;KLEIN, J. B.;TURNER, D. M.;COCCIA, R.;MARKESBERY, W. R.;BUTTERFIELD, D. A. Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, 30, 1, 107-120, 2008.

RISON, S. C.;HODGMAN, T. C.;THORNTON, J. M. Comparison of functional annotation schemes for genomes. **Funct Integ Genomics**, 1, 1, 56-69, 2000.

ROMEO, M.;BENNANI, N.;GNASSIA-BARELLI, M.;LAFURIE, M.;GIRARD, J. P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquat Toxicol**, 48, 2-3, 185-194, 2000.

ROOMI, M. W.;COLUMBANO, A.;LEDDA-COLUMBANO, G. M.;SARMA, D. S. Lead nitrate induces certain biochemical properties characteristic of hepatocyte nodules. **Carcinogenesis**, 7, 10, 1643-1646, 1986.

ROUCH, D. A.;LEE, B. T.;MORBY, A. P. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. **J Ind Microbiol**, 14, 2, 132-141, 1995.

SAHA, A.;YAKOVLEV, V. V. Structural changes of human serum albumin in response to a low concentration of heavy ions. **J Biophotonics**, 3, 10-11, 670-677, 2010.

SANCHEZ, W.;PALLUEL, O.;MEUNIER, L.;COQUERY, M.;PORCHER, J. M.;AIT-AISSA, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. **Environ Toxicol Pharmacol**, 19, 1, 177-183, 2005.

SANDHIR, R.;GILL, K. D. Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. **Biol Trace Elem Res**, 48, 1, 91-97, 1995.

SANIN, L. H.;GONZALEZ-COSSIO, T.;ROMIEU, I.;HERNANDEZ-AVILA, M. [Accumulation of lead in bone and its effects on health]. **Salud Publica Mex**, 40, 4, 359-368, 1998.

Santana, E. Q. A., S.N; Ribeiro, Y.A; Chung, M.C. (2002). Detecção de chumbo em vegetal coletado na área externa da fábrica de baterias Ajax, em Bauru/SP. Jornada Farmacêutica. Unesp-Campus de Araraquara. **CD-ROM**.

SANTOS, F. A.;LIMA, P. M.;NEVES, R. C. F.;MORAES, P. M.;PEREZ, C. A.;SILVA, M. O. A.;ARRUDA, M. A. Z.;CASTRO, G. R.;PADILHA, P. D. Metallomic study on plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: initial results. **Microchimica Acta**, 173, 1-2, 43-49, 2011.

SARYAN LA, Z. C. **Lead and its compounds**. 3^a. St Louis: Mosby-Year Book, 1994. 506-541.

SCHRAUZER, G. N. Effects of selenium antagonists on cancer susceptibility: new aspects of chronic heavy metal toxicity. **J UOEH**, 9 Suppl, 208-215, 1987.

SCHREURS, W. J.;ROSENBERG, H. Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by Escherichia coli. **J Bacteriol**, 152, 1, 7-13, 1982.

SCHULZ, G. E. Structural and functional relationships in the adenylate kinase family. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 52, 429-439, 1987.

SCHULZ, G. E.;SCHILTZ, E.;TOMASSELLI, A. G.;FRANK, R.;BRUNE, M.;WITTINGHOFER, A.;SCHIRMER, R. H. Structural relationships in the adenylate kinase family. **Eur J Biochem**, 161, 1, 127-132, 1986.

SHANNON, P.;MARKIEL, A.;OZIER, O.;BALIGA, N. S.;WANG, J. T.;RAMAGE, D.;AMIN, N.;SCHWIKOWSKI, B.;IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated

models of biomolecular interaction networks. **Genome Res**, 13, 11, 2498-2504, 2003.

SHARMA, S.;RAGHUVANSHI, S.;JASWAL, A.;SHRIVASTAVA, S.;SHUKLA, S. Lead acetate-induced hepatotoxicity in Wistar rats: possible protective role of combination therapy. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, 34, 1, 23-34, 2015.

