**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

FERNANDA ZUCKI

**Potencial evocado auditivo de tronco encefálico e análise
proteômica em ratos expostos a chumbo e suplementados com
ferro**

**BAURU
2013**

FERNANDA ZUCKI

**Potencial evocado auditivo de tronco encefálico e análise
proteômica em ratos expostos a chumbo e suplementados com
ferro**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia de Freitas Alvarenga

Versão Corrigida

BAURU
2013

Zucki, Fernanda
Z84p Potencial evocado auditivo de tronco encefálico e
análise proteômica em ratos expostos a chumbo e
suplementados com ferro / Fernanda Zucki. –
Bauru, 2013.

154 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia de Freitas
Alvarenga

Nota: a versão original desta tese encontra-se disponível no
Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de
Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 019/2009
Data: 06/08/2009

DEDICATÓRIA

À **Deus**, meu guia, meu pai, meu amigo, meu mestre. Eterna gratidão!

Aos meus pais, **Omar** e **Veronica Zucki**, que dedicam a mim amor incondicional. Vocês são minha luz, meu refúgio, meu exemplo, minha vida! Nenhuma conquista terá tanto valor quanto ao fato de ser sua filha.

Ao meu querido irmão, **Fabio Zucki**, companheiro, confidente, incentivador, amigo, meu apoio.

Ao anjo, enviado por Deus, **Guilherme Luiz Mathias**. Entrou na minha vida em meio à realização de um sonho e acabou realizando outro, o matrimônio. Você me torna uma pessoa melhor a cada dia. Sua bondade, amor e paciência estiveram comigo nos melhores e mais difíceis momentos. Te amo!

AGRADECIMENTOS

Ao coordenador do programa de pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti.

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro na realização desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a **Kátia de Freitas Alvarenga**, orientadora deste trabalho, por ter acolhido de modo tão carinhoso meu sonho intitulado *Doutorado*, sem ao menos conhecer a sonhadora. Por ter acreditado, desde o princípio, em mim e em minha capacidade profissional e acadêmica. Por ter segurado em minha mão e me conduzido ao longo deste caminho. A você, querida orientadora, exemplo de profissionalismo e dedicação, minha verdadeira gratidão.

À Prof^a. Dr^a. **Marilia Afonso Rabelo Buzalaf**, co-orientadora deste trabalho, por ter me apresentado um novo universo, capaz de enriquecer profundamente minha formação enquanto fonoaudióloga. Sua generosidade e carinho para comigo e para com minha pesquisa serão especialmente lembrados. A você meu profundo respeito.

À Dr^a. **Thais Catalani Morata**, minha eterna orientadora. Conhece-me como poucas pessoas, enxerga em mim o que nem todos enxergam. Com simplicidade, sabedoria e inteligência, me conquistou! Foi por teres me empurrado para fora de teu ninho, que minha vida mudou. Hoje vejo o quanto cresci, amadureci e ousei sonhar. Este antigo sonho, hoje realidade, dedico especialmente a ti.

À Prof^a. Dr^a. **Lilian Cássia Bórnia Jacob-Corteletti**, que também me acompanha desde o mestrado em Curitiba. Por teres lembrado do meu nome, em meio ao nome de tantos ex-alunos, e me indicado para a Prof^a. Kátia, te considero minha madrinha no doutorado. Teu sorriso aberto e teu abraço carinhoso cada vez que nos encontramos me enchem de energia. Obrigada madrinha!

À queridíssima amiga, **Maria Cecília de Freitas Ferreira**, exemplo de verdadeira e incondicional amizade. Sua força e sua fé me inspiraram ao longo de todo este trajeto e continuam me inspirando, mesmo que a distância física tenha temporariamente nos separado. A você meu profundo carinho.

À **Josilene Luciene Duarte**, primeira amiga conquistada, que também acolheu a mim e ao meu sonho, com tamanha bondade e respeito. Poder contar com você, me manteve firme e perseverante nesta jornada. A você primeira amiga, muito obrigada.

Às amigas **Aline de Lima Leite**, **Mileni da Silva Fernandes** e **Camila Peres Buzalaf**, que com profunda paciência e carinho receberam uma fonoaudióloga que resolveu se aventurar em outros mares. Muito obrigada pela parceria. Sem vocês, definitivamente, este trabalho não se concretizaria. MUITÍSSIMO obrigada gurias!

À minha amada família, tios, tias, primos, primas, e ao meu incrível avô **Zequinha Malheiros**, por fazerem parte da minha vida e por torná-la mais feliz!

À minha querida tia, Prof^a Dr^a. **Angela Malheiros**, que me permitiu acompanhar sua trajetória acadêmica, seu amor pela ciência e pela arte de ensinar. Fonte caseira de inspiração!

Ao Prof. Dr. **Carlos Alberto** Labate, do Departamento de Genética na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e ao Prof. Dr. **Fernando Barbosa Jr** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ambos da Universidade de São Paulo – USP, pela colaboração promovida a esta pesquisa.

A todo o Departamento de Fonoaudiologia, professores, funcionários e amigos, por terem feito parte da minha trajetória de doutorado.

Aos professores, funcionárias e queridos amigos do Laboratório de Bioquímica da FOB-USP, pelo todo o auxílio e carinho a mim dedicados.

À amiga de longa data, **Cássia Regina Caprioli**, e a sua família, por terem me acolhido como filha, por terem se tornado minha família em Bauru. O amor e a presença de vocês amenizou toda a saudade sentida...

À toda **família Mathias**, pela compreensão, carinho, respeito e amor que me oferecem desde o primeiro dia... Por serem agora minha família, obrigada!

À amiga/irmã **Samira Natascha Tschoeke Reyes**, incentivadora fiel de meus sonhos. Amizade construída no primeiro dia de graduação e que se fortalece com os anos e a distância. Obrigada por estar sempre comigo!

Às amigas **Marina Morettin, Maria Jaqueline Dias dos Santos, Camila Picini Aiello, Tatiane Totta**, quão abençoada me sinto por tê-las como amigas. Por nossa amizade ter se estendido aos nossos maridos e termos construído um grupo muito especial.

Às queridas amigas de Santa Catarina, que com seu constante apoio, incentivo, carinho e torcida, mantiveram-se presentes em meu dia a dia, mesmo diante de tamanha distância física. Vocês estarão eternamente em meu coração!

Às amigas, **Raquel, Juliana, Eliene, Luciana, Letícia, Natália**, orientadas da Prof^a. Kátia, por tantos momentos compartilhados, por tanto apoio e incentivo demonstrado. Parabéns! Conseguímos!

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

À todas as demais pessoas que ajudaram de forma direta ou indireta na concretização deste sonho.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser. Não somos o que iremos ser... Mas Graças a Deus, não somos o que éramos”.

Martin Luther King

RESUMO

A falta de consenso na literatura acerca dos efeitos tóxicos do chumbo no sistema auditivo é notória, tanto em estudos clínicos quanto experimentais. Em adição, tem sido relatado que o ferro apresenta um efeito protetor na toxicidade cerebral causada pelo chumbo. Assim, estudos clínicos e bioquímicos têm sido realizados no intuito de compreender a relação entre o chumbo e o sistema auditivo, bem como identificar possíveis substâncias protetoras para a toxicidade deste metal. Neste sentido, no presente estudo verificou-se o processo maturacional do nervo auditivo e tronco encefálico, associado à análise proteômica da porção auditiva do tronco encefálico de ratos expostos a acetato de chumbo e suplementados com sulfato ferroso. O experimento foi realizado por seis semanas com 30 ratos (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar) machos, recém-desmamados, divididos em seis grupos de cinco animais cada, sendo um controle, que recebeu água deionizada; dois grupos experimentais que receberam 100 mg/L de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ na água de beber, sendo administrado simultaneamente para um deles 20 mg/kg de FeSO_4 a cada dois dias; dois grupos que receberam a dose de 400 mg/L de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ na água de beber, onde para um deles foi administrado simultaneamente 20 mg/kg de FeSO_4 a cada dois dias e um grupo experimental que recebeu água deionizada e uma solução de 20 mg/kg de FeSO_4 a cada dois dias. O processo maturacional do sistema auditivo foi verificado por meio da análise do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) em dois momentos distintos, antes e depois da exposição ao chumbo. Os animais foram então sacrificados, coletado sangue e removido o tronco encefálico. A concentração de chumbo no sangue e tronco encefálico, apresentou um efeito dose-resposta, confirmado pela alta correlação entre a concentração nos dois compartimentos ($r^2=0,905$, $p<0,0001$), tendo o sulfato ferroso reduzido a concentração de chumbo no sangue e no tecido, embora a diferença só tenha sido significativa para o sangue (grupo que recebeu 100 mg/L de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$). Com relação ao PEATE observou-se diferença estatisticamente significativa para o interpico I-II ($p=0,049$) nos grupos experimentais 100 mg/L $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ e 400 mg/L $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ e interpico I-IV, quando comparados os grupos 100 mg/L $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ e 100 mg/L $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{FeSO}_4$ ($p=0,033$). A análise proteômica apontou uma diminuição considerável no número de *spots* proteicos detectados em todos os grupos experimentais em relação ao controle, bem como uma redução na expressão do padrão proteico. Assim, o presente estudo reforça a hipótese do papel deletério do chumbo nas dosagens de 100 e 400 mg/L de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ na maturação do nervo auditivo e região do núcleo coclear, com possível efeito protetor do ferro. A análise proteômica do tronco encefálico de ratos demonstrou que o acetato de chumbo altera a expressão proteica desta estrutura, contudo o efeito protetor do sulfato ferroso não foi confirmado nas proteínas identificadas.

Palavras-chave: Intoxicação por chumbo. Sulfato ferroso. Audição. Potenciais Evocados. Tronco encefálico. Proteoma.

ABSTRACT

Brainstem auditory-evoked potential and proteomic analysis in rats exposed to lead and supplemented with iron

There is a lack of consensus in the literature about the toxic effects of lead in the auditory system, both in clinical and experimental studies. In addition to that, it has been reported that iron has a protective effect on brain toxicity caused by lead. Therefore, clinical and biochemical studies have been carried out to understand the relationship between Pb and the auditory function, as well as if the ferrous sulfate as an otoprotectant. In this study the maturational process of the auditory nerve and brainstem and the proteomic profile of the auditory portion of the brainstem of rats exposed to lead and supplemented with iron were evaluated. The experiment was carried out for six weeks with 30 weaning rats (*Rattus norvegicus*, Wistar), divided into six groups of five animals each: a control group that received deionized water; two experimental groups receiving 100 mg/L $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ in drinking water, being given 20 mg/kg FeSO_4 simultaneously to one of them every two days; two groups received 400 mg/L $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ in drinking water, where to one of them was given 20 mg/kg FeSO_4 simultaneously every two days; and an experimental group that received deionized water and a solution of 20 mg/kg FeSO_4 every two days. The maturational process of the auditory system was verified by analyzing the Brainstem Auditory-Evoked Potential (BAEP) at two different times, before and after lead exposure. The animals were sacrificed, their blood collected and brainstem removed. The concentration of lead in blood and brain stem showed a dose-response, confirmed by correlation between the concentration in the two compartments ($r^2 = 0.905$, $p < 0.0001$). Ferrous sulfate reduced the levels of lead in blood and tissue, although the difference was only significant for blood (group receiving 100 mg/L $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$). Concerning to BEAP we observed a statistically significant difference for the interpeak I-II ($p = 0.049$) in the experimental groups 100 and 400 mg/L $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ and for the interpeak I-IV, when groups 100 and 100 mg/L $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{FeSO}_4$ were compared ($p = 0.033$). The proteomic analysis showed a considerable decrease in the number of protein spots detected in all experimental groups compared to control, as well as a reduction in the expression pattern of the proteins. Thus, the present study reinforces the hypothesis of deleterious role of Pb in dosages of 100 and 400 mg/L $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ in the maturation of the auditory nerve and cochlear nucleus region, with a possible protective effect of ferrous sulfate. The proteomic analysis of the brainstem of rats showed that lead acetate alters protein expression of this structure. However, the protective effect of ferrous sulfate was not confirmed for the identified proteins.

Key words: Lead Poisoning. Ferrous Sulfate. Hearing. Evoked Potentials. Brain stem. Proteome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Registro dos Potenciais evocados auditivos do nervo coclear e de tronco encefálico, com os respectivos sítios de origem.....	36
Figura 2.	Etapas envolvidas no processo de separação de proteínas por eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão, proteínas de uma amostra são separadas de acordo com o seu PI. Após o processo de focalização, as mesmas são transferidas para um gel de poliacrilamida, onde são separadas de acordo com sua massa molecular relativa (segunda dimensão)	49
Figura 3.	<i>Ettan IPGphor 3</i> e o <i>Ettan IPGphor Manifold</i> (GE Healthcare) onde foi realizada a focalização isoeletrica.....	70
Figura 4.	Segunda dimensão em géis SDS-PAGE 12,5% (200 mm X 255 mm X 1,5 mm), no sistema Ettan DALTsix (GE Healthcare, Uppsala, Suécia)	71
Figura 5.	Recorte dos spots selecionados para espectrometria de massa. Os <i>spots</i> provenientes das triplicatas dos géis de cada grupo foram inicialmente captados com uma ponteira plástica. Depois, cortados em fragmentos de cerca 1 mm ³ com lâmina de bisturi	73
Figura 6.	Registro do PEATE de um animal do grupo Experimental 1, obtido nos momentos pré e pós-intoxicação, onde podem ser observadas as ondas I, II, III e IV.....	82
Figura 7.	Triplicata representativa dos géis bidimensionais de proteínas de tronco encefálico de ratos dos grupos controle e experimentais	86
Figura 8.	Número total de <i>spots</i> proteicos detectados por grupo, com base na análise das triplicatas dos géis realizada por meio do programa <i>Image Master 2D Platinum 7.0</i> (GE Healthcare).	87
Figura 9.	Gráfico obtido a partir do MASCOT para o <i>spot</i> Controle 139. As barras presentes na área sombreada em verde não foram considerados <i>matches</i> significativos, uma vez que estão abaixo do valor limite. Porém, outro <i>match</i> foi considerado significativo e provavelmente apresenta coincidência com alguma proteína	89

Figura 10.	Imagem referente aos 17 <i>spots</i> identificados com base na comparação entre os grupos Controle x Experimental 1, onde a imagem superior representa o grupo controle e a inferior o grupo experimental.....	90
Figura 11.	Imagem referente ao <i>spot</i> identificado com base na comparação entre os grupos Controle x Experimental 2, onde a imagem superior representa o grupo controle e a inferior o grupo experimental.....	93
Figura 12.	Imagem referente aos 5 <i>spots</i> identificados com base na comparação entre os grupos Controle x Experimental 3, onde a imagem superior representa o grupo controle e a inferior o grupo experimental.....	94
Figura 13.	Imagem referente ao <i>spot</i> identificado com base na comparação entre os grupos Controle x Experimental 5, onde a imagem superior representa o grupo controle e a inferior o grupo experimental.....	96
Figura 14.	Imagem referente ao <i>spot</i> exclusivo do grupo Experimental 1	97
Figura 15.	Gráfico de distribuição funcional das proteínas identificadas no tronco encefálico de ratos, de acordo com Rison, Hodgman e Thornton (2000).	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Porcentagem da manifestação pós-natal, em ratos, das ondas I, II, III, IV e V em dias, utilizando três frequências de teste em 95 dBNPS	40
Quadro 2.	<i>Spots</i> do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Controle e Experimental 1. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i>	139
Quadro 3.	<i>Spots</i> do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Controle e Experimental 2. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i>	141
Quadro 4.	<i>Spots</i> do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Controle e Experimental 3. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i>	142
Quadro 5.	<i>Spots</i> do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Controle e Experimental 4. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i>	143
Quadro 6.	<i>Spots</i> do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Controle e Experimental 5. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i>	144
Quadro 7.	<i>Spots</i> do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Experimental 1 e 2. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i>	145
Quadro 8.	<i>Spots</i> do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Experimental 1 e 3. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i>	147
Quadro 9.	<i>Spots</i> do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Experimental 1 e 4. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i>	150