SHNYDER, S. D.;HUBBARD, M. J. ERp29 is a ubiquitous resident of the endoplasmic reticulum with a distinct role in secretory protein production. **J Histochem Cytochem**, 50, 4, 557-566, 2002.

SILVA, F. A.;NEVES, R. C.;QUINTERO-PINTO, L. G.;PADILHA, C. C.;JORGE, S. M.;BARROS, M. M.;PEZZATO, L. E.;PADILHA, P. M. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. **Chemosphere**, 68, 8, 1542-1547, 2007.

SILVA, F. A.;PADILHA, C. C.;PEZZATO, L. E.;BARROS, M. M.;PADILHA, P. M. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. **Talanta**, 69, 4, 1025-1030, 2006.

SILVA, I. F. T. M. **Análise das diferentes classes da fosfatase ácida e estudo morfohistopatológico em órgãos de ratos intoxicados por chumbo.** Mestrado -, Universidade Estadual de Campinas., Campinas, 2000.

SINGH, S.;KHAR, A. Differential gene expression during apoptosis induced by a serum factor: role of mitochondrial F₀-F₁ ATP synthase complex. **Apoptosis**, 10, 6, 1469-1482, 2005.

SIPOS, P.;SZENTMIHÁLYI, K.;FEHÉR, E.;ABAZA, M.;SZILYÁGI, M.;BLÁZOVIC, A. Some effects of lead contamination on liver and gall bladder bile. **Acta Biol. Szeged**, 47, 1-4, 139-142, 2003.

SIQUEIRA, E.;ALMEIDA, S.;ARRUDA, S. Papel adverso do ferro no organismo. **Comun Ciênc Saúde.**, 17, 3, 229-236, 2006.

SIRICA, A. E.;NATHANSON, M. H.;GORES, G. J.;LARUSSO, N. F. Pathobiology of biliary epithelia and cholangiocarcinoma: proceedings of the Henry M. and Lillian Stratton Basic Research Single-Topic Conference. **Hepatology**, 48, 6, 2040-2046, 2008.

SKERFVING, S.;NILSSON, U.;SCHUTZ, A.;GERHARDSSON, L. Biological monitoring of inorganic lead. **Scand J Work Environ Health**, 19 Suppl 1, 59-64, 1993.

SOLLIWAY, B. M.;SCHAFFER, A.;PRATT, H.;YANNAI, S. Effects of exposure to lead on selected biochemical and haematological variables. **Pharmacol Toxicol**, 78, 1, 18-22, 1996.

SUGAWARA, E.;NAKAMURA, K.;MIYAKE, T.;FUKUMURA, A.;SEKI, Y. Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. **Br J Ind Med**, 48, 4, 239-242, 1991.

SUI, L.;ZHANG, R. H.;ZHANG, P.;YUN, K. L.;ZHANG, H. C.;LIU, L.;HU, M. X. Lead toxicity induces autophagy to protect against cell death through mTORC1 pathway in cardiofibroblasts. **Bioscience Reports**, 35, 2015.

TAJKARIMI, M.;FAGHIH, M. A.;POURSOLTANI, H.;NEJAD, A. S.;MOTALLEBI, A. A.;MAHDAVI, H. Lead residue levels in raw milk from different regions of Iran. **Food Control**, 19, 5, 495-498, 2008.

TENORIO-LARANGA, J.;MANNISTO, P. T.;KARAYIORGOU, M.;GOGOS, J. A.;GARCIA-HORSMAN, J. A. Sex-dependent compensated oxidative stress in the mouse liver upon deletion of catechol O-methyltransferase. **Biochemical Pharmacology**, 77, 9, 1541-1552, 2009.

THONGBOONKERD, V.;KLEIN, E.;KLEIN, J. B. Sample preparation for 2-D proteomic analysis. **Contrib Nephrol**, 141, 11-24, 2004.

TILTON, R. G.;HAIDACHER, S. J.;LEJEUNE, W. S.;ZHANG, X.;ZHAO, Y.;KUROSKY, A.;BRASIER, A. R.;DENNER, L. Diabetes-induced changes in the renal cortical proteome assessed with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, 7, 10, 1729-1742, 2007.

TONG, S.;VON SCHIRNDING, Y. E.;PRAPAMONTOL, T. [Environmental lead exposure: a public health problem with global dimensions]. **Servir**, 49, 1, 35-43, 2000.

TOSCANO, C. D.;GUILARTE, T. R. Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. **Brain Res Brain Res Rev**, 49, 3, 529-554, 2005.

UELAND, P. M.;REFSUM, H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. **J Lab Clin Med**, 114, 5, 473-501, 1989.

VALAVANIDIS, A.;VLAHOGIANNI, T.;DASSENAKIS, M.;SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicol Environ Saf**, 64, 2, 178-189, 2006.

VAZIRI, N. D.;KHAN, M. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 34, 9, 920-925, 2007.

VENNKATESH, T.;SHAMBHARI, T. Treating lead toxicity: Possibilities beyond synthetic chelation. **Journal of Krishna . Institute of Medical Sciences University.**, 2, 1, 1-28, 2013.

VILLEDA-HERNANDEZ, J.;BARROSO-MOGUEL, R.;MENDEZ-ARMENTA, M.;NAVA-RUIZ, C.;HUERTA-ROMERO, R.;RIOS, C. Enhanced brain regional lipid peroxidation in

developing rats exposed to low level lead acetate. **Brain Res Bull**, 55, 2, 247-251, 2001.

WAGNER, A.;DE CARVALHO, A. M.;NAKAMURA, M. U.;SIMOES, R. S.;FONTES, T. M.;ESPIRIDIAO, S.;KULAY JUNIOR, L. [Morphological and physiological analysis of livers and kidneys of pregnant rats and their fetuses treated by the association of zidovudine, lamivudine and ritonavir for the whole period of pregnancy]. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 32, 11, 556-562, 2010.

WALGREN, J. L.;MITCHELL, M. D.;THOMPSON, D. C. Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. **Crit Rev Toxicol**, 35, 4, 325-361, 2005.

WALLWORK, J. C.;DUERRE, J. A. Effect of zinc deficiency on methionine metabolism, methylation reactions and protein synthesis in isolated perfused rat liver. **J Nutr**, 115, 2, 252-262, 1985.

WANG, J.;ZHU, H.;YANG, Z.;LIU, Z. Antioxidative effects of hesperetin against lead acetate-induced oxidative stress in rats. **Indian J Pharmacol**, 45, 4, 395-398, 2013.

WANG, Q.;LUO, W.;ZHANG, W.;DAI, Z.;CHEN, Y.;CHEN, J. Iron supplementation protects against lead-induced apoptosis through MAPK pathway in weanling rat cortex. **Neurotoxicology**, 28, 4, 850-859, 2007a.

WANG, Q.;LUO, W.;ZHENG, W.;LIU, Y.;XU, H.;ZHENG, G.;DAI, Z.;ZHANG, W.;CHEN, Y.;CHEN, J. Iron supplement prevents lead-induced disruption of the blood-brain barrier during rat development. **Toxicol Appl Pharmacol**, 219, 1, 33-41, 2007.

WANG, Q.;LUO, W. J.;ZHANG, W. B.;DAI, Z. M.;CHEN, Y. M.;CHEN, J. Y. Iron supplementation protects against lead-induced apoptosis through MAPK pathway in weanling rat cortex. **Neurotoxicology**, 28, 4, 850-859, 2007b.

WARREN, M. J.;COOPER, J. B.;WOOD, S. P.;SHOOLINGIN-JORDAN, P. M. Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. **Trends Biochem Sci**, 23, 6, 217-221, 1998.