Quadro 10. <i>Spots</i> do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Experimental 3 e 4. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i>	152
Quadro 11. <i>Spots</i> do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Experimental 5 e 2. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i>	152
Quadro 12. <i>Spots</i> do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Experimental 5 e 4. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada <i>spot</i>	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dosagem de proteínas do homogenato de tronco encefálico e volume de amostra utilizado para obtenção do pool	69
Tabela 2.	Consumo médio ($\pm$ DP) diário de água dos animais dos grupos controle e experimentais	79
Tabela 3.	Peso médio ($\pm$ DP) inicial e final dos animais dos grupos controle e experimentais	80
Tabela 4.	Concentração média ($\pm$ DP) de chumbo no sangue e tronco encefálico dos animais dos grupos controle e experimentais.....	81
Tabela 5.	Média e desvio padrão das Latências absolutas (ms) das ondas I, II, III e IV, nos momentos pré e pós-intoxicação por chumbo, para os grupos controle e experimentais.....	83
Tabela 6.	Média e desvio padrão dos Intervalos interpicos I-II, II-III, III-IV e I-IV, nos momentos pré e pós-intoxicação por chumbo, para os grupos controle e experimentais.....	84
Tabela 7.	Efeito tempo, interação e grupo das latências absolutas das ondas e dos valores de intervalos interpicos do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico	85
Tabela 8.	Perfil quantitativo dos <i>spots</i> proteicos detectados no tronco encefálico, estabelecido a partir da análise comparativa entre os grupos.....	88
Tabela 9.	Proteínas identificadas no tronco encefálico de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental 1	91
Tabela 10.	Proteínas identificadas no tronco encefálico de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental 3	95

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
°C	Graus centígrados
µg	Micrograma
µL	Microlitro
2DE	Two dimensional electrophoresis (Eletroforese bidimensional)
AAS	Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de Absorção Atômica)
ABTS	Ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACCLPP	Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention (Comitê Consultivo sobre Prevenção do Envenenamento por Chumbo em Crianças)
ACN	Acetonitrila
AMBIC	Bicarbonato de amônio
ATF2	Pro-survival activating transcription factor 2
ANOVA	Análise de Variância para Comparações Paramétricas
BSA	Albumina de soro bovino
Ca ⁺²	Íon Cálcio
CAT	Catalase
CDC	Center for Disease Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CHAPS	3-(cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propane sulfonate
CI	Colículo Inferior
COS	Complexo Olivar Superior
cm	Centímetro
dB	Decibel
dBNA	Decibel nível de audição
dBNPS	Decibel nível de pressão sonora
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dP	Desvio padrão

dpi	Dots per inch (pontos por polegada)
DTT	Ditiotreitol
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EEG	Eletroencefalograma
EOEPD	Emissões Otoacústicas Evocadas Produto de Distorção
EQAS	Esquema de análise de qualidade externa
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe ⁺²	Íon Ferro
FeSO ₄	Sulfato ferroso
g	Grama
<i>g</i>	Giro
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
h	Hora
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HL	Hidroperóxido de lipídio
HNO ₃	Ácido Nítrico
(H ₂ PO ₃) ⁻	Anion Dihidrogenio Fosfito
Hz	Hertz
IAA	Iodoacetamida
IEF	Isoelectric Focusing (Focalização Isoelétrica)
INSP	Instituto Nacional de Saúde Pública de Quebec, Canadá
iTRAQ	Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (Marcador isobárico para a quantificação relativa e absoluta)
IPG	Immobilized pH gradient (Gradiente de pH Imobilizado)
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kg	Quilograma
KW	Análise de variância Kruskal-Wallis
kDa	kiloDalton
kHz	kiloHertz
kΩ	kiloOhm

L	Litro
M	Molar
M1	Mastóide esquerda
M2	Mastóide direita
mA	Miliamper
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mg ⁺²	Íon Magnésio
MEK/ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
MS	Mass spectrometry (Espectrometria de Massa)
mPTP	Poros de transição da permeabilidade mitocondrial
m/z	Razão massa/carga
mΩ	Milli-ohm
n	Número
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
NR7	Norma Regulamentadora 7
nm	Nanômetro
NYSDOH	New York State Department of Health (Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque)
P300	Potencial Evocado Auditivo Cognitivo P300
p	Nível de significância
Pb	Íon chumbo
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	Acetato de chumbo

PEA	Potencial Evocado Auditivo
PEATE	Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
pH	Potencial de hidrogênio
pI	Ponto isoelétrico
PMF	Peptide-mass finger printing (impressão digital das massas de peptídeo)
QI	Quociente intelectual
REDOX	Reações de oxidação de redução
rpm	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
r ²	Coeficiente de Correlação
SAT	Substâncias antioxidantes totais
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dedocil sulfato de sódio)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dedocil sulfato de sódio)
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
STMN1	Proteína Stathmin
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TFA	Ácido trifluoroacético
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio
TUNEL	Terminal transferase-mediated dUTP nick end labeling
U	Unidades
V	Volts
VDAC	Voltage-dependent anion channel
v/v	Fração volumétrica
--NH ₂	Grupamento amino
--SH	Grupamento sulfidrila
--OH	Grupamento hidroxila
Zn ⁺²	Íon Zinco
W	Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	CHUMBO	25
2.1.1	Exposição e Contaminação	25
2.1.2	Absorção e Eliminação	26
2.1.3	Toxicidade do Chumbo	28
2.2	FERRO	29
2.3	INTERAÇÕES ENTRE CHUMBO E FERRO.....	31
2.4	POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO.....	35
2.4.1	Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico	36
2.4.2	Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico em ratos	37
2.4.3	Processo Maturacional das vias auditivas	38
2.5	CHUMBO E SISTEMA AUDITIVO	40
2.6	PROTEOMA	47
2.6.1	Eletroforese Bidimensional (2DE)	49
2.6.1.1	Focalização Isoelétrica (IEF).....	50
2.6.1.2	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	51
2.6.1.3	Deteção das proteínas em gel	51
2.6.2	Espectrometria de massas (Mass Spectrometry – MS)	52
2.7	PROTEÔMICA E AUDIÇÃO	52
3	PROPOSIÇÃO.....	57
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.1	OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS	63
4.2	POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DE TRONCO ENCEFÁLICO.....	64
4.2.1	Preparo do animal.....	64
4.2.2	Registro dos Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico	65
4.3	COLETA DAS AMOSTRAS	66
4.4	ANÁLISES DE CHUMBO NO SANGUE TOTAL E TRONCO ENCEFÁLICO	66

4.5	ANÁLISE PROTEÔMICA.....	67
4.5.1	Preparo da amostra	67
4.5.2	Eletroforese bi-dimensional.....	69
4.5.2.1	<i>Primeira Dimensão - Focalização Isoelétrica</i>	69
4.5.2.2	<i>Segunda Dimensão - SDS-PAGE</i>	70
4.5.3	Visualização e análise de imagens da eletroforese bi- dimensional	71
4.5.4	Preparo das amostras para a espectrometria de massas.....	72
4.5.5	Sequenciamento das proteínas	74
4.5.6	Análise das sequências peptídicas	75
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	76
5	RESULTADOS	77
5.1	CONSUMO DE ÁGUA	79
5.2	MASSA CORPORAL	79
5.3	ANÁLISE DE CHUMBO NO SANGUE TOTAL E TRONCO ENCEFÁLICO.....	80
5.4	ANÁLISE DAS ONDAS I, II, III E IV DO PEATE	81
5.5	ANÁLISE DAS IMAGENS	86
5.6	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS	87
5.7	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	89
5.8	CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	98
5.8.1	Proteínas relacionadas aos Processos Celulares.....	98
5.8.2	Proteínas relacionadas ao Metabolismo	99
5.8.3	Proteínas relacionadas ao Transporte	99
5.8.4	Proteínas relacionadas a Vias de Informação.....	100
5.8.5	Proteínas relacionadas a Estrutura e Organização da Estrutura.....	100
6	DISCUSSÃO	101
7	CONCLUSÃO	115
	REFERÊNCIAS	119
	ANEXOS	135

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O chumbo, um dos metais mais comuns do ambiente, é um conhecido agente tóxico, sua vasta gama de efeitos, associada aos milhões de pessoas afetadas em todo o mundo, transformam-no em um problema de saúde pública (OLYMPPIO et al., 2009). Apesar de nos países desenvolvidos a conscientização acerca dos efeitos do chumbo no ambiente e na saúde humana ter resultado em esforços para restringir o seu uso, a emissão do mesmo na atmosfera em uma escala global ainda é alta (BARANOWSKA-BOSIACKA et al., 2012).

Por esta razão, a comunidade científica nacional e internacional tem buscado estudar as manifestações bioquímicas e clínicas que a exposição ao chumbo é capaz de ocasionar no homem.

Neste sentido, há mais de dez anos, o Departamento de Fonoaudiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru e o Centro de Pesquisas Audiológicas do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, ambos da Universidade de São Paulo, criaram uma linha de pesquisa, com participação de médico do trabalho e fonoaudiólogos, cujo principal objetivo era o de investigar os efeitos do chumbo no sistema auditivo.

Naquele momento, iniciaram-se as pesquisas envolvendo trabalhadores expostos simultaneamente a chumbo e ruído (JACOB, 2000; MARTINS, 2002). Apesar das evidências dos efeitos do chumbo no sistema auditivo, a exposição concomitante a outros agentes tóxicos no ambiente de trabalho, dificultava a análise dos resultados pelos pesquisadores, pois havia o questionamento se os mesmos eram consequência dos efeitos isolados do chumbo ou havia uma ação conjunta na exposição.

No ano de 2002, ocorreu no município de Bauru um acidente ecológico envolvendo uma fábrica de acumuladores elétricos, expondo aos riscos do chumbo não só os trabalhadores, mas uma extensa área vizinha à fábrica. Inúmeras ações e novas pesquisas começaram a ser desenvolvidas a partir daquele momento com a população infantil contaminada, com a perspectiva de se conseguir analisar de forma isolada o chumbo como agente tóxico para a função auditiva.

Os primeiros resultados não apontaram evidências do efeito tóxico do metal no sistema auditivo, em nível de cóclea, nervo auditivo e tronco encefálico (ALVARENGA, 2005b; ALVARENGA et al., 2012). Na análise do processamento auditivo em crianças, métodos comportamentais não demonstraram correlação entre a concentração de chumbo no sangue e o desempenho nas habilidades do processamento auditivo, apesar das crianças contaminadas terem apresentado desempenho inferior nestas habilidades (MORAES et al., 2012). Por outro lado, na pesquisa dos potenciais evocados auditivos cognitivos P300, constatou-se correlação significativa da Plumbemia média e a latência do componente N2, atividade elétrica relacionada com a habilidade de atenção auditiva (ALVARENGA et al., 2013). Nestes resultados, os questionamentos voltaram-se para o aspecto social, pois se tratava de uma população com baixo nível sócio-econômico-cultural, e sabe-se que a estimulação do meio interfere no desenvolvimento das habilidades auditivas.

Diante disso, voltou-se o interesse para estudos experimentais, que permitem controlar variáveis como a concentração de chumbo, tempo de exposição, ausência de outros agentes nocivos concomitantes e consequentemente realizar uma análise mais focada no chumbo como metal tóxico ao sistema auditivo.

Assim, em 2008 iniciou-se a parceria entre o Departamento de Fonoaudiologia e o Laboratório de Bioquímica, ambos da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP, que permitiu a realização de estudos experimentais que englobassem ensaios clínicos e bioquímicos na busca pelo entendimento da relação estabelecida entre o chumbo e o sistema auditivo, bem como, o possível efeito protetor do ferro descrito em estudos anteriores.

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi verificar o processo maturacional do nervo auditivo e tronco encefálico, associado à análise proteômica da porção auditiva do tronco encefálico de ratos expostos a acetato de chumbo e suplementados com sulfato ferroso.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CHUMBO

2.1.1 Exposição e Contaminação

O chumbo é um dos primeiros metais utilizados pelo homem, e sua incorporação no meio ocupacional passou a ocorrer de forma mais efetiva com o fortalecimento dos processos industriais do ramo petrolífero, de tintas, corantes, gráfico e bélico (SILVA, 2000). Apesar de todo o avanço tecnológico e modernização alcançadas pelas indústrias, a exposição ocupacional continua sendo até hoje o principal meio de contaminação por chumbo em adultos.

Visando o estabelecimento de parâmetros para exposição ao chumbo, foram normatizados, na década de 80, três níveis de exposição, baseados na concentração do metal em sangue: (1) exposição baixa - entre 10 e 20 µg/dL, (2) exposição moderada - entre 21 e 60 µg/dL, (3) exposição elevada - acima de 61 µg/dL (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY REPORT, 1988).

No Brasil, permanece vigente a legislação de 1994, que estabelece como valor de referência de normalidade a concentração de chumbo no sangue igual ou superior a 40 µg/dL até o limite de tolerância biológica permitido, de 60 µg/dL (BRASIL, 1994).

Atento aos impactos da exposição ocupacional e ambiental do chumbo, o *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), propondo com isso, a troca do limiar de intervenção, na época, de 25 µg/dL para 10 µg/dL (CDC, 1991).

Contudo, pesquisas vêm apontando que concentrações de chumbo no sangue entre 10 e 20 µg/dL não são consideradas seguras, pois foi demonstrada a possibilidade da ocorrência de distúrbio no sistema nervoso central, de modo especial em crianças, alterando as habilidades de raciocínio, concentração e aprendizagem, déficits na atenção e vigília, prejuízos cognitivos, alterações na função psicomotora, memória de curto prazo, habilidades visoespaciais e disfunção

de linguagem, além de dores de cabeça, convulsões, diminuição de QI, perda de audição, comportamento agressivo, retardamento mental (BELLINGER, 2008; MOSTAFA; SHAHAWI; MOKHTAR, 2009; MIN et al., 2009). Recentemente, distúrbios de cognição, quociente de inteligência (QI), atenção e comportamento foram encontrados em crianças com concentração de chumbo no sangue entre 3 a 5 µg/dL (LANPHEAR et al., 2000; CANFIELD; HENDERSON; CORY-SLECHTA, 2003; CHIODO; JACOBSON; JACOBSON, 2004; CHIODO et al., 2007).

Já as pesquisas voltadas para o público adulto têm demonstrado que o chumbo pode ser responsável por deficiências neurológicas, como por exemplo, diminuição das funções cognitivas (MENDOLA et al., 2002), doenças neurodegenerativas, acelerando ou aumentando o desenvolvimento das mesmas (HARAGUCHI et al., 2001; BASHA; REDDY, 2010), além de apontarem para correlação positiva entre o aumento da concentração de chumbo no cérebro e a incidência de doença de Parkinson (COON et al., 2006) e para certa influência do chumbo sobre a etiologia da Esclerose Lateral Amiotrófica (KAMEL et al., 2005; FANG et al., 2010).

Recentemente, o relatório do Comitê Consultivo sobre Prevenção do Envenenamento por Chumbo em Crianças (*Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention - ACCLPP*) recomendou que o uso da expressão "nível de preocupação para chumbo no sangue" (*blood lead level of concern*) fosse eliminado. Esta recomendação baseia-se na evidência de que efeitos deletérios à saúde das crianças ocorrem com concentrações de chumbo no sangue abaixo de 10 µg/dL. A recomendação atual é que se adote um valor de referência baseado no 97,5º percentil da distribuição dos níveis sanguíneos de chumbo 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).

2.1.2 Absorção e Eliminação

No organismo humano, o chumbo não é metabolizado, e sim, complexado por macromoléculas, levando a processos de absorção, distribuição e eliminação (MOREIRA; MOREIRA, 2004a). Tais processos atuam diretamente no comportamento toxicocinético do chumbo no organismo humano (SMITH; OSTERLOH; FLEGAL, 1996).

As principais vias de intoxicação para os compostos inorgânicos de chumbo são as vias respiratória (pela inalação) e a digestiva (pela ingestão) e para os compostos orgânicos a cutânea (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999; MOREIRA; MOREIRA, 2004a). Acredita-se que a via respiratória absorva cerca de 30 a 50% dos compostos de chumbo e a via digestiva 10 a 15%, podendo estes valores variar entre adultos, crianças, gestantes e indivíduos em jejum alimentar.