WEINSHILBOUM, R. M.;OTTERNESS, D. M.;SZUMLANSKI, C. L. Methylation pharmacogenetics: Catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 39, 19-52, 1999.

WETMORE, B. A.;MERRICK, B. A. Toxicoproteomics: proteomics applied to toxicology and pathology. **Toxicol Pathol**, 32, 6, 619-642, 2004.

WHICHER, J.;SPENCE, C. When is serum albumin worth measuring? **Ann Clin Biochem**, 24 (Pt 6), 572-580, 1987.

WHITE, R. F.;DIAMOND, R.;PROCTOR, S.;MOREY, C.;HU, H. Residual cognitive deficits 50 years after lead poisoning during childhood. **Br J Ind Med**, 50, 7, 613-622, 1993.

Environmental Health Criteria 3: Lead. United Kingdom, 1977.

WIJAYANTI, N.;KATZ, N.;IMMENSCHUH, S. Biology of heme in health and disease. **Curr Med Chem**, 11, 8, 981-986, 2004.

WILKINS, M. R.;SANCHEZ, J. C.;GOOLEY, A. A.;APPEL, R. D.;HUMPHERY-SMITH, I.;HOCHSTRASSER, D. F.;WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev**, 13, 19-50, 1996.

WILLIAMS, D. P.;KITTINGHAM, N. R.;NAISBITT, D. J.;PIRMOHAMED, M.;SMITH, D. A.;PARK, B. K. Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? **Curr Drug Metab**, 3, 4, 351-366, 2002.

WINNEKE, G.;KRAMER, U.;BROCKHAUS, A.;EWERS, U.;KUJANEK, G.;LECHNER, H.;JANKE, W. Neuropsychological studies in children with elevated tooth-lead concentrations. II. Extended study. **Int Arch Occup Environ Health**, 51, 3, 231-252, 1983.

WIWANITKIT, V.;SUWANSAKSRI, J. Lead intoxication: a summary of the clinical presentation among Thai patients. **Biometals**, 19, 4, 345-348, 2006.

WOLF, A. W.;JIMENEZ, E.;LOZOFF, B. Effects of iron therapy on infant blood lead levels. **J Pediatr**, 143, 6, 789-795, 2003.

WOO, S.;YUM, S.;PARK, H. S.;LEE, T. K.;RYU, J. C. Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, 149, 3, 289-299, 2009.

Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead. Finland: Vammala, 1995.

WRIGHT, R. O.;TSAIH, S. W.;SCHWARTZ, J.;WRIGHT, R. J.;HU, H. Association between iron deficiency and blood lead level in a longitudinal analysis of children followed in an urban primary care clinic. **J Pediatr**, 142, 1, 9-14, 2003.

YAMAMOTO, T.;KIKKAWA, R.;YAMADA, H.;HORII, I. Investigation of proteomic biomarkers in in vivo hepatotoxicity study of rat liver: toxicity differentiation in hepatotoxicants. **J Toxicol Sci**, 31, 1, 49-60, 2006.

YASUI, M.;VERITY, M. A. **Mineral and metal neurotoxicology**. CRC Press, 1996.

YONEDA, T.;SATO, M.;MAEDA, M.;TAKAGI, H. Identification of a novel adenylate kinase system in the brain: cloning of the fourth adenylate kinase. **Brain Res Mol Brain Res**, 62, 2, 187-195, 1998.

ZHANG, B.;WANG, M.;YANG, Y.;WANG, Y.;PANG, X.;SU, Y.;WANG, J.;AI, G.;ZOU, Z. ERp29 is a radiation-responsive gene in IEC-6 cell. **J Radiat Res**, 49, 6, 587-596, 2008.

ZHANG, Y.;HUANG, Y.;DENG, X.;XU, Y.;GAO, Z.;LI, H. Iron overload-induced rat liver injury: Involvement of protein tyrosine nitration and the effect of baicalin. **Eur J Pharmacol**, 680, 1-3, 95-101, 2012.

ZHOU, F.;CHEN, Y.;FAN, G.;FENG, C.;DU, G.;ZHU, G.;LI, Y.;JIAO, H.;GUAN, L.;WANG, Z. Lead-induced iron overload and attenuated effects of ferroportin 1 overexpression in PC12 cells. **Toxicol In Vitro**, 28, 8, 1339-1348, 2014.

Anexos

ANEXO A



**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 012/2011

Bauru, 28 de junho de 2011.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Análise proteômica e morfológica em fígado de ratos submetidos à exposição ao chumbo e suplementados com ferro**, de autoria de Mileni da Silva Fernandes, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão realizada no dia **21 de junho de 2011**.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pimpermaier Garlet

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Apêndice

The word 'Apêndice' is written in a large, red, cursive font with a 3D effect. Below the text, there are two horizontal lines: a thin dark brown line and a thicker light blue line.

APÊNDICE A

Valores obtidos na determinação da concentração de Pb e Fe por GFAAS e estimativa do número de átomos de Pb e Fe por molécula nos *spots* proteicos das amostras de tecido hepático dos grupos experimentais.

Spots	Mm/PI do spot (KDa)	[Pb] final mg/g	Átomos de Pb por molécula de proteína	[Fe] final mg/g	Átomos de Fe por molécula de proteína
5	64,739/4.72	GEIII: 5,00 GEV: 51,80	GEIII: 1,56 GEV: 16,19	-	-
19	64,731/7.43	GEIII: 0,92	GEIII:0,29	-	-
21	57,077/6.14	GEIII: 4,05 GEIV: 2,79	GEIII: 1,12 GEIV: 0,77	-	-
24	18,336/3.59	GEIII: 1,59 GEIV: 0,37	GEIII: 0,14 GEIV: 0,03	-	-
26	18,665/8.89	GEIII: 0,32 GEIV: 1,80 GEV: 9,87	GEIII: 0,03 GEIV: 0,16 GEV: 0,89	GEI: 95,80	GEI: 32,03
31	21,317/8.70	GEIII: 1,41 GEIV: 2,49 GEV:54,62	GEIII: 0,14 GEIV: 0,26 GEV: 5,62	GEIII: 214,4	GEIII: 81,87
32	20,935/5.62	GEIV: 1,17	GEIV: 0,12	-	-
34	24,236/6.24	GEIV: 3,07	GEIV: 0,36	-	-
38	27,207/5.90	GEII: 0,40	GEII: 0,05	-	-
39	25,572/8.62	GEIII: 2,11 GEIV: 4,49	GEIII: 0,26 GEIV: 0,55	-	-
40	25,393/5.26	GEIII: 2,25 GEIV: 4,15 GEV:10,58	GEIII: 0,28 GEIV: 0,51 GEV: 1,30	-	-
41	25,630/8.03	GEII: 0,28 GEIII: 4,23	GEII: 0,03 GEIII: 0,52	-	-
42	26,010/8.76	GEIII: 1,27 GEIV: 4,59	GEIII: 0,16 GEIV: 0,58	-	-
47	28,255/5.10	GEIII: 3,23 GEV:33,06	GEIII: 0,44 GEV: 4,51	-	-
49	29,273/4.48	GEIV: 7,91 GEV: 32,39	GEIV: 1,12 GEV: 4,58	-	-
50	26,367/5.85	GEIII:4,90	GEIII: 0,62	-	-
52	29,283/6.1	GEIV:11,41	GEIV:1,61	-	-
54	27,440/6.92	GEIII: 3,07 GEIV: 8,50 GEV: 19,4	GEIII: 0,41 GEIV: 1,13 GEV: 2.57	-	-
58	28,020/9.53	GEIV:4,61	GEIV: 0,62	-	-