A retenção do chumbo nos tecidos moles se estabiliza na vida adulta, podendo até decrescer em alguns órgãos com o avanço da idade. O acúmulo, porém, permanece ocorrendo nos ossos durante toda a vida, já que os mesmos armazenam cerca de 95% do conteúdo corpóreo total dos compostos de chumbo em adultos (SANIN et al., 1998). O tempo de permanência do chumbo no organismo é consideravelmente variado, sendo estimado em 36 dias para o sangue, 40 dias para os tecidos moles e até 27 anos para os ossos (TSALEV; ZAPRIANOV, 1985; MOREIRA; MOREIRA, 2004b; MOREIRA; NEVES, 2008).

O processo de absorção do chumbo pelo organismo está relacionado a fatores como concentração do metal, tempo de exposição, propriedades físico-químicas do composto, idade, estado fisiológico do indivíduo e níveis de cálcio, magnésio, ferro, fósforo e vitamina D presentes na dieta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1977; 1995; SILVA, 2000). Existe relação direta entre a absorção do chumbo pela via digestiva e a dieta do indivíduo, onde deficiências de cálcio, ferro, fósforo e proteínas aumentam a absorção do chumbo pela via digestiva, assim como, a acidez estomacal. Pela via cutânea, apenas as formas orgânicas do metal podem ser absorvidas (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999; MOREIRA; MOREIRA, 2004a).

Independentemente da via de contaminação, o chumbo, ao atingir a corrente sanguínea, passa a acumular-se em inúmeros órgãos e sistemas, sendo os sistemas hematológico, nervoso, renal, gastrintestinal e reprodutor os que sofrem as principais ações deletérias (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999). O processo de intoxicação, porém, se dá de forma lenta e cumulativa, sendo o quadro denominado Saturnismo ou Plumbismo (SILVA, 2000).

Com relação à excreção, o chumbo pode ser eliminado tanto pelas vias primárias (urinária e digestiva) quanto pelas secundárias (bile, suor, cabelo, unha, leite materno) (MOREIRA; MOREIRA, 2004a). A quantidade excretada, contudo,

sofre interferência de variáveis como idade, características da exposição e espécie (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995). As crianças, aparentemente, apresentam uma menor taxa total de excreção em comparação com o adulto, chegando a reter até os dois anos de idade 34% da quantidade total de chumbo absorvido, contra apenas 1% nos adultos (SKERFVING, 1993; AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999).

2.1.3 Toxicidade do chumbo

Como abordado anteriormente, a exposição ao chumbo pode comprometer diferentes sistemas. No que se refere ao sistema nervoso, tanto a porção periférica quanto a porção central podem ser afetadas, contudo, as pesquisas apontam uma maior sensibilidade para alterações no sistema nervoso central, especialmente em crianças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995; TOSCANO; GUILARTE, 2005).

Os mecanismos de toxicidade propostos para o chumbo envolvem processos bioquímicos fundamentais, que incluem a habilidade do metal de inibir a ação do cálcio e de interagir com proteínas. Esta toxicidade resulta principalmente da interferência do chumbo no funcionamento das membranas celulares e enzimas, que formam complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (grupamentos $-SH$, $-H_2PO_3$, $-NH_2$, $-OH$), que atuam como doadores de elétrons (SARYAN; ZENZ, 1994; MOREIRA; MOREIRA, 2004b).

No que diz respeito à fisiologia celular, a toxicidade do chumbo pode ser entendida pelo dano causado na habilidade da célula de substituir distintos cátions divalentes (Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2}) em seus sítios de ligação (GODWIN, 2001), promovendo alterações em diferentes processos biológicos considerados relevantes, como o metabolismo energético, apoptose, maturação proteica e regulação genética. Tais alterações podem ser explicadas, em parte, pelas disfunções mitocondriais causadas pelo chumbo, 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; WILSON, 1999; LIDSKY; SCHNEIDER, 2003).

Outro aspecto que merece ser destacado com relação à toxicidade do chumbo é o estresse oxidativo causado pelo acúmulo de radicais livres (LIDSKY; SCHNEIDER, 2003; FERREIRA, 2012), que estão relacionados a inúmeros

processos normais e patológicos (BECHARA, 1996). O acúmulo destes radicais pode acarretar em danos à estrutura das biomoléculas de DNA, carboidratos, lipídios e proteínas, além de outros componentes celulares (MONTEIRO; BECHARA; ABDALLA, 1991), levando a disfunções e morte celular, especialmente para as células neuronais, consideradas altamente sensíveis a esses radicais livres (DEMASI et al., 1997; KIM et al., 2003; ADHIKARI et al., 2006).

Com relação ao estresse oxidativo causado pelo chumbo, Ferreira (2012) analisou os marcadores de estresse oxidativo no cérebro de 36 ratos machos, tratados por seis semanas com 100 e 400 mg/L de acetato de chumbo associado a suplementação com 20 mg/kg de sulfato ferroso. O cérebro dos animais foi coletado para a análise da atividade enzimática de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), além da concentração de glutathione reduzida (GSH), lipoperoxidação (TBARS), hidroperóxido de lipídio (HL) e das substâncias antioxidantes totais (SAT) (técnicas ABTS e DPPH^{*}). A atividade das enzimas GPx e SOD nos grupos experimentais diminuiu em relação ao controle, assim como ocorreu com a concentração de GSH ($p < 0,05$). Quanto às análises de HL e CAT, a primeira apresentou tendência de aumento na concentração dos grupos experimentais sem exposição concomitante, já a segunda demonstrou discreta inclinação de aumento na atividade em relação ao controle ($p > 0,05$). A dosagem de SAT-ABTS mostrou aumento nos grupos expostos com 400 mg/L de acetato de chumbo. Em relação à SAT-DPPH^{*} houve diminuição nos grupos experimentais ($p < 0,05$). De acordo com os resultados, as enzimas SOD e GPX e a GSH são afetadas pelo acetato de chumbo e a suplementação com sulfato ferroso altera essa dinâmica. No entanto, estudos posteriores são necessários para verificar se o sulfato ferroso funcionaria como protetor ao efeito tóxico do acetato de chumbo.

2.2 FERRO

O ferro é um mineral vital para a homeostase celular. É essencial para o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA, metabolismo energético (GROTTO, 2008), reações de oxidação de redução (REDOX) na cadeia de transporte de elétrons, além de fazer parte da estrutura molecular de proteínas e enzimas e ser utilizado em diversas funções neuronais, como síntese de neurotransmissor e

mielinização dos axônios (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006; LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009; MILLS et al., 2010). É, portanto, um elemento essencial para as transformações de energia que ocorrem nos sistemas biológicos, indispensáveis para a vida (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006).

Por apresentar uma característica química versátil, o ferro, 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 ferro no organismo são responsáveis por um amplo espectro de doenças, variando desde a anemia até a hemocromatose (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006). Um indivíduo adulto comporta em seu organismo de quatro a cinco gramas de ferro (FAIRBANKS; BEUTLER, 2001), contendo uma dieta normal de 13 a 18 mg de ferro, dos quais somente um a dois mg são absorvidos na forma inorgânica ou heme (GROTTO, 2008).

Embora seja um dos minerais mais abundantes da crosta terrestre, a deficiência de ferro é um dos problemas nutricionais mais comuns, independente do grau de desenvolvimento das nações (MONSEN, 1999).

Apesar da anemia ser considerada a manifestação mais importante, a deficiência de ferro é capaz de acarretar consequências adversas para todo o organismo, como o comprometimento do desenvolvimento físico e cognitivo das crianças, o aumento da morbimortalidade materna e infantil, a redução da capacidade de trabalho do indivíduo e sua resistência imunológica, todos os fatores tidos como determinantes tanto para o empobrecimento quanto para a redução da qualidade de vida (BEARD; CONNOR, 2003; BOVELL-BENJAMIN; GINARD, 2003).

Em contra partida, o acúmulo ou excesso de ferro no organismo, da mesma forma, torna-se extremamente nocivo para os tecidos, uma vez que o ferro livre promove a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são tóxicas e lesam proteínas, lipídeos e DNA. Portanto, é necessário que haja um perfeito equilíbrio no metabolismo do ferro, possibilitando a manutenção das funções celulares essenciais e ao mesmo tempo evitando possíveis danos teciduais (GROTTO, 2008).

Dentro da homeostase do ferro, os mecanismos de excreção são menos desenvolvidos e eficazes do que os que regulam a absorção e distribuição, estando envolvidas nestes processos inúmeras células, hormônios e proteínas transportadoras do ferro (BEAUMONT; VAILONT, 2006; DONOVAN; ROY; ANDREWS, 2006).

2.3 INTERAÇÕES ENTRE CHUMBO E FERRO

Pesquisas desenvolvidas ao longo dos anos têm demonstrado haver uma íntima relação entre exposição ao chumbo e o metabolismo do ferro em sistemas biológicos, onde a deficiência de ferro pode levar a um aumento da absorção do chumbo (WRIGHT et al., 1999; BRADMAN et al., 2001), da mesma forma que a suplementação com ferro pode reduzir a absorção de chumbo pelo intestino (HAMMAD; SEXTON; LANGENBERG, 1996; CHOI; KIM, 2003; KIM et al., 2003).

De acordo com Wang et al. (2007) o chumbo é capaz de romper a homeostasia celular do ferro, podendo contribuir com o processo de apoptose celular do córtex cerebral, que por sua vez, pode ser causada pela diminuição dos níveis corticais de ferro.

O chumbo, em nível da membrana celular, gera danos tanto para lipídeos quanto para proteínas, sendo estes danos, ao que tudo indica, causados por alterações na liberação de ferro e consequente formação de radicais livres, pelos mecanismos que controlam a formação de antioxidantes e pelos efeitos oxidativos do próprio chumbo (ADONAYLO; OTEIZA, 1999; VILLEDA-HERNANDEZ et al., 2001).

Estudos experimentais têm demonstrado de forma consistente a presença de concentrações elevadas de chumbo em animais com deficiência de ferro, em comparação a grupo controle (BRADMAN et al., 2001). O mecanismo provável para maior absorção de chumbo, para os autores, 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 hematopoético, reduzindo a excreção de chumbo (BRADMAN et al., 2001).

Apesar desta consistência de resultados em estudos com animais, os resultados de estudos com humanos adultos acerca da deficiência de ferro e absorção de chumbo são menos conclusivos (FLANAGAN; CHAMBERLAIN; VALBERG, 1982; MAHAFFEY, 1985; WATSON et al., 1986; MAHAFFEY, 1990). Já em crianças, inúmeros estudos epidemiológicos apontaram uma correlação entre a deficiência de ferro e maiores concentrações de chumbo no sangue (YIP; NORRIS; ANDERSON, 1981; YIP; DALLMAN, 1984; MARKOWITZ; ROSEN; BIJUR, 1990; HAMMAD; SEXTON; LANGENBERG, 1996; RUFF et al., 1996; WRIGHT et al., 1999). Por outro lado, outros estudos com crianças não encontraram relação entre a

ingestão ou deficiência de ferro e a concentração de chumbo em sangue (HERSHKO et al., 1984; LUCAS; SEXTON; LANGENBERG, 1996). Entretanto, é importante destacar as diferentes metodologias utilizadas nestes últimos estudos, uma, adotando a dieta para medir a concentração de ferro e a outra metodologia, avaliando crianças mais velhas (10-18 anos) sem grupo controle para a idade, já que a idade apresenta-se como um fator importante na absorção de chumbo.

Percebe-se neste sentido, conforme mencionado por pesquisadores, a necessidade de aprofundar as investigações para que se possa definitivamente afirmar se a suplementação com ferro é ou não capaz de proteger o organismo contra o chumbo (WANG et al., 2007a).

Bradman et al. (2001) consideraram contraditórias as evidências que indicam que a deficiência de ferro aumenta a concentração de chumbo em crianças, pois tais evidências seriam baseadas principalmente em dados obtidos em pesquisas experimentais, não extrapoladas para estudos em humanos. Para eles, as pesquisas não apresentam qual seria o estado de ferro necessário para conferir efeito de proteção contra o chumbo para uma criança. Por esta razão, os referidos autores promoveram um estudo comparando as concentrações de chumbo no sangue de crianças com deficiência e normalidade de ferro de regiões com baixos, médios e altos índices de contaminação por chumbo. Foram avaliadas 319 crianças, de um a cinco anos, onde foram analisadas as concentrações de chumbo na pintura, solo, poeira, verificado tempo de habitação no local contaminado, e coletado sangue para quantificação de chumbo e ferro. A média da concentração de chumbo no sangue foi de 4,9 µg/dL, contudo, 14% das crianças apresentaram índices superiores a 10 µg/dL; com relação ao ferro, muitas crianças apresentaram deficiência de ferro (24% com ferritina <12 ng/dL). Concentrações elevadas de chumbo em sangue entre as crianças com deficiência de ferro persistiram após o ajuste de possíveis fatores de interferência, onde a maior diferença nas concentrações de chumbo no sangue foi em torno de 3 µg/dL entre as normais e as com deficiência de ferro. De acordo com os autores, faz-se necessário sanar a problemática da deficiência de ferro, bem como reduzir a exposição ao chumbo, especialmente de crianças que vivem em ambientes mais contaminados (BRADMAN et al., 2001).

Para investigar a eficácia da suplementação com ferro para os efeitos adversos do chumbo, Wang et al. (2007a) avaliaram ratos machos (20-22 dias) por um período de seis semanas, divididos em grupo controle tratado com acetato de

sódio em água de beber e três grupos experimentais, tendo um grupo experimental (GE1) recebido água de beber com acetato de chumbo (342 µg/mL), o segundo (GE2) água de beber com acetato de chumbo (342 µg/mL) + gavagem gástrica de sulfato ferroso (7 mg/Kg) a cada dois dias e o terceiro grupo experimental (GE3) recebido água de beber com acetato de chumbo (342 µg/mL) + gavagem gástrica de sulfato ferroso (14 mg/kg) a cada dois dias. De acordo com os autores, os animais que receberam chumbo apresentaram concentrações significativamente maiores do íon metálico no sangue e tecido cerebral em comparação ao grupo controle; as imagens obtidas por meio da microscopia eletrônica foram sugestivas de vazamento/hemorragia vascular cerebral. Com relação ao Western blot os resultados demonstraram que a administração de chumbo reduziu cerca de 29-68% na expressão da proteína *occludin* em comparação com o grupo controle. Esta proteína, existente em várias formas fosforiladas, atua como reguladora dinâmica de proteína, cuja presença na membrana está correlacionada com a diminuição da permeabilidade paracelular. As múltiplas funções da *occludin* tornam-na indispensável para a permeabilidade da barreira hematoencefálica e mais vulnerável as ações de substâncias tóxicas. Para os animais expostos ao chumbo e suplementados com ferro, foi possível observar a manutenção do padrão de normalidade da estrutura cerebral, bem como a restauração da expressão de *occludin* a níveis normais. Além disso, a baixa dose de suplemento de sulfato ferroso (7 mg/kg) reduziu significativamente as concentrações de chumbo no sangue e tecidos cerebrais. Já os animais suplementados com doses maiores de sulfato ferroso (14 mg/kg), contudo, apresentaram concentrações mais elevadas de chumbo no sangue e no córtex cerebral, em comparação aos demais grupos, porém a expressão de *occludin* também foi restaurada. Com base nestes resultados, os autores consideram que a exposição ao chumbo rompe a estrutura da barreira hematoencefálica, facilitando com isso o acúmulo do íon metálico no tecido cerebral. Por outro lado, a suplementação com baixas doses de sulfato ferroso parece proteger a integridade da barreira hematoencefálica contra os efeitos adversos do chumbo, tendo assim, um efeito benéfico, podendo apresentar implicações clínicas significativas.