		GEV: 14,74	GEV: 1,99	GEV: 7,12	GEV: 3,57
59	27,811/7.64	GEII:0,53	GEII:0,07	-	-
60	27,314/5.76	GEIII: 4,39	GEIII: 0,58	-	-
65	28,230/7.13	GEIII: 0,92 GEIV:10,36 GEV: 8,90	GEIII: 0,13 GEIV: 1,41 GEV:1,21	-	-
67	28,734/6.29	GEIII: 8,33 GEV:156,39	GEIII: 1,16 GEV: 21,6	GEV: 16,20	GEV: 8,34
74	29,781/4.29	GEIII: 4,86	GEIII: 0,70	GEI:149,8	GEI: 79,92
79	30,299/9.42	GEV: 1,19	GEV: 0,17	GC: 0,69 GEI:26,13 GEV: 8,24	GC: 0,37 GEI: 14,18 GEV: 4,47
80	30,617/6.62	GEIV: 14,52	GEIV:2,15	-	-
84	33,068/4.99	GEIII: 6,90 GEV:10,90	GEIII:1,10 GEV:1,74	GEI:33,74 GEV: 27,15	GEI:19,98 GEV:16,80
89	31,182/5.21	GEII:1,01 GEIII:9,16	GEII:0,15 GEIII:1,38	-	-
91	31,255/5.61	GEII:0,06 GEIII:4,93 GEV:10,41	GEII: 0,01 GEIII:0,74 GEV:1,57	GEI:49,09 GEV:50,30	GEI:27,48 GEV:28,16
98	32,987/5.55	GEIII:4,17 GEIV:6,11	GEIII:0,66 GEIV:0,97	GEI:29,91	GEI:17,67
99	32,866/5.81	GEV: 29,75	GEV: 4,72	GEV: 147,1	GEV:86,64
101	33,454/7.05	GEII: 0,90	GEII: 0,15	-	-
102	35,571/6.80	GEIII:15,41 GEV:39,89	GEIII:2,65 GEV:6,85	GEI:242,2 GEV: 278,9	GEI:154,3 GEV: 177,7
103	35,431/5.43	GEIII:3,13	GEIII:0,54	-	-
104	35.514/5.25	GEI:17,91 GEV:7,51	GEI: 3,07 GEV: 1,29	GEI: 318,5	GEI:202,9
107	35,598/6.62	GEIII:0,98	GEIII:0,17	-	-
108	35,655/6.55	GEI:7,94 GEIV:14,63 GEV:17,54	GEI:1,37 GEIV: 2,52 GEV:3,02	GEI:116,1 GEIV:42,08 GEV:120,5	GEI:74,16 GEIV:26,88 GEV:76,98
116	36,451/8.38	GEI:0,17	GEI: 0,03	-	-
118	36,589/5.84	GEIV:16,47 GEV: 34,03	GEIV: 2,91 GEV: 6,01	GEV:326,5	GEV: 213,9
121	37,518/8.79	GEV:25,59	GEV:4,63	GEV:80,76	GEV: 54,27
122	36,589/7.35	GEIII:2,24	GEIII:0,39	-	-
127	38,261/6.60	GEI:4,35 GEII:3,91 GEIV:30,88 GEV:33,35	GEI:0,80 GEII:0,72 GEIV:5,70 GEV:6,16	GEI:0,45 GEIV:72,3	GEI:3,06 GEIV:49,56
129	37,168/5.02	GEIII:0,51	GEIII:0,09	-	-

133	38,357/8.62	GEV:11,05	GEV:2,05	GEV:45,21	GEV:31,06
136	40,004/6.98	GEIII:2,15 GEIV:14,76	GEIII:0,42 GEIV:2,85	-	-
137	39,511/6.65	GEI:2,03	GEI:0,39	GEI:13,68	GEI:9,68
139	39,790/6.53	GEV:17,95	GEV:3,45	-	-
141	39,107/8.23	GEIII:1,70 GEIV:12,51 GEV:8,51	GEIII:0,32 GEIV:2,36 GEV:1,61	GEV:9,14	GEV:6,40
145	39,823/8.63	GEV:5,75	GEV:1,11	GEV:13,03	GEV:9,30
147	40,495/7.48	GEIII:2,29 GEIV:12,05 GEV:13,16	GEIII:0,45 GEIV:2,36 GEV:2,57	-	-
148	42,629/6.87	GEIII:3,65	GEIII:0,75	-	-
151	41,651/5.42	GEIII:2,31 GEIV:15,16	GEIII:0,46 GEIV:3,05	-	-
153	41,768/6.49	GEII:13,08 GEV:25,30	GEII:2,64 GEV:5,10	GEV:26,80	GEV:20,05
155	44,847/7.10	GEIII:2,21 GEIV:13,45	GEIII:0,48 GEIV:2,91	-	-
156	43,569/6.42	GEI:2,58 GEII:12,47	GEI:0,54 GEII:2,62	GEI:66,65	GEI:52,01
172	46,165/5.20	GEIII:0,60 GEIV:16,61 GEV:16,08	GEIII:0,13 GEIV:3,70 GEV:3,58	GEV:41,78	GEV:34,55
173	46,541/6.71	GEII:6,53	GEII:1,47	GEI:37,50	GEI:31,26
175	46,165/6.33	GEIII:7,37 GEV:44,25	GEIII:1,64 GEV:9,86	GEV:52,25	GEV:43,20
189	51,217/6.10	GEII:3,19 GEIII:1,08 GEV:32,48	GEII:0,79 GEIII:0,27 GEV:8,03	GEV:269,0	GEV:246,81
191	53,971/6.48	GEIV:25,95 GEIV:26,45	GEIV:6,76 GEV:6,89	-	-
194	57,296/5.85	GEII:0,71 GEIV:1,97 GEIV:9,10	GEII:0,20 GEIV:0,55 GEV:2,52	GEIV:57,76	GEIV:59,28
199	56,830/5.35	GEII:16,21 GEIV:11,31	GEII:4,45 GEIV:3,10	-	-
201	57,860/6.32	GEIII:5,35	GEIII:1,49	-	-
202	57,601/5.62	GEIV:6,74	GEIV:1,87	-	-
207	59,841/6.15	GEIII:0,17	GEIII:0,05	-	-
209	60,380/5.96	GEII:4,79 GEV:21,95	GEII:1,40 GEV:6,40	-	-
212	61,751/7.64	GEII:1,23 GEIV:1,86 GEV:3,08	GEII:0,37 GEIV:0,55 GEV:0,92	GEV:42,11	GEV:46,57