Ainda acerca da interação entre ferro e chumbo, Wang et al. (2007b) pesquisaram o papel do ferro nos efeitos da apoptose de células corticais induzida pelo chumbo, durante o desenvolvimento de ratos. A amostra do estudo foi

composta por ratos machos, desmamados, divididos aleatoriamente em quatro grupos, um controle, que recebeu acetato de sódio, e três grupos experimentais que receberam 400 mg/mL solução de acetato de chumbo na água de beber, entre os quais dois dos grupos foram simultaneamente suplementados, a cada dois dias por meio de gavagem gástrica, com solução de sulfato ferroso de 20 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente, por seis semanas. Os autores observaram ao final do estudo, para os grupos em que foi administrado acetato de chumbo, a ocorrência de fragmentação do DNA, aumento da porcentagem de células positivas do *terminal transferase-mediated dUTP nick end labeling* - TUNEL e das atividades de ativação da caspase 3 e diminuição significativa nas concentrações de ferro no córtex, em comparação com os controles. A suplementação concomitante com diferentes doses de sulfato ferroso pareceu reestabelecer as concentrações corticais desta substância a padrões normais. Embora a baixa dose de sulfato ferroso tenha reestabelecido a concentração de chumbo no cérebro a padrões considerados normais e a alta dose de sulfato ferroso não, ambos reduziram a formação de fragmentos de DNA, mostraram algumas células TUNEL-positivas com núcleos amarelos e inibiram a degradação da procaspase-3 induzida pelo chumbo. Segundo os autores, o estudo foi capaz de sugerir que a suplementação com sulfato ferroso durante a exposição ao chumbo previne contra citotoxicidade e apoptose induzida por este metal, onde as vias MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) desempenham um papel importante na apoptose cerebral induzida por chumbo, ativando a via do receptor extracelular de quinases (MEK/ERK), que suprime a sinalização por JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (WANG et al., 2007b).

Em nosso grupo de pesquisa, foram realizados outros dois estudos que analisaram a ação do sulfato ferroso em ratos expostos a acetato de chumbo. O primeiro, realizado por Ferreira (2012) que analisou os marcadores de estresse oxidativo no cérebro de ratos e verificou que a administração de acetato de chumbo promoveu alteração nos marcadores de estresse oxidativo em cérebro de ratos, principalmente no sistema antioxidante enzimático. Já o sulfato ferroso foi capaz de diminuir a concentração de chumbo no sangue e cérebro, porém o mesmo não produziu efeito protetor com relação aos antioxidantes em cérebro de ratos. O segundo, desenvolvido por Duarte (2013) utilizou como método de avaliação a pesquisa do Potencial Evocado Auditivo Cortical (PEAC) com a análise da latência dos componentes P1, N1 e P2. Concluiu-se que a ingestão isolada do acetato de chumbo

não refletiu no aumento das latências dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC, tão pouco causou alteração morfológica no tecido cerebral, com exceção da maior dose de acetato de chumbo utilizada (400 mg/L), associada a suplementação com sulfato ferroso (20 mg/kg). A suplementação com o sulfato ferroso, entretanto, foi capaz de diminuir os níveis do chumbo no sangue e no cérebro dos animais.

2.4 POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO

O Potencial Evocado Auditivo (PEA) é uma atividade bioelétrica que ocorre em diferentes estruturas do sistema auditivo em resposta a uma estimulação auditiva (SOUSA et al., 2010).

Os PEA podem ser classificados de acordo com diferentes critérios, sendo os mais comuns a latência ou tempo da resposta, propriedades específicas dos geradores da resposta e a origem anatômica das respostas (FIGUEIREDO; CASTRO JUNIOR, 2003).

Com relação à latência, a atividade elétrica é classificada com base no tempo transcorrido entre a apresentação do estímulo acústico e o seu surgimento, ou seja, quanto mais próximo da porção periférica estiver à fonte geradora da atividade elétrica, menor será este tempo. Assim, a atividade elétrica passa a ser denominada como Potenciais Evocados Auditivos de Curta Latência (que ocorrem antes de 10 ms), Potenciais Evocados Auditivos de Média Latência (entre 10 e 80 ms) e Potenciais Evocados Auditivos de Longa Latência (de 80 a 750 ms) (JEWETT; WILLISTON, 1971).

Independente da classificação utilizada, destaca-se que as respostas não dependem da habilidade linguística do indivíduo e, com exceção dos potenciais de longa latência, não demandam um processamento cognitivo do estímulo acústico, sendo considerada assim, uma técnica de avaliação complementar àquelas comportamentais, e não equivalentes (SCHOCHAT, 2004).

Desde a primeira descrição do PEA realizada por Davis (1939) ao observar modificações do traçado do eletroencefalograma em resposta a um estímulo acústico, os PEA se apresentaram como um método objetivo, eficaz para a avaliação da funcionalidade das estruturas do sistema auditivo, onde, uma vez associados a métodos subjetivos de avaliação, consolidam o diagnóstico audiológico

múltiplos geradores na região de núcleo coclear na porção inferior do tronco encefálico, a onda IV possui múltiplos geradores na região de complexo olivar superior, com participação dos núcleos cocleares e núcleos do lemnisco lateral, a onda V composta por múltiplos geradores, entre eles, fibras do lemnisco lateral e do colículo inferior, e as ondas VI e VII sendo possivelmente geradas por fibras do corpo geniculado medial (STARR; HAMILTON, 1976; MÖLLER et al., 1981).

As ondas do PEATE são registradas nos primeiros 10 ms após o início da estimulação no sistema auditivo (HALL III, 1992), e, a presença ou ausência destas respostas dentro de determinado período de latência podem indicar a existência de alterações estruturais e/ou funcionais, comprometendo a transmissão do estímulo acústico ao longo da via auditiva (MUSIEK et al., 1999).

2.4.2 Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico em ratos

Estudos envolvendo o PEATE em ratos há muito tempo estão consolidados e tem sido úteis para analisar a sincronização neural das vias auditivas centrais e periféricas. Isto porque, os modelos animais, especificamente ratos, apresentam certas vantagens para estudos auditivos, tanto pela uniformidade genética de linhagens puras que reduzem a variabilidade experimental, quanto pelo grande número de linhagens puras e mutações genéticas que afetam o sistema auditivo, permitindo obter em uma amostra uma ampla gama de fenótipos (HENRY; LEPKOWSKI, 1978).

Os núcleos geradores do PEATE foram descritos por Buchwald e Huang (1975) que ao pesquisarem o PEATE em gatos encontraram como origem da onda I o nervo auditivo, da onda II os núcleos cocleares, da onda III as fibras cruzadas do complexo olivar superior, da onda IV as fibras ipsi e contralaterais do núcleo do lemnisco lateral e da onda V as fibras cruzadas do colículo inferior. Pontos similares de origem foram investigados e confirmados em estudos com morcegos (GRINNELL, 1963), chinchilas (ROTHENBERG; DAVIS, 1967) e ratos (HUANG, 1980; MÖLLER, 1983).

Alguns pesquisadores consideram o estabelecimento de locais exatos dos geradores de ondas, uma concepção simplista, já que cada onda parece refletir não só a atividade de uma estrutura, mas também de múltiplos geradores sobrepostos (ACHOR; STARR, 1980; SHAW, 1987).

2.4.3 Processo Maturacional das vias auditivas

Em virtude do processo maturacional dos PEA ser passível de observação, a maturação pós-natal passou a ser estudada em uma variedade de espécies de mamíferos, incluindo gatos (JEWETT; ROMANO, 1972; SHIPLEY et al., 1980; LAUKLI; MAIR, 1982), ratos (JEWETT; ROMANO, 1972) e camundongos (HENRY; LEPKOWSKI, 1978; SHNERSON; PUJOL, 1982).

É sabido que mudanças importantes nas latências das ondas do PEATE ocorrem em função do processo de maturação das vias auditivas do tronco encefálico, processo este que nos humanos se mantém do nascimento até por volta do segundo ano de vida (SOUSA et al., 2010).

Do ponto de vista anatômico, no ser humano, a porção do tronco encefálico que abrange a via auditiva chega a triplicar de comprimento entre a 21ª semana de gestação e o primeiro ano de vida (MOORE; PERAZZO; BRAUN, 1995). O processo de aumento da via auditiva permanece ocorrendo até o terceiro ano de idade, quando o diâmetro do tronco encefálico atinge seu tamanho real (EGGERMONT, 1988; MOORE; PERAZZO; BRAUN, 1995). A constante especialização das vias auditivas do tronco encefálico após o nascimento leva a um aumento na velocidade de condução nervosa, de modo que o crescimento físico da estrutura passa a ser compensado, passando de 5,5 ms na 30ª semana de gestação para 20 ms no adulto (MOORE; PERAZZO; BRAUN, 1995). Em crianças, acreditava-se no início que no momento do nascimento (24 a 96 horas), a definição das ondas não era tão clara como no adulto, pois as ondas I e II seriam geralmente visualizadas de forma mesclada, a onda III se encontraria geralmente bem definida, e as ondas IV e V frequentemente fundidas (SALAMY; MCKEAN; BUDA, 1975). A literatura atual, contudo, demonstrou já ser possível visualizar as ondas I, III e V entre a 30ª e 32ª semanas de gestação (EGGERMONT, 1988; HALL III, 2007).

Assim como no humano, o sistema auditivo de animais ainda não está totalmente maduro ao nascimento (DUM, 1984). Contudo, no rato, nenhuma resposta neural é registrada até os 13-14 dias de nascimento (JEWETT; ROMANO, 1972). A partir deste período, o PEATE com estímulo clique passa a ser registrado de modo consistente com as ondas I e II, seguido das ondas III, IV e V a partir dos dias 16, 20 e 24, respectivamente, após o nascimento (BLATCHLEY; COOPER; COLEMAN, 1987).

Para estes mesmos autores, se o PEATE é tido como uma representação da ativação sequencial de uma série de núcleos do tronco encefálico, então o aparecimento de uma onda e a subsequente mudança em sua amplitude pode tanto indicar a ativação particular de núcleos do tronco encefálico quanto o desenvolvimento periférico-central desta via auditiva, evidenciando a correlação entre o desenvolvimento da função sináptica e a processo de maturação pós-natal deste potencial (BLATCHLEY; COOPER; COLEMAN, 1987).

Estas mudanças gradativas relacionadas à morfologia do registro do PEATE, bem como à redução da latência que se dá com o aumento a idade, podem ser explicadas pela mielinização progressiva das fibras, sincronização neural, e aumento da eficiência da transmissão na sinapse dentro dos núcleos que compõem a via auditiva do tronco encefálico (ROMAND et al., 1976; DUM, 1984; BLATCHLEY; COOPER; COLEMAN, 1987).

Assim, o processo de maturação pós-natal da via auditiva do tronco encefálico, torna o rato um modelo experimental ideal para demonstrar possíveis alterações na avaliação neurofisiológica do sistema nervoso (SHAW, 1988), de modo especial, no PEATE.

Blatchley, Cooper e Coleman (1987) apresentaram dados com relação ao período de registro das cinco ondas do PEATE, indicando a ocorrência do processo maturacional do nascimento até a idade adulta, exemplificado pela diminuição dos padrões de amplitude e latência das ondas. O quadro 1 mostra a ocorrência das ondas I, II, III, IV e V em ratos, de acordo com a idade, em dias.

Quadro 1. Porcentagem da manifestação pós-natal, em ratos, das ondas I, II, III, IV e V em dias, utilizando três frequências de teste em 95 dBNPS.

Idade (em dias)	Freq. (kHz)	Onda I	Onda II	Onda III	Onda IV	Onda V
14	3	100%	100%	80%	40%	-
	8	100%	100%	87,5%	75%	-
	40	44%	22%	11%	-	-
16	3	100%	100%	100%	100%	-
	8	100%	100%	100%	100%	-
	40	100%	100%	100%	42,8%	-
20	3	100%	100%	100%	100%	43%
	8	100%	100%	100%	100%	57%
	40	100%	100%	100%	100%	43%
24	3	100%	100%	100%	100%	78%
	8	100%	100%	100%	100%	83%
	40	100%	100%	100%	100%	75%
36	3	100%	100%	100%	100%	100%
	8	100%	100%	100%	100%	100%
	40	100%	100%	100%	100%	75%
Adulto	3	100%	100%	100%	100%	100%
	8	100%	100%	100%	100%	100%
	40	100%	100%	100%	100%	100%

Quadro adaptado a partir de tabela apresentada em BLATCHLEY, COOPER e COLEMAN (1987).

2.5 CHUMBO E SISTEMA AUDITIVO

Inúmeros estudos abordam os efeitos neurotóxicos da exposição ao chumbo tanto em animais quanto em humanos. Contudo, com relação ao sistema auditivo, as pesquisas apontam que a alteração pode ocorrer tanto na porção periférica quanto na porção central, apesar de não se saber exatamente quais seriam as estruturas alteradas, nem os mecanismos moleculares envolvidos nestas alterações (BALOH et al., 1979; OTTO et al., 1985; KIM; CRICHLLOW; BLAKLEY, 1990; DISCALZI et al., 1992; OTTO; FOX, 1993; LILIENTHAL; WINNEKE, 1996;

COUNTER et al., 1997b; ALVARENGA et al., 2003; MONTEIRO et al., 2003; DASCANIO; VALLE, 2008).

Os procedimentos eletrofisiológicos, dentre eles o PEATE, têm sido considerados os biomarcadores mais sensíveis no processo de investigação dos efeitos tóxicos do chumbo quando comparados aos procedimentos comportamentais (ALVARENGA, 2005b).

Considerando especificamente a porção auditiva do tronco encefálico, estudos em seres humanos envolvendo chumbo e PEATE têm demonstrado resultados muito variáveis, que vão desde a manutenção do padrão de normalidade das latências absolutas e intervalos interpicos das ondas, aumento das latências absolutas e intervalos interpicos, aumento das latências absolutas correlacionadas com a concentração de chumbo no sangue até a não observação desta correlação, conforme apresentado a seguir.

Counter et al. (1997a) analisaram 107 escolares residentes em áreas contaminadas por chumbo, com concentração média de chumbo em sangue de 40 µg/dL (6,2-128 µg/dL). As latências absolutas I, III e V e interpicos I-III, III-V e I-V mantiveram-se dentro da normalidade, mesmo nas crianças com concentrações elevadas de chumbo em sangue.

Estes mesmos autores avaliaram 62 crianças expostas ao chumbo, onde a com concentração média de chumbo em sangue foi de 52,6 µg/dL (9,9-110 µg/dL) em comparação com concentração média de chumbo em sangue de 6,4 µg/dL (3,9-12 µg/dL) para o grupo de crianças não expostas. Encontraram latências absolutas das ondas I, III e V e intervalos interpicos I-III, III-V e I-V dentro da normalidade (COUNTER et al., 1997b).

Aumento das latências absolutas e intervalos interpicos foram encontrados por Holdstein et al. (1986) que pesquisaram 29 indivíduos, contaminados acidentalmente pela comida, cuja concentração de chumbo em sangue encontrada foi 262±11 µg/dL. Apesar de o PEATE ter demonstrado aumento da latência do interpico I-III, os autores consideraram necessária uma maior casuística para confirmar o resultado.

Hirata e Kosaka (1993) analisaram 15 trabalhadores, com concentração de chumbo em sangue de 42,4±15,6 µg/dL na faixa entre 13-67 µg/dL e constataram aumento significativo na latência da onda I e interpico III-V, com diferença

significante ao comparar o grupo exposto ao grupo controle. Entretanto, não houve correlação destes resultados com a concentração de chumbo no sangue.

Seguindo com os resultados envolvendo chumbo e PEATE, onze pesquisas apontaram aumento das latências absolutas das ondas correlacionadas com concentração de chumbo no sangue.

Otto et al. (1985) investigaram 49 crianças na faixa etária de seis a 12 anos, com histórico de exposição ao chumbo (média de chumbo em sangue de 28 µg/dL, faixa entre 6-59 µg/dL). No momento da avaliação eletrofisiológica, cinco anos após a contaminação, a concentração média de chumbo em sangue encontrava-se em 14 µg/dL (faixa entre 6-30 µg/dL). As latências absolutas das ondas III e IV mostraram-se aumentadas, com associação significante com a concentração de chumbo em sangue. Os autores não descartaram no estudo, o comprometimento coclear.

Discalzi et al. (1992) analisaram 49 trabalhadores com a concentração de chumbo em sangue de 54,6 µg/dL tendo como exposição média, nos três anos anteriores à avaliação eletrofisiológica, 53,5 µg/dL. Foi constatado aumento das latências dos intervalos interpicos I-III, III-V e I-V em trabalhadores com concentração de chumbo em sangue maior que 50 µg/dL, estando assim, correlacionado o aumento das latências com a concentração de chumbo em sangue.