213	63,722/5.44	GEV:32,85	GEV:10,11	GEV:334,5	GEV:381,81
214	67,700/7.43	GEIV:0,96 GEIV:1,99	GEIV:0,31 GEV:0,65	GEV:16,63	GEV:20,17
215	63,722/5.22	GEIV:17,88	GEIV:5,50	-	-
216	63,967/7.13	GEIV:5,49	GEIV:1,69	-	-
219	63,152/6.49	GEII:12,22	GEII:3,73	-	-
220	62,792/4.53	GEIV:12,08	GEIV:3,66	-	-
223	65,294/3.59	GEV:3,84	GEV:1,21	GEV:30,34	GEV:35,49
229	68,806/6.23	GEIV:20,76	GEIV:6,89	-	-
231	68,927/5.22	GEII:1,25 GEIV:4,23 GEV:6,44	GEII:0,42 GEIV:1,41 GEV:2,14	GEV:11,79	GEV:14,56
232	69,032/5.65	GEV:4,83	GEV:1,61	GEV:34,95	GEV:43,21
235	70,727/5.51	GEV:26,04	GEV:8,89	-	-
236	71,773/7.52	GEII:1,54 GEIV:2,70	GEII:0,53 GEIV:0,94	-	-
240	70,394/7.17	GEII:8,46	GEII:2,88	-	-
245	73,974/5.22	GEIV:17,04	GEIV:6,09	-	-
251	77,745/6.80	GEIV:20,94	GEIV:7,86	-	-
252	79,865/6.51	GEIV:11,72	GEIV:4,52	-	-
263	80,723/6.31	GEIV:106,1 GEV:46,84	GEIV:41,36 GEV:18,25	GEV:135,8	GEV:194,37
266	84,286/6.21	-	-	GEV:116,8	GEV:176,47
269	85,873/5.40	GEII:25,94	GEII:10,76	-	-
271	86,746/4.83	-	-	GEV:38,64	GEV:60,04
274	88,904/5.91	-	-	GEV:764,8	GEV:1217,9
278	89,373/7.04	GEIV:27,93	GEIV:11,58	GEV:163,1	GEV:261,16
279	94,628/6.58	GEII:20,87 GEIV:28,83	GEII:9,54 GEIV:13,17	-	-
284	101,306/6.04	GEII:24,32	GEII:11,89	-	-
285	95,705/5.10	GEIV:9,04	GEIV:4,18	-	-
286	98,205/5.83	GEII:6,85 GEIV:21,13	GEII:3,25 GEIV:10,02	GEV:13,77	GEV:24,23
288	110,430/6.41	GEIV:55,66	GEIV:28,67	-	-
292	109,593/5.57	GEIV:34,91 GEV:0,18	GEIV:18,47 GEV:0,09	-	-
295	142,424/6.34	GEII:2,50	GEII:1,72	-	-
301	32,949/3.79	GEII:10,57 GEIV:42,51 GEV:8,26	GEII:1,68 GEIV:6,76 GEV:1,31	-	-
304	24,764/7.22	GEIV:13,52	GEIV:1,62	-	-
305	32,564/4.11	GEII:5,85 GEIV:20,33 GEV:4,11	GEII:0,92 GEIV:3,20 GEV:0,65	-	-
308	53,544/4.25	GEIV:67,63	GEIV:17,48	-	-

312	47,815/8.76	GEV:0,74	GEV:0,17	-	-
320	84,048/5.01	GEV:3,43	GEV:1,39	-	-
329	69,170/6.93	GEIV:51,11	GEIV:17,07	-	-
332	29,874/6.34	GEII:3,36	GEII:0,49	-	-
346	62,029/5.80	GEIV:43,07	GEIV:12,90	-	-
349	66,321/4.43	GEII:0,24	GEII:0,08	-	-
350	53,833/5.13	GEIV:18,12	GEIV:4,71	GEI:0,10	GEI:0,97
351	53,096/5.06	GEIV:14,59	GEIV:3,74	-	-
353	102,127/4.38	GEIV:14,70	GEIV:7,25	-	-
361	61,474/7.96	GEIV:8,08	GEIV:2,40	-	-
364	42,722/7.76	GEIV:17,72	GEIV:3,66	-	-
368	28,867/7.67	GEIV:16,38	GEIV:2,28	-	-
373	29,384/9.38	GEIV:41,02	GEIV:5,82	-	-
374	28,846/9.28	GEIV:25,71	GEIV:3,58	-	-
390	52,377/7.79	GEIV:1,43	GEIV:0,37	GEI:7,67	GEI:7,20
392	47,990/9.05	GEIV:5,46	GEIV:1,26	-	-
396	44,137/9.46	GEIV:5,59	GEIV:1,19	-	-
399	38,577/6.35	GEIV:13,61	GEIV:2,53	-	-
400	32,488/6.34	GEIV:66,99	GEIV:10,51	-	-
401	32,909/6.49	GEIV:29,08	GEIV:4,62	-	-
403	29,043/6.33	GEV:1,66	GEV:0,23	GEI:22,80	GEI:11,86
407	54,453/9.04	GEIV:23,72	GEIV:6,24	-	-
411	37,790/9.46	-	-	GEV:10,03	GEV:6,79
416	36,393/9.56	GEIV:38,36	GEIV:6,74	-	-
427	18,923/4.92	-	-	GEV: 58,33	GEV:19,77