Murata et al. (1993) estudaram um grupo de 22 trabalhadores, cuja concentração de chumbo em sangue esteve entre 12-64 µg/dL. Ao analisarem o PEATE e P300 observaram correlação significante entre a latência absoluta do P300 e a onda V, bem como o interpico I-V e a concentração de chumbo no sangue. Entretanto não houve diferença significante ao comparar os indivíduos expostos ao chumbo e o grupo controle.

Discalzi et al. (1993) investigaram 22 trabalhadores com concentração de chumbo em sangue de 47,5 µg/dL. Houve aumento significante da latência do intervalo interpico I-V, de modo especial nos trabalhadores cuja concentração de chumbo em sangue apresentava os valores mais elevados.

Em pesquisas realizadas com gestantes expostas ao chumbo, Rothenberg, Poblano e Garza-Morales (1994) e Rothenberg, Poblano e Schnaas (2000) avaliaram 30 mulheres com concentração de chumbo em sangue de 2,5-35 µg/dL na 20ª semana de gestação. Encontraram correlação significante entre a concentração de chumbo em sangue apresentado pelas mães na 20ª semana de gestação com as latências dos intervalos interpicos I-V, III-V, tanto na avaliação realizada com seus

bebês aos dois meses de vida quanto na realizada entre cinco e sete anos.

Em estudo de revisão de literatura de 102 artigos que analisou a relação dose-efeito do chumbo, Araki et al. (2000) constataram que as concentrações de chumbo em sangue entre 30-40 µg/dL alteram o P300 e entre 40-50 µg/dL afetam o PEATE.

A pesquisa de Counter e Buchanan (2002) com 30 trabalhadores que apresentavam concentração de chumbo em sangue de $45,1 \pm 19,5$ µg/dL na faixa entre 11,2-80 µg/dL também apontou atraso das latências das ondas nos trabalhadores cuja concentração de chumbo em sangue encontrava-se superior a 47 µg/dL.

Ainda nesta linha de resultados, Bleecker et al. (2003) avaliaram 359 trabalhadores, com concentração de chumbo em sangue de $27,7 \pm 8,4$ µg/dL e dose acumulada de $718,6 \pm 421,03$ µg/dL. Os autores consideraram que as latências dos intervalos interpicos I-III e I-V estavam associadas à dose de chumbo acumulada e que a latência da onda I é sensível a concentração de chumbo em sangue.

Zou et al. (2003) analisaram o PEATE de 114 crianças na faixa etária de um a seis anos, com baixa-moderada exposição ao chumbo (32-380 µg/L), sendo consideradas como baixa exposição concentrações inferiores a 100 µg/L e alta superior a 100 µg/L. As latências absolutas das ondas I, III e V da orelha esquerda apresentaram maiores valores no grupo com alta exposição ao chumbo quando comparado com o grupo baixa exposição, com correlação positiva entre aumento da latência e concentração de chumbo em sangue. Esta correlação significativa também foi encontrada para a latência absoluta da onda I da orelha esquerda e a concentração de chumbo no grupo com baixa exposição. Os autores consideraram que o aumento da latência absoluta das ondas pelo chumbo, mesmo em baixas concentrações, indica que este íon metálico é capaz de alterar as porções periférica e central do sistema auditivo, sendo o PEATE um marcador sensível dos efeitos do chumbo no sistema nervoso em crianças.

Wang, Wang e Feng (2005) realizaram pesquisa com 100 crianças com plumbismo, sendo 50 tratadas com cálcio e as demais pertencendo a um grupo controle. De acordo com os resultados do PEATE, a latência absoluta da onda V e o intervalo interpico III-V e I-V estiveram aumentados nas crianças com plumbismo quando comparadas ao grupo controle. Já a amplitude das ondas I, III e V se

mostrou menor no grupo plumbismo em comparação ao controle, tendo ambas as análises apresentado diferença estatisticamente significativa.

Um menor número de estudos que analisaram a influência da exposição ao chumbo e o PEATE também encontraram em seus resultados aumento das latências absolutas das ondas, porém, sem correlação com a concentração do metal no sangue. Entre elas destaca-se a pesquisa de Lille et al. (1988) que analisou o PEATE e potenciais somatosensoriais de 13 indivíduos, com média de idade de 37 anos e concentração média de chumbo em sangue de 100 µg/dL. Os autores relataram como única anormalidade do PEATE o aumento de latência do interpico I-V em um indivíduo, não havendo relação significativa entre a concentração de chumbo em sangue e as latências absolutas obtidas no PEATE.

Murata et al. (1995) avaliaram 36 mulheres expostas ocupacionalmente ao chumbo, com concentração do metal em sangue de 55,6 µg/dL. Os autores não encontraram no PEATE diferença estatisticamente significativa entre as latências as ondas I, III e V entre o grupo exposto ao chumbo e o grupo controle.

Osman et al. (1999) verificaram o PEATE de 155 crianças, com faixa etária de quatro a 14 anos e concentração média de chumbo em sangue de 72 µg/dL (faixa entre 19-281 µg/dL). Não houve associação entre as latências absolutas das ondas e a concentração de chumbo no sangue, entretanto, as crianças com maior concentração de chumbo em sangue apresentaram maior latência das ondas I, III e V quando comparadas as crianças com menor concentração de chumbo em sangue. Quando corrigido o fator idade, contudo, o efeito do chumbo no sangue mostrou-se significativo para a latência da onda I.

Counter (2002) em seu estudo com 112 crianças com concentração média de chumbo em sangue de 49,25 µg/dL (faixa entre 4,4-119,1 µg/dL) não encontrou correlação significativa entre as latências dos intervalos interpicos das ondas do PEATE e os valores de chumbo em sangue, bem como nenhuma diferença significativa entre o grupo de crianças expostas ao chumbo e o grupo controle.

Alvarenga (2005b) promoveu estudo com 156 crianças, na faixa etária entre 18 meses a 14 anos e 5 meses, que apresentavam valores de plumbemia estimada de 12,2 µg/dL, com mínimo de 2,4 µg/dL e máximo de 33 µg/dL. Os resultados demonstraram não haver associação entre o valor de plumbemia e as latências absolutas e intervalos interpicos obtidos na avaliação do PEATE nas crianças

contaminadas pelo chumbo, independente dos valores de plumbemia (valores obtidos na primeira coleta ou valores de plumbemia estimada).

A mesma gama de resultados conflitantes acerca do comprometimento da porção auditiva do tronco encefálico e a exposição ao chumbo tem sido observada em pesquisas experimentais, cujos resultados serão apresentados a partir deste momento.

Lilienthal, Winneke e Ewert (1990) e Lilienthal e Winneke (1996) administraram doses diárias de 350 e 600 ppm de acetato de chumbo à macacos rhesus durante a fase pré e pós-natal, tendo sido encontrada concentração de chumbo no sangue de 40,3 e 55,7 µg/dL para os grupos em que foi administrado 350 e 600 ppm de acetato de chumbo, respectivamente. Ao realizarem a pesquisa do PEATE verificaram a ocorrência de quatro ondas, com considerável aumento da latência das ondas I, II e IV. Para os autores o chumbo promoveu aumento de latência das ondas I, II e IV, mesmo com a administração do metal cessada há 18 meses.

Lasky et al. (1995) avaliaram macacos com o intuito de compreender o efeito que baixas concentrações de chumbo poderiam ocasionar ao sistema auditivo. Para isso avaliaram 19 macacos, com 11 anos de idade, com exposição *in utero* ou nos primeiros meses de vida. Os autores consideraram haver alteração no tronco encefálico, mesmo que o resultado do PEATE tenha apresentado um discreto aumento das latências absolutas das ondas I, II e IV.

Em nova pesquisa promovida por Lasky et al. (2001) os autores submeteram 31 macacos fêmeas a exposição ao chumbo, cuja concentração do íon metálico em sangue esteve entre 35-40 µg/dL. As análises de sangue e auditivas foram realizadas em três etapas, sendo a primeira ao nascimento, a segunda no primeiro ano de vida e a última no segundo ano de vida. No que diz respeito ao PEATE, os autores não verificaram, em nenhuma etapa das avaliações, alteração na latência absoluta das ondas quando comparado ao grupo controle, concluindo assim que o chumbo não apresenta efeito tóxico para nervo auditivo e tronco encefálico.

Jones et al. (2008) expuseram ratos (Balb/c) machos, fêmeas ao longo da gestação e filhotes nos primeiros 21 dias após o nascimento, a duas doses distintas de acetato de chumbo, 0,10 mmol/L (baixa) e 2,00 mmol/L (alta). As concentrações médias de chumbo no sangue encontradas para o grupo controle foram de 1,04±0,03 µg/dL (n=47), 35,9±1,7 µg/dL para o grupo de baixa exposição (n=47) e

228,16±16,4 µg/dL para o de alta exposição (n=19). Ao pesquisarem o PEATE os autores verificaram nos dois grupos experimentais aumento significativo da latência absoluta da onda V, em comparação com onda I e III, bem como do intervalo interpico I-V, sugerindo este último resultado a ocorrência de uma ruptura na sincronia neural em decorrência da exposição ao chumbo. Em contrapartida, a latência absoluta da onda I não foi afetada por nenhuma dosagem de chumbo, indicando que a cóclea e nervo coclear não tiveram suas funções afetadas pela exposição ao metal. Neste sentido, os autores consideraram que a avaliação funcional realizada não apontou perda significativa da função periférica, porém, revelou deficiência no tempo de condução e no processamento temporal do tronco encefálico, demonstrando que a exposição ao chumbo durante o desenvolvimento altera a estrutura e a função axonal do mesmo.

Recentemente, os estudos tem voltado seu interesse para a análise das alterações bioquímicas e morfológicas do cérebro de animais expostos ao chumbo, conforme pode ser observado na descrição dos estudos a seguir.

Lurie, Brooks e Gray (2006) desenvolveram um estudo experimental com galinhas a fim de verificar se a exposição ao chumbo durante o desenvolvimento resultaria em déficits de processamento auditivo temporal, bem como identificar possíveis alterações celulares induzidas pela exposição ao chumbo no tronco encefálico. Os resultados demonstraram que a exposição ao chumbo não teve efeito sobre o número de neurônios ou células da glia dentro do tronco encefálico, entretanto, resultou em diminuição significativa na expressão da *medium weight neurofilament protein* (NFM), bem como diminuição da fosforilação de neurofilamento dentro dos axônios de conexão dos núcleos auditivos do tronco encefálico. Em virtude da quantidade de neurofilamentos poder afetar a velocidade de condução dos axônios, para os autores, esses resultados poderiam indicar uma ligação anatômica entre a exposição ao chumbo, os déficits processamento temporal auditivo e dislexia.

Visando a identificação de possíveis alterações celulares subjacentes a déficits funcionais do processamento auditivo temporal, Jones et al. (2008), quantificaram neurônios e células da glia dos núcleos auditivos do tronco encefálico de ratos, alterados pelo chumbo. Tais quantificações foram realizadas em ratos de grupo controle e expostos ao chumbo, usando imuno-histoquímica, Western blotting e eletroforese em gel bidimensional. Os animais foram tratados com uma dose de

0,10 mmol/L (baixa) ou 2,00 mmol/L (alta) de acetato de chumbo ao longo da gestação e nos primeiros 21 dias após o nascimento. A exposição ao chumbo resultou em pouca mudança nas proteínas da glia, em contrapartida, alterou a estrutura das proteínas neuronais dos neurofilamentos dos núcleos do tronco encefálico.

Prins et al. (2010) elaboraram um estudo *in vitro*, com o objetivo de determinar se o chumbo alteraria a expressão da proteína *voltage-dependent anion channel* (VDAC), de neurônios auditivos centrais. Para isso, os pesquisadores administraram a ratos CBA/CaJ (n = 3-5/grupo) água contendo 0,01 mmol/L ou 0,10 mmol/L de acetato de chumbo, durante o desenvolvimento. No dia 21 pós-natal, realizaram imunohistoquímica que revelou uma diminuição significativa para VDAC em neurônios do núcleo medial do corpo trapezóide. A análise Western blot confirmou que a exposição ao chumbo resultou em uma diminuição significativa para VDAC e que estas diminuições poderiam conduzir a um aumento da regulação de outros sistemas produtores de energia celular, como um mecanismo de compensação, além de ter sido observado um aumento, induzido pelo chumbo, na proteína *creatine kinase* do tipo cerebral na região auditiva do tronco encefálico. A análise proteômica demonstrou que a administração de acetato de chumbo resultou no aumento da expressão de várias proteínas envolvidas na homeostase de energia celular e diversas vias de metabolização na região ventral no tronco encefálico, incluindo a glicólise, fosforilação oxidativa e o circuito de fosfocreatina.

Conforme pôde ser observado nos estudos apresentados acima, ainda não há uma correlação entre achados bioquímicos, morfológicos e clínicos acerca da interação entre chumbo e o sistema auditivo.

2.6 PROTEOMA

A análise proteômica é uma nova área da ciência que teve início em 1994 quando Marc Wilkins usou o termo “Proteoma”, referindo-se ao conjunto de **proteínas** codificadas por um determinado **genoma** (WILKINS et al., 1996). Desde então, inúmeras são as definições utilizadas para a análise proteômica, sendo, provavelmente a melhor definição “a análise sistemática de proteínas em relação à sua identidade, quantidade e função” (PENG; GYGI, 2001).

Inúmeros tipos de estudos compõem o proteoma, porém a abordagem clássica é o estudo da expressão proteica global, que envolve a criação de mapas quantitativos das proteínas expressas em extratos de células ou tecidos. Os perfis proteicos expressos em diferentes condições fisiológicas 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; HAYSTEAD, 2002).

A análise proteômica possui uma natureza dinâmica e complexa, que é o resultado de muitas modificações pós-tradução, interações moleculares e uma variedade de proteínas resultantes de *splicing* alternativo de RNAm. Neste sentido, o número de proteínas modificadas e não modificadas encontradas em qualquer sistema biológico é muito maior do que o número de genes (ANDERSON et al., 2004). Espera-se, neste sentido, que passem a ser construídas novas perspectivas acerca da função biológica das proteínas em diferentes estados fisiológicos de uma célula ou tecido (SALVATO; CARVALHO, LEITE, 2012).

O objetivo principal da análise proteômica é identificar todas as proteínas individuais da célula, embora seja muito difícil encontrar um método de separação de proteínas que se baseie nas propriedades físicas ou químicas, como massa ou carga líquida e que englobe igualmente a diversidade de proteínas, haja vista que estes métodos afetam diretamente a obtenção de resultados confiáveis (SALVATO; CARVALHO; LEITE, 2012).

A expansão das tecnologias proteômicas pode ser atribuída ao rápido desenvolvimento da espectrometria de massa (MS), da bioinformática e da acessibilidade a vasta informação da sequenciação do genoma de muitos organismos. Ao contrário das abordagens tradicionais que examinavam uma ou poucas proteínas em um momento, em algumas amostras, a análise proteômica tem permitido examinar simultaneamente um grande número de proteínas em amostras múltiplas (TANNU; HEMBY, 2006).

A expressão de proteínas não ocorre em níveis semelhantes, sendo a maioria das proteínas consideradas de baixa abundância. Por esta razão, visando uma melhor detecção e quantificação por meio da espectrometria de massa (MS), faz-se necessária a escolha de um método de separação de proteínas adequado.

2.6.1 Eletroforese Bidimensional (2DE)

A Eletroforese Bidimensional (2DE) é definida como uma técnica de separação de proteínas, caracterizada pela análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975). Esta técnica de separação ocorre em duas dimensões. Na primeira, chamada de focalização isoeétrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). Já na segunda dimensão, intitulada eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) as proteínas são separadas de acordo com suas massas moleculares (MM) relativas (Figura 2) (WESTERMEIER; NAVEN, 2002).

Figura 2. Etapas envolvidas no processo de separação de proteínas por eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão, as proteínas de uma amostra são separadas de acordo com o seu pI. Após o processo de focalização, as mesmas são transferidas para um gel de poliacrilamida, onde são separadas de acordo com sua massa molecular relativa (segunda dimensão).

Um aspecto fundamental para a eficácia tanto da focalização isoeletrica quanto da 2D-PAGE é a preparação da amostra de proteínas. Para isto, as proteínas devem ser completamente desnaturadas, reduzidas, degradadas do complexo de proteínas e solubilizadas para interromper as interações

macromoleculares (CHEVALIER, 2010). Normalmente, para solubilizar as amostras, são utilizados tampões que contêm agentes caotrópicos (ureia e/ou tio-ureia), detergentes não iônicos (CHAPS ou Triton X-100), agentes de redução (DTT), proteases e inibidores de fosfatase (SALVATO; CARVALHO; LEITE, 2012).

Os agentes de redução que contêm ditioneitol (DTT) são capazes de desfazer as pontes dissulfeto, eliminando assim a forma nativa da proteína e conferindo-lhe uma conformação linear. Já o uso do dedocil sulfato de sódio (SDS), considerado um tensoativo aniônico, torna as proteínas negativamente carregadas, fazendo com que a migração das mesmas dependa basicamente de sua massa molecular (GE-HEALTHCARE, 2004).

Outro aspecto importante a ser destacado no processo de solubilização é o cuidado com o acúmulo de sais por meio de diálise ou precipitação. Os sais podem migrar das fitas de gradiente de pH imobilizados (*immobilized pH gradient* - IPG) e acumularem-se nas extremidades, induzindo a retenção de água e a redução da corrente eléctrica, interferindo no processo de focalização (SALVATO; CARVALHO; LEITE, 2012).

2.6.1.1 Focalização Isoelétrica (IEF)

É sabido que as proteínas podem apresentar carga líquida positiva, negativa ou neutra, dependendo dos aminoácidos que a compõe (estrutura primária) e do pH do meio. Desta forma, em um gradiente de pH e sob a influência de um campo eléctrico, as proteínas migram para a posição do gradiente na qual sua carga líquida seja zero, focalizando-se neste ponto, onde o valor de pH é numericamente igual ao ponto isoelétrico (NELSON; COX, 2002).

Neste sentido, entende-se por focalização isoelétrica, o processo baseado na migração das biomoléculas carregadas sob um campo eléctrico. A separação de uma mistura de proteínas com um gradiente de pH ocorre porque as proteínas são moléculas anfóteras e, assim, podem apresentar cargas negativas ou positivas em seus grupos ionizados, dependendo do meio de pH. Quando uma corrente eléctrica é aplicada, as proteínas migram no gel ao mesmo tempo, até que a diferença entre as cargas se torne igual a zero (ponto isoelétrico - pI), cessando neste ponto a migração. Proteínas de carga positiva, que estão na região da tira onde o valor de pH é inferior ao seu pI, migram diretamente para o pólo positivo, até chegar ao seu

pl. Por outro lado, as proteínas carregadas negativamente, que estão na região da tira em que o valor do pH é maior do que o seu pl, migram diretamente para o pólo negativo até chegar ao seu pl (SALVATO; CARVALHO; LEITE, 2012).

Atualmente a IEF das proteínas é realizada por meio de fitas com gradientes de pH imobilizados (IPG), que apresentam uma reação de copolimerização de monômeros de acrilamida, bisacrilamida e acrilamidas modificadas.

2.6.1.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

As proteínas previamente separadas pela IEF são transferidas para um gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que promove uma nova separação baseada, contudo, na massa molecular (MM). O gel de poliacrilamida é formado pela mistura dos monômeros acrilamida e bisacrilamida, sendo sua porosidade determinada por dois parâmetros: a porcentagem total de acrilamidas (%T) e a razão de entrecruzamento, proporcionado pela bisacrilamida (%C). Quanto maior for a %T, menor será o poro da malha, e por isso a escolha da concentração do gel é um parâmetro de extrema importância para que se tenha uma boa separação (GE-HEALTHCARE, 2004; CANTU, 2007).

2.6.1.3 Detecção das proteínas em gel

Após a realização da eletroforese, o gel deve ser corado para visualização das proteínas. O método ideal de coloração deve ser sensível para detectar concentrações extremamente baixas de proteínas, ter uma faixa dinâmica de detecção, linearidade, reprodutibilidade entre experimentos e compatibilidade com métodos de identificação. Os métodos de coloração mais comumente empregados são os que utilizam a coloração por prata ou por azul de *Coomassie* (CANDIANO et al., 2004). Apesar do método colorimétrico mais sensível ser considerado a prata, o azul de *Coomassie* é o método colorimétrico mais confiável para quantificação dos *spots*, haja vista que sua menor sensibilidade é compensada pela maior reprodutibilidade e pela menor chance de erros, em virtude da utilização de protocolos mais simples (CANDIANO et al., 2004). Outra vantagem da coloração

com *Coomassie* é a não interferência na análise dos *spots* pela espectrometria de massa (REINDERS; SICKMANN, 2002; CANDIANO et al., 2004).

2.6.2 Espectrometria de massas (*Mass Spectrometry – MS*)

Considerada uma importante ferramenta analítica, a 2DE é uma técnica capaz de detectar proteínas, atribuindo a elas ponto Isoelétrico e massa molecular, sem, contudo, identificá-las. Quando a Espectrometria de Massas é integrada ao método pós-2-DE, as proteínas correspondentes aos *spots* selecionados passam a ser identificadas.

Grande parte das proteínas, em sua forma íntegra, precisa ser submetida a uma digestão enzimática para serem corretamente identificadas pela MS. Cada proteína tem uma sequência específica de aminoácidos e quando uma protease de ação conhecida atua sobre determinada proteína, peptídeos são gerados, cada um com uma sequência e uma massa específica. Esta mesma protease quando atua em outra proteína, também gera peptídeos, mas com massas e sequências distintas da primeira. Diante das possíveis combinações de aminoácidos, peptídeos distintos são gerados após a ação da protease usada, gerando uma “impressão digital das massas de peptídeos” (*peptide-mass finger printing - PMF*) para cada proteína (MANN; HOJRUP; ROEPSTORFF, 1993; THIEDE et al., 2005).

De maneira geral, a 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 exatidão. 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).

2.7 PROTEÔMICA E AUDIÇÃO

Os estudos apresentados a seguir, realizaram a análise proteômica de tronco encefálico de ratos, tendo dois deles, correlacionado os achados proteicos aos obtidos nos exames eletrofisiológicos e eletroacústicos.

Nothwang et al. (2003) promoveram um primeiro estudo acerca do mapeamento proteico no complexo olivar superior (COS) e no colículo inferior (CI) do tronco encefálico de ratos, utilizando para isto eletroforese bidimensional em gel e espectrometria de massas. Para tanto, as proteínas foram separadas em quatro frações por centrifugação diferencial e comparadas as frações correspondentes do cerebelo. A análise por imunotransferência revelou frações microssomais e citosólicas altamente enriquecidas e outras duas frações eram misturas de vários compartimentos subcelulares. Por meio de eletroforese bidimensional em gel, os autores encontraram entre 456 e 674 *spots* de proteínas distintas. Cinquenta *spots* de proteínas provenientes da fração citosólica do COS foram identificados por espectrometria de massas, proporcionando informação sobre 30 genes diferentes que atuam em funções celulares distintas, metabolismo primário, citoarquitetura e transdução de sinal. Além disso, o sequenciamento de 11 *spots* correspondentes ao COS e frações citosólicas do CI confirmou a grande semelhança entre as amostras dos dois tecidos cerebrais.

Jamesdaniel et al. (2008) estudaram alterações precoces na expressão de proteínas na cóclea de ratos, induzidas pela exposição a cisplatina (12 mg/kg), que danifica preferencialmente as células ciliadas externas. Foram realizados os exames PEATE com estímulos de 2,5, 5, 10, 20 e 40 kHz e Emissões Otoacústicas Evocadas Produto de Distorção (EOEPD) em cada animal, pré e pós exposição a cisplatina. O PEATE apresentou aumento de limiares com variações de 10 a 34 dB para ratos Wistar e 4 a 12 dB para a ratos Sprague-Dawley, sendo em ambas as linhagens o nível de perda auditiva induzida pela cisplatina foi maior nas frequências mais altas (40 kHz) e menor nas mais baixas (2,5 kHz). Já as EOEPD apresentaram diminuição da amplitude de cerca de 10 dB em 8 e 16 kHz, sem qualquer alteração em frequências mais baixas. A cisplatina contudo, induziu grandes alterações na expressão de 19 proteínas envolvidas em apoptose, na sobrevivência das células, ou na progressão por meio do ciclo celular, sendo quinze das proteínas novas para o estudo da orelha interna. As análises por imunotransferência confirmaram aumento nos níveis das proteínas *pro-survival activating transcription factor 2* (ATF2), *pro-apoptotic serine-threonine protein kinase, receptor interacting protein* e *70/75 kDa nitrotyrosine bearing doublet*, de função desconhecida. Os anticorpos anti-nitrotirosina localizaram estas proteínas oxidativamente danificadas nos estereocílios das células ciliadas externas, na região das células de Hensen, nos núcleos das

células de sustentação. Para os autores, os resultados desta análise proteômica refletem o início das respostas de ototoxicidade e sobrevivência celular antes da observação de uma significativa perda funcional ou anatômica.

Liao et al. (2011) utilizaram diferentes técnicas de proteoma para detectar as alterações de expressão de proteínas do córtex auditivo de ratos expostos a ruído de impacto. Trinta ratos adultos foram divididos em grupo controle, grupo com exposição ao ruído agudo e grupo com 28 dias de recuperação após a exposição ao ruído. Todos os animais foram expostos a ruído de impacto de 156 dB para 50 pulsos com um tempo de subida de 100 μ s e duração de cerca de 0,25 ms, sendo a função auditiva avaliada por meio do PEATE. A eletroforese em gel bidimensional (2-DE) e a técnica de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) foram usadas para identificar a expressão diferencial de proteínas. Em comparação com o grupo controle, os limiares do PEATE encontraram-se significativamente aumentados em 2, 4, 8, 16, 32 kHz ($p < 0,05$) nos grupos com exposição ao ruído e grupo de recuperação. Houve uma mudança no limiar do PEATE (40-60 dBNPS) em todas as frequências testadas imediatamente após a exposição ao ruído de impacto. Uma recuperação parcial dos limiares do PEATE ocorreu entre os dias sete a 28 após a exposição ao ruído de impacto. Além disso, observou-se que os limiares mantiveram-se mais estáveis e sem recuperação adicional a partir de 14 a 28 dias após a exposição ao ruído. Com relação a análise proteômica, 36 *spots* contendo 27 proteínas foram revelados e identificados no córtex auditivo. Essas proteínas estão relacionadas com citoesqueleto, neurotransmissão, fornecimento de energia, função mitocondrial e remodelagem sináptica. Os autores concluíram que o ruído de impacto pode influenciar na função de transporte de microtúbulos e metabolismo celular, posteriormente afetando a neurotransmissão dos neurônios auditivos.

Kaltwaßer et al. (2013) buscaram quantificar e comparar as alterações pós-natais em duas áreas auditivas do tronco encefálico, sendo utilizadas para isso, amostras de proteínas do colículo inferior (CI) e complexo olivar superior (COS) de ratos recém nascidos e adultos. As frações citosólicas de ambas as áreas foram examinadas por Eletroforese Bidimensional e a fração da membrana plasmática do CI foi enriquecida e analisada por *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation* (iTRAQ). A análise por iTRAQ demonstrou uma regulação em 34% das proteínas quantificadas. Já a Eletroforese Bidimensional revelou 12% dos *spots* regulados tanto no COS quanto no CI, apresentando portanto, congruência

numérica. Embora a regulação das vias tenha exibido um padrão semelhante em ambas as áreas, apenas 13 das 71 proteínas foram reguladas em comum, o que implica em consideráveis diferenças específicas de cada área. Os autores encontraram 89% das proteínas de glicólise / gliconeogénese e do ciclo de citrato com a expressão aumentada no COS e CI, sugerindo uma maior demanda de energia na idade adulta do rato. Dezesete proteínas do citoesqueleto foram reguladas, de acordo com a reorganização morfológica entre os períodos pós natal e vida adulta. Quatorze proteínas foram reguladas exclusivamente no COS, fornecendo mais evidências para diferenças específicas de área. As diferenças nos perfis múltiplos das proteínas reguladas do COS e CI, apontaram que cada área parece submeter-se a um processo de maturação determinado. Os autores destacaram ainda, a importância da identificação de várias proteínas ligadas pela primeira vez ao desenvolvimento auditivo, como por exemplo a proteína *stathmin-1* (STMN1), sendo necessário contudo, elucidar o seu papel no desenvolvimento do COS.

Considerando que a literatura não apresenta trabalhos que correlacionem os achados clínicos auditivos a expressão diferencial de proteínas do tronco encefálico após a intoxicação por chumbo e suplementação com ferro, a análise proteômica empregada neste estudo poderá esclarecer os mecanismos moleculares da via auditiva frente ao chumbo, bem como o papel do ferro neste processo de intoxicação.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Analisar o processo maturacional do nervo auditivo e tronco encefálico, associado à expressão proteica diferencial da porção auditiva do tronco encefálico de ratos expostos ao acetato de chumbo e suplementados com sulfato ferroso.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, atendendo pelo protocolo 019/2009.

Inicialmente um projeto piloto foi realizado a fim de estabelecer a relação entre o acetato de chumbo administrado em água e a concentração de chumbo obtida no sangue dos animais. Foram estabelecidas duas dosagens de acetato de chumbo na água, 100 e 400 mg/L, representando baixa e alta exposição ao chumbo, respectivamente. Foram obtidas concentrações de chumbo no sangue dos animais em torno de 10 µg/dL e 30 µg/dL, correspondendo a valores considerados baixa e alta intoxicação por chumbo.

4.1 OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Com base nos resultados obtidos no projeto piloto, deu-se início ao estudo experimental, que foi realizado com um total de 30 ratos recém-desmamados (*Rattus norvegicus*, Wistar), oriundos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP, divididos em seis grupos de cinco animais cada, assim nomeados:

- *Controle*: composto por cinco animais que receberam apenas água de beber deionizada, além de gavagem gástrica com água deionizada a cada dois dias;
- *Experimental 1*: composto por cinco animais que receberam 100 mg/L de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ em água de beber e concomitantemente, a cada dois dias, água deionizada por gavagem gástrica;
- *Experimental 2*: composto por cinco animais que receberam 100 mg/L de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ em água de beber e concomitantemente, a cada dois dias, por gavagem gástrica, uma solução de FeSO_4 na dose de 20 mg/kg de peso corporal;
- *Experimental 3*: composto por cinco animais que receberam 400 mg/L de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ em água de beber e concomitantemente, a cada dois dias, água deionizada por gavagem gástrica;

- *Experimental 4*: composto por cinco animais que receberam 400 mg/L de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ em água de beber e concomitantemente, a cada dois dias, por gavagem gástrica, uma solução de FeSO_4 na dose de 20 mg/kg de peso corporal;
- *Experimental 5*: composto por cinco animais que receberam água de beber deionizada e uma solução de FeSO_4 na dose de 20 mg/kg de peso corporal, a cada dois dias, por meio de gavagem gástrica;

Os animais foram mantidos durante seis semanas em gaiolas metabólicas, em sala com um ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura e umidade controladas e livre acesso a uma dieta industrializada (ração) da marca Purina, que apresenta baixa concentração de chumbo em sua composição (0,36mg/kg).

A água de beber preparada pela dissolução de acetato de chumbo em água destilada e deionizada nas concentrações de 100 mg/L e 400 mg/L, foi analisada por meio de Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite.

4.2 POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DE TRONCO ENCEFÁLICO

A atividade elétrica do sistema auditivo, na porção do nervo auditivo e tronco encefálico, foi analisada por meio da pesquisa do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE).

O PEATE foi realizado em todos os animais em dois momentos do período experimental, pré e pós exposição ao chumbo, sendo que no primeiro momento os ratos estavam com 26 dias de vida e no segundo com 63 dias de vida, fato este que permitiu acompanhar o processo de maturação do nervo auditivo e tronco encefálico.

4.2.1 Preparo do animal

O PEATE foi registrado por meio de eletrodos de superfície posicionados no crânio do animal. Para o processo de colocação dos eletrodos, os ratos foram levemente sedados por meio de injeção intramuscular de Quetamina e Xilazina, a fim de evitar a movimentação durante a coleta dos potenciais. É importante ressaltar

que a medicação utilizada não interfere na obtenção do PEATE, pois se trata de um potencial exógeno.

Foi realizada a tricotomia do crânio, limpeza da pele com esfoliante da marca *Nuprep* e aplicação de pasta eletrolítica nos eletrodos de superfície da marca *Embramac*.

Os eletrodos de superfície foram acoplados ao pré-amplificador *EPA 25* e posicionados no animal da seguinte forma: eletrodo ativo em Fz, eletrodos referência posicionados em M1 e M2 (mastóide esquerda e direita), permitindo o registro ipsilateral do PEATE e eletrodo terra na pata traseira. Para iniciar a captação dos registros, os eletrodos deveriam apresentar impedância individual menor que $5k\Omega$ e impedância entre eles menor que $2k\Omega$.

4.2.2 Registro dos Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico

Foi utilizado o equipamento SMART – *Interacoustic* para a estimulação acústica e aquisição do sinal, sendo o mesmo amplificado e digitalizado.

O estímulo acústico utilizado foi do tipo clique, apresentado de forma monoaural por meio do fone de inserção 3^A , com duração de 0,1 ms, com polaridade rarefação, intensidade de 80 dBNA, taxa de apresentação de 21.1 clique/seg, e filtro passa-banda de 100-3000 Hz. A janela utilizada foi de 15 ms, incluindo 1 ms pré-estímulo, visando controlar a atividade eletroencefálica (EEG) do animal. Foram realizados dois registros na intensidade determinada para cada orelha, com promediação de 1000 estímulos, sendo considerada presença de resposta quando observada reprodutibilidade das ondas. O início do exame foi definido aleatoriamente, ora na orelha direita ora na esquerda.

Foram medidas as latências absolutas (ms) das ondas I, II, III e IV e os valores de intervalos interpicos. Neste estudo não foi considerada a onda V, porque ao contrário do observado em humanos, a ocorrência desta onda pode ser considerada atípica, mesmo em ratos normais (JEWETT; ROMANO, 1972)

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Ao final do período experimental os animais foram anestesiados com cloridato de quetamina e xilazina. A cavidade peritoneal e depois a torácica foram expostas e o coração puncionado para coleta do sangue em tubos *trace Royal blue BD Hemogard* (BD Vacutainer®, USA), que foram em seguida armazenados a -20 °C para posterior análise de chumbo. O tronco encefálico dos animais foi dissecado, pesado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C, para posterior análise proteômica, bem como da concentração de chumbo no tecido.

4.4 ANÁLISES DE CHUMBO NO SANGUE TOTAL E TRONCO ENCEFÁLICO

As análises de chumbo no sangue e no tecido foram realizadas 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 isto, 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), conforme descrito por Batista et al. (2009). Para as amostras de tecido e materiais de referência certificados (CRMs), aproximadamente 75 mg foram pesados em tubos Falcon® de polipropileno de 15 mL (Becton Dickinson). Então, um mL de solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 50% (v/v) foi adicionado às amostras e incubado à temperatura ambiente por 12 h num homogenizador rotacional. Após solubilização, o volume foi acertado para 10 mL com uma solução diluída contendo ácido nítrico (HNO₃) 0,5% (v/v), 10 µg/L Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). Padrões de calibração analíticos foram preparados na faixa de concentração entre zero e 20 µg/L, num diluente contendo

TMAH 5% (v/v), HNO_3 0,5% (v/v), 10 $\mu\text{g/L}$ Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). O limite de detecção para o chumbo foi de 0.0066 $\mu\text{g/L}$.

Para as amostras de sangue, 200 μL de cada amostra foram colocadas em tubos Falcon® de polipropileno de 15 mL (Becton Dickinson), acertando-se para volume final de 10 mL (diluição de 50 vezes) com uma solução contendo HNO_3 0,5% (v/v), 10 $\mu\text{g/L}$ Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). Padrões de calibração analíticos foram preparados na faixa de concentração entre zero e 20 $\mu\text{g/L}$, 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 chumbo foi assegurado por meio da análise de materiais de referência do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia americano (NIST 955c). Em adição, 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 traço de elementos no sangue) foram também analisados.

4.5 ANÁLISE PROTEÔMICA

4.5.1. *Preparo da amostra*

Os troncos encefálicos previamente congelados e armazenados a -80°C foram pesados e transferidos individualmente para um tubo (Nalgene) e triturados com auxílio de almofariz e pistilo em nitrogênio (N_2) líquido, pois a baixa temperatura promovida por este evita a degradação das proteínas. Posteriormente, com as amostras devidamente homogenizadas, foi adicionado tampão de lise contendo uréia 7 mol/L, tiouréia 2 mol/L, CHAPS 4%, DTT 1%, anfólitos carregadores 0,5% pH 3-10 e coquetel de inibidores de protease, e posteriormente incubados em gelo por 1 h. Após incubação, o homogenato foi centrifugado a 8.000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado (GE-HEALTHCARE, 2004).

O excesso de sais, açúcares, ácidos nucleicos e lipídeos foram removidos do sobrenadante utilizando o *kit PlusOne 2D Clean-up kit* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) cuja função é auxiliar na remoção de contaminantes e tornar o gel mais limpo. Para cada volume da amostra (200 µL), foi adicionado três vezes o volume de precipitante (600 µL). Após agitar em vórtex por 30 segundos, incubou-se em gelo (4°C) por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 600 µL de co-precipitante na mistura anterior, agitou-se em vórtex por 10 segundos e em seguida, os tubos foram centrifugados a 8.000 *g* por 10 minutos a 4°C e, ao final da centrifugação, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e descartado. Ao *pellet* foram adicionados 80 µL de co-precipitante e posteriormente incubados em gelo por 5 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos e o sobrenadante removido. Foram pipetados 100 µL de água deionizada sobre o *pellet* e os tubos foram agitados em vórtex para dispersar o *pellet*. Adicionou-se em cada volume da amostra original 1 mL de *wash buffer* pré-resfriado e 5 µL de *wash additive*, agitando novamente no vórtex por 30 segundos até que o *pellet* estivesse totalmente disperso, sem dissolver. Os tubos foram incubados a -20 °C por 1 hora, agitando em vórtex por 30 segundos, a cada 10 minutos e então centrifugados a 8.000 x *g* por 10 min. O sobrenadante foi removido e descartado. Foi adicionado 1 mL de acetona 90% e agitado por 30 segundos até o *pellet* estivesse totalmente disperso. O sobrenadante foi removido e descartado e o *pellet* deixado secar até se tornar translúcido (sem ultrapassar 5 min, de acordo com instruções do fabricante). Para finalizar o processo de precipitação e limpeza das amostras, o *pellet* foi ressuspenso em 200 µL de solução de reidratação contendo uréia 7 mol/L, tiouréia 2 mol/L, CHAPS 2%, DTT 18,2 mmol/L, anfólito carreador pH 3-10 0,5% e 0,002 % de azul de bromofenol (GE HEALTHCARE, 2004).

A concentração de proteínas totais foi obtida utilizando-se o kit *Quick Start™ Bradford Protein Assay* (Bio-rad, Hercules, CA, EUA) baseado no método de Bradford (1976). Para quantificação as amostras foram analisadas em triplicata, sendo que para cada reação utilizaram-se 5 µL de amostra e 250 µL do reagente de coloração e após incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, as absorbâncias foram determinadas a 595 nm em espectrofotômetro. As concentrações proteicas foram calculadas por meio de comparação com uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de proteína de soro bovino (BSA). Seguidamente à quantificação, cerca de 200 µg de proteínas de cada uma das

amostras de cada grupo foram combinadas para formar um *pool* por grupo, totalizando 6 amostras, a serem carregadas na eletroforese bidimensional. Tal procedimento foi realizado para minimizar a variabilidade individual (TILTON et al., 2007).

Tabela 1. Dosagem de proteínas do homogenato de tronco encefálico e volume de amostra utilizado para obtenção do *pool*

Grupos	A ^{595 nm}	[proteína] µg/mL	Vol. (µL) equivalente a 200 µg
Controle	0,952	10012,2	20
Experimental 1	0,617	5798,6	34,5
Experimental 2	0,845	34014,8	5,9
Experimental 3	0,743	28969,7	6,9
Experimental 4	0,718	27763,7	7,2
Experimental 5	0,397	11939,2	16,8

4.5.2 Eletroforese bi-dimensional

4.5.2.1 Primeira Dimensão - Focalização Isoelétrica

A fim de separar as proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), as amostras foram submetidas à focalização isoelétrica (IEF). Para isto, 200 µg de proteína (conforme tabela 1) foram misturadas ao tampão de reidratação para o volume final de 450 µL. Em seguida, este volume foi transferido para as canaletas na bandeja de reidratação, e posteriormente as tiras IPG de 24 cm com pH 3–10 (GE Healthcare) foram posicionadas sobre o tampão de reidratação contendo as proteínas, sendo em seguida, cobertas com o óleo mineral ultrapuro (*Cover Fluid*, GE Healthcare) e submetidas a processo de reidratação durante 14 horas a 20°C. A focalização isoelétrica foi realizada no sistema *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), apresentado na figura 3, 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 3. *Ettan IPGphor 3* e o *Ettan IPGphor Manifold* (GE Healthcare) onde foi realizada a focalização isoeletrica.

4.5.2.2.Segunda Dimensão - SDS-PAGE

As tiras foram removidas do Ettan IPGphor 3, lavadas com tampão Laemmli (LAEMMLI, 1970) concentrado uma vez e em seguida, transferidas para tubos contendo 10 mL de solução tampão de equilíbrio (uréia 6 mol/L, Tris-HCl 75 mmol/L, Glicerol 29,3% (v/v), SDS 2% (m/v), azul de bromofenol 0,002% (m/v)) acrescido de 1% (m/v) DTT e deixadas equilibrar por 20 minutos. Posteriormente as tiras foram submetidas a um segundo equilíbrio, desta vez, acrescida a solução de equilíbrio 2,5% (m/v) de iodoacetamida (IAA) por mais 20 minutos.

O processo de eletroforese de segunda dimensão foi iniciado com o término das etapas de equilíbrio das fitas, sendo estas posicionadas em gel vertical homogêneo de 12,5% (m/v) de acrilamida (255 mm X 200 mm X 1,5 mm) tanto as fitas quanto o padrão de peso molecular de faixa ampla (14 a 200 KD, *Broad range molecular weight*, Bio-rad, no volume de 3 μ L) e fixadas no gel com uma solução pré-aquecida de 0,5% (m/v) de agarose solubilizada em tampão de corrida Laemmli (1970). A separação eletroforética das proteínas foi realizada no sistema *Ettan DALTsix* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), conforme exibido na figura 4, em dois estágios, sendo utilizado no primeiro uma corrente fixa de 80 V, 15 mA/gel e 100 W por 1 h, para migração das proteínas da fita IPG para o gel e no segundo estágio a corrida foi conduzida com corrente constante de 500 V, 60 mA/gel e 100 W a 20°C

durante aproximadamente 6 h, até que o azul de bromofenol atingisse o fundo do gel.

Figura 4. Segunda dimensão em géis SDS-PAGE 12,5% (200 mm X 255 mm X 1,5 mm), no sistema *Ettan DALTsix* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

4.5.3 Visualização e análise de imagens da eletroforese bi-dimensional

Finalizada a eletroforese bidimensional, o gel foi colocado em solução fixadora (Ácido fosfórico 1,3% (v/v), metanol 20% (v/v) e água deionizada) durante uma hora, visando evitar a mobilidade das proteínas no gel. Os géis foram lavados com água deionizada e para a visualização dos *spots*, foram corados por meio de uma solução desenvolvida por Neuhoﬀ et al. (1988) e modiﬁcada por Candiano et al. (2004), contendo 10% (v/v) de ácido fosfórico, 10% (m/v) de sulfato de amônio, 0,12% (m/v) de *Coomassie Brilliant Blue G-250* (USB, Cleveland, OH, EUA) e 20% (v/v) de metanol, durante 12 horas, sendo repetido o processo por mais 24 horas, totalizando 36 horas de coloração. Concluída esta etapa, os géis foram lavados com água deionizada e armazenados em solução de ácido acético 5%, sendo a solução renovada durante 6 dias.

Os géis corados foram digitalizados por meio de escaneamento com resolução de 300 dpi, utilizando o ImageScanner III (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e analisados com o Software ImageMaster 2D Platinum versão 7.0 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

Para a detecção e análise dos *spots* de proteína e a determinação do seu volume foram estabelecidos os seguintes parâmetros: *smooth* = 4, área mínima = 5 e saliência = 140. Para cada grupo, foi escolhido como gel de referência o que apresentasse maior número de *spots*, e em seguida realizado tanto manualmente quanto de forma automática pelo programa o *match gels*, ou seja, uma comparação entre os *spots* das réplicas de cada grupo. Realizadas as correções necessárias, promoveu-se a análise das classes, que forneceu a diferença estatística entre os grupos experimentais.

O programa estimou ainda os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada *spot*. Para determinar as diferenças na expressão proteica, foram consideradas as alterações no valor de porcentagem (%) de volume. O uso da % de volume implicou na normalização do *spot*, pois para calcular a % de volume, considerou-se o volume total de todos os *spots* no gel. Assim, foram minimizadas as variações decorrentes da quantidade de proteína aplicada e do procedimento de coloração.

Para verificar a diferença estatística entre os *spots* foi realizado o teste ANOVA com nível de significância estabelecido em 5%.

4.5.4 Preparo das amostras para a espectrometria de massas

Após análise pelo *software*, os *spots* de interesse foram recortados dos géis e preparados para espectrometria de massas de acordo com metodologia proposta por Andrade (2006). As triplicatas de gel de cada grupo foram posicionadas sobre placas de vidro e com o auxílio de ponteiras universais de 1000 µL e 200 µL, os *spots* foram excisados em segmentos de aproximadamente 1 mm³, transferidos para tubos de 2,0 mL contendo 200 µL de ácido acético 5% (conforme demonstrado pela figura 5) e armazenados a 4 °C até o passo seguinte .

Figura 5. Recorte dos *spots* selecionados para espectrometria de massa. Os *spots* provenientes das triplicatas dos géis de cada grupo foram inicialmente captados com uma ponteira plástica. Depois, cortados em fragmentos de cerca 1 mm³ com lâmina de bisturi.

Para a remoção total do corante, os segmentos de gel foram lavados no mínimo por três vezes, em uma solução contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AMBIC) 25 mmol/L por 30 minutos. Posteriormente, 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.

Uma vez desidratados, os *spots* foram submetidos à redução e alquilação. Para isso, foram reidratados com DTT 20 mmol/L em bicarbonato de amônio (AMBIC) 50 mmol/L e incubados por 40 minutos a 56°C. O excesso de líquido foi removido e substituído por iodoacetamida (IAA) 55 mmol/L em AMBIC 50 mmol/L. Após 30 minutos no escuro, em temperatura ambiente, o líquido foi novamente removido, os fragmentos lavados em AMBIC 25 mmol/L e em seguida desidratados em ACN 100%. A ACN foi então 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. Em seguida, foram adicionados 50 µL de AMBIC 25 mM para total cobertura dos *spots*, que permaneceram a 37°C por 14 h. Finalizadas as 14 h, a ação da tripsina foi

interrompida pela adição de 15 µL 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 duas lavagens com ACN 100%, a 40°C sob sonicação. A solução contendo os peptídeos extraídos foi então submetida à secagem em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) à temperatura ambiente, por 4 horas.

Visando o preparo das amostras para o sequenciamento, os peptídeos foram dessalinizados manualmente utilizando para isto *Zip-Tip* (Millipore). As amostras foram ressuspensas em 10 µL de solução ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) preparada em H₂O ultrapura. Em seguida, as *Zip-Tips* foram acopladas em uma pipeta de 10 µL e em seguida, por meio de pipetagem, equilibradas com três soluções: 10 µL de solução de TFA 0,1% (v/v) preparada em ACN 100% (v/v), seguido de 10 µL da solução TFA 0,1% (v/v) preparada em ACN 50% (v/v), e por fim, 10 µL da solução de TFA 0,1% (v/v) preparada em H₂O ultrapura. A última solução foi descartada, e em seguida 10 µL da amostra foram aspirados para ligação à coluna C18. Seguidamente, foi realizada uma lavagem com 10 µL de solução TFA 0,1% (v/v) preparada em 5% (v/v) de metanol. Após a lavagem, as amostras foram eluídas com 10 µL de solução de TFA 0,1% (v/v) em ACN 50%.

4.5.5 Sequenciamento das proteínas

Para a identificação das proteínas, as amostras liofilizadas foram ressuspensas em 2 µL ACN: água (50:50) + 0,1% de TFA, que foram transferidas para a placa de MALDI, e em seguida acrescido 1 µL da matrix α-ciano-4-hidroxicinâmico sobre a amostra.

As placas foram transferidas para o espectrômetro de massas 5800 MALDI TOF/TOF da Absciex, operado com fonte de ionização do tipo MALDI, no modo reflector positivo. Para a leitura no modo MS foi utilizado 400 Hz, com fonte de ionização de 3400 kvolts. Já para o modo MS/MS adotou-se a referência de 1000 Hz e 4700 kvoltz para a fonte de ionização, sendo aplicados 1000 shots/spectro, no modo MS e 2500 shots/spectro para o modo MS/MS. A análise foi realizada no

modo automático, juntamente com calibração interna, utilizando-se o CAL Mix1 (ABSciex).

O programa utilizado para obtenção dos resultados da espectrometria foi o *ABSciex Maldi Tof/Tof Series Explorer* (version 4.1.0) e o programa *Protein Pilot* com o *Mascot*, utilizado para fazer as análises dos conjuntos de dados.

4.5.6 Análise das sequências peptídicas

A identificação dos tamanhos dos fragmentos da clivagem trípica foi realizada por meio da ferramenta de busca Mascot (www.matrixscience.com) disponível na base de dados do NCBI.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados, foi utilizado o *software GraphPad InStat* (versão 3.0 para *Windows*, *GraphPad software Inc.* La Jolla, CA, EUA). Inicialmente foi verificada a normalidade (teste de *Kolmogorov-Smirnov*) e homogeneidade dos dados (teste de *Bartlett*), para a seleção do teste estatístico apropriado.

As variáveis peso inicial e final dos animais passaram no teste de normalidade e homogeneidade, sendo analisadas por ANOVA, seguida pelo teste de *Tukey* para comparações individuais. Os dados referentes ao consumo de água, à concentração de chumbo no tronco encefálico e no sangue não passaram no teste de homogeneidade, sendo então analisadas pelo teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de *Dunn* para comparações individuais. Foi utilizada ainda a regressão linear para analisar a correlação entre a concentração de chumbo no sangue e no tronco encefálico.

Para a realização da análise estatística do PEATE utilizou-se o *software SPSS* versão 13.0. O teste *t* pareado foi utilizado para a comparação dos resultados obtidos entre orelha direita e esquerda. O teste estatístico ANOVA com modelo de dois fatores com medidas repetidas foi adotado para avaliar três variáveis: efeito tempo (pré e pós-intoxicação), efeito interação (tempo x grupos) e efeito grupo (comparados separadamente nos momentos pré e pós-intoxicação). A análise descritiva do PEATE englobou a média e o desvio padrão. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CONSUMO DE ÁGUA

O consumo diário de água (mL) dos grupos controle e experimentais durante o período de seis semanas está apresentado na tabela 2. A partir da análise do teste Kruskal-Wallis pode ser observada diferença significativa entre os grupos ($KW=158,75$, $p<0,0001$). Os maiores consumos de água (em torno de 14 mL/dia) foram observados para os grupos Controle e Experimental 5, os quais não diferiram significativamente entre si. A adição de acetato de chumbo à água reduziu significativamente a ingestão da mesma, de maneira dose-resposta, de modo que apenas o grupo Experimental 2 não diferiu significativamente do controle e do grupo que recebeu apenas Experimental 5.

Tabela 2. Consumo médio ($\pm$ DP) diário de água dos animais dos grupos controle e experimentais.

Grupos	Consumo médio diário de água (mL)
Controle	14,7 $\pm$ 4,0 ^a
Experimental 1	13,2 $\pm$ 2,1 ^{bc}
Experimental 2	13,9 $\pm$ 3,1 ^{ab}
Experimental 3	12,8 $\pm$ 2,5 ^c
Experimental 4	10,9 $\pm$ 2,9 ^d
Experimental 5	14,5 $\pm$ 2,9 ^a

Médias seguidas por letras distintas apresentam diferença significativa (Kruskal-Wallis e Dunn, $p<0,05$, $n=5$).

5.2 MASSA CORPORAL

A Tabela 3 contempla os dados referentes à massa corporal média e o desvio padrão dos animais dos diferentes grupos. Os animais foram pesados a cada dois dias, sendo considerados, para esta análise, os dados do primeiro e último dia do experimento, correspondendo ao peso inicial e final dos animais, respectivamente. Conforme pode ser observado, todos os animais apresentaram ganho de massa corporal durante o período experimental. Os pesos iniciais foram bastante parecidos, não havendo diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $F=2,083$; $p=0,103$). O mesmo foi obtido para os pesos finais (ANOVA, $F=1,655$; $p=0,188$).

Tabela 3. Peso médio ($\pm$ DP) inicial e final dos animais dos grupos controle e experimentais.

Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	100,40 $\pm$ 4,67	272,20 $\pm$ 19,89
Experimental 1	97,00 $\pm$ 8,46	260,40 $\pm$ 20,11
Experimental 2	105,00 $\pm$ 5,48	271,50 $\pm$ 16,20
Experimental 3	102,80 $\pm$ 3,56	294,80 $\pm$ 43,51
Experimental 4	96,60 $\pm$ 2,19	281,80 $\pm$ 12,72
Experimental 5	98,00 $\pm$ 5,00	281,80 $\pm$ 30,83

Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p=0,103$ e $p=0,188$ para os pesos inicial e final, respectivamente $n=5$).

5.3 ANÁLISE DE CHUMBO NO SANGUE TOTAL E TRONCO ENCEFÁLICO

A tabela 4 apresenta a concentração média de chumbo no sangue total ($\mu\text{g/dL}$) e no tronco encefálico (ng/g) dos animais dos grupos controle e experimentais.

Foi observado um efeito dose-resposta no que diz respeito à concentração de chumbo no sangue e uma redução na concentração do íon metálico no sangue quando foi administrado o sulfato ferroso. O teste ANOVA, após transformação logarítmica, indicou diferença significativa entre os grupos ($F=191,15$, $p<0,0001$). As menores concentrações de chumbo no sangue foram observadas nos grupos Controle e Experimental 5, que não diferiram significativamente entre si. Valores intermediários foram encontrados para o grupo de Experimental 1, que diferiu significativamente dos anteriores e também do grupo de Experimental 3. A administração concomitante de sulfato ferroso aos grupos Experimentais 1 e 3 foi capaz de reduzir as concentrações de chumbo no sangue em cerca de 65% e 50% respectivamente, embora esta diferença só tenha sido significativa para o grupo de Experimental 1, com os demais grupos.

Com relação à concentração de chumbo no tronco encefálico, foi observada uma tendência similar, confirmada pela correlação positiva e significativa entre as variáveis ($r^2=0,905$, $p<0,0001$). Detectou-se diferença estatisticamente significativa somente entre os grupos Controle e Experimental 3 e entre os grupos Experimental 5 e Experimental 3 e 4. Foi observada ainda redução da concentração de chumbo no tronco encefálico dos animais que receberam administração concomitante de

sulfato ferroso (Experimental 2 e 4), contudo não houve diferença estatisticamente significativa de seus pares não suplementados (Experimental 1 e 3).

Tabela 4. Concentração média ($\pm$ DP) de chumbo no sangue e tronco encefálico dos animais dos grupos controle e experimentais.

Grupos	[Chumbo] sangue ($\mu\text{g/dL}$)	[Chumbo] tronco encefálico (ng/g)
Controle	0,19 $\pm$ 0,10 ^d	11,18 $\pm$ 4,42 ^{ac}
Experimental 1	10,56 $\pm$ 5,29 ^b	27,21 $\pm$ 7,03 ^{abc}
Experimental 2	3,89 $\pm$ 2,04 ^c	19,53 $\pm$ 9,41 ^{abc}
Experimental 3	48,39 $\pm$ 8,66 ^a	259,88 $\pm$ 76,53 ^b
Experimental 4	25,85 $\pm$ 3,61 ^a	208,87 $\pm$ 91,10 ^{ab}
Experimental 5	0,13 $\pm$ 0,02 ^d	8,54 $\pm$ 1,34 ^c

Médias seguidas por letras distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os grupos (ANOVA após transformação logarítmica, $p < 0,0001$, $n = 5$).

5.4 ANÁLISE DAS ONDAS I, II, III E IV DO PEATE

O Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov mostrou a distribuição normal das variáveis obtidas neste estudo ($p < 0,05$). Na análise das ondas I, II, III e IV do PEATE pré-intoxicação e pós-intoxicação por chumbo, o fator orelha não foi considerado individualmente, visto que ao comparar as orelhas direita e esquerda (Teste t pareado), não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

A figura 6 apresenta um registro do PEATE de um animal pertencente ao grupo Experimental 1, obtido nos momentos pré e pós-intoxicação, onde podem ser observadas as ondas I, II, III e IV.

Em seguida, as tabelas 5 e 6 apresentam a média e o desvio padrão das latências absolutas das ondas I, II, III e IV e dos intervalos interpicos I-II, II-III, III-IV e I-IV respectivamente, nos momentos pré e pós-intoxicação por chumbo para os grupos controle e experimentais.

Figura 6. Registro do PEATE de um animal do grupo Experimental 1, obtido nos momentos pré e pós-intoxicação, onde podem ser observadas as ondas I, II, III e IV.

Tabela 5. Média e desvio padrão das Latências absolutas (ms) das ondas I, II, III e IV, nos momentos pré e pós-intoxicação por acetato de chumbo, para os grupos controle e experimentais.

PRÉ-INTOXICAÇÃO									PÓS-INTOXICAÇÃO							
Grupos	Onda I		Onda II		Onda III		Onda IV		Onda I		Onda II		Onda III		Onda IV	
	x	dP	x	dP	x	dP	x	dP	x	dP	x	dP	x	dP	x	dP
Controle	1,388	0,062	2,566	0,194	3,418	0,174	4,895	0,154	1,236	0,093	2,109	0,039	2,882	0,133	4,128	0,094
Experimental 1	1,292	0,153	2,278	0,211	3,101	0,146	4,594	0,270	1,167	0,051	2,079	0,084	2,888	0,115	4,091	0,184
Experimental 2	1,231	0,161	2,328	0,250	3,067	0,287	4,490	0,431	1,230	0,064	2,038	0,129	2,753	0,120	3,850	0,172
Experimental 3	1,324	0,123	2,345	0,116	3,181	0,168	4,582	0,150	1,197	0,154	2,106	0,158	2,827	0,195	3,987	0,259
Experimental 4	1,378	0,080	2,539	0,056	3,340	0,098	4,753	0,362	1,110	0,036	2,007	0,073	2,692	0,134	3,854	0,235
Experimental 5	1,270	0,047	2,451	0,118	3,152	0,138	4,822	0,066	1,195	0,138	2,118	0,084	2,844	0,086	4,017	0,125

Tabela 6. Média e desvio padrão dos Intervalos interpicos (ms) I-II, II- III, III-IV e I-IV, nos momentos pré e pós-intoxicação por chumbo, para os grupos controle e experimentais.

	PRÉ-INTOXICAÇÃO								PÓS-INTOXICAÇÃO							
	Intervalo Interpico (ms)								Intervalo Interpico (ms)							
	I-II		II-III		III-IV		I-IV		I-II		II-III		III-IV		I-IV	
	x	dP	X	dP	x	dP	x	dP	x	dP	x	dP	x	dP	x	dP
Controle	1,178	0,137	0,852	0,196	1,477	0,154	3,507	0,109	0,873	0,094	0,773	0,109	1,246	0,106	2,892	0,098
Experimental 1	0,986	0,064	0,823	0,077	1,493	0,143	3,302	0,142	0,912	0,056	0,809	0,042	1,203	0,091	2,924	0,160
Experimental 2	1,097	0,099	0,739	0,130	1,423	0,161	3,259	0,328	0,808	0,095	0,715	0,096	1,097	0,101	2,620	0,171
Experimental 3	1,021	0,054	0,836	0,087	1,401	0,075	3,258	0,056	0,909	0,036	0,721	0,087	1,160	0,078	2,790	0,122
Experimental 4	1,161	0,063	0,801	0,096	1,413	0,291	3,375	0,342	0,897	0,051	0,685	0,067	1,162	0,104	2,744	0,201
Experimental 5	1,181	0,125	0,701	0,131	1,670	0,158	3,552	0,072	0,923	0,055	0,726	0,022	1,173	0,081	2,822	0,040

A análise estatística referente ao efeito do tempo, grupo, bem como interação entre ambos, tanto para as latências quanto para os valores de intervalos interpicos do PEATE, encontram-se descritas abaixo. Foi observada, no Efeito Tempo, diferença estatisticamente significativa para todas as ondas e intervalos interpicos quando comparados os momentos pré e pós-intoxicação. Para o Efeito Interação foi verificada diferença estatisticamente significativa no valor de intervalo interpico I-II para os grupos Experimental 1 e 3, havendo uma menor redução quando comparados aos demais grupos. Já para o Efeito Grupo, no período pré-intoxicação, foi observada redução significativa tanto na latência absoluta da onda III para o grupo Experimental 2 quando comparado ao Controle, quanto para o valor de intervalo interpico I-II para o grupo Experimental 1 quando comparado ao Experimental 5. No período pós-intoxicação, foi observada diferença significativa para o valor de intervalo interpico I-IV, que apresentou uma redução para o grupo Experimental 2, quando comparado ao seu correspondente não suplementado (Experimental 1).

Tabela 7. Efeito tempo, interação e grupo das latências absolutas das ondas e dos valores de intervalos interpicos do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico

		ONDAS				INTERPICOS		
		I	II	III	IV	I-II	II-III	III-IV
EFEITO		p	p	p	p	p	p	P
Tempo		0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,025*	0,000*
Interação		0,203	0,143	0,074	0,439	0,049* ¹	0,383	0,249
Grupo	Pré	0,237	0,066	0,030* ²	0,175	0,011* ³	0,384	0,192
	Pós	0,397	0,468	0,189	0,125	0,131	0,200	0,033* ⁴

*p < 0,05. **1-** Experimental 1 e 3 diminuem menos em comparação aos demais grupos; **2-** Controle x Experimental 2; **3-** Experimental 5 x Experimental 1; **4-** Experimental 1 x Experimental 2

5.5 ANÁLISE DAS IMAGENS

A figura 7 apresenta a triplicata representativa dos géis bidimensionais das proteínas de tronco encefálico de ratos dos grupos controle e experimentais, utilizada para a análise comparativa no software.

Figura 7. Triplicata representativa dos géis bidimensionais de proteínas de tronco encefálico de ratos dos grupos controle e experimentais.

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* proteicos, para cada grupo, controle e experimentais, conforme demonstrado na figura 8.

Figura 8. Número total de *spots* proteicos detectados por grupo, com base na análise das triplicatas dos géis realizada por meio do programa *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare).

5.6 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS

Foi realizada a análise comparativa entre o grupo controle e grupos experimentais, bem como entre os grupos experimentais, a fim de se estabelecer o perfil quantitativo dos *spots* proteicos detectados do tronco encefálico, conforme apresentado na tabela 8. No anexo 3 encontram-se as tabelas referentes à diferença significativa de expressão de todas as análises comparativas realizadas.

Tabela 8. Perfil quantitativo dos *spots* proteicos detectados do tronco encefálico, estabelecido a partir da análise comparativa entre os grupos.

Comparações entre grupos	<i>Spots</i> coincidentes (n)	<i>Spots</i> coincidentes com diferença de expressão (n)	<i>Spots</i> exclusivos do grupo ■ (n)	<i>Spots</i> exclusivos do grupo ▲ (n)
Controle ■ x Experimental 1 ▲	498	118	48	78
Controle ■ x Experimental 2 ▲	478	49	68	35
Controle ■ x Experimental 3 ▲	428	51	118	15
Controle ■ x Experimental 4 ▲	376	70	170	12
Controle ■ x Experimental 5 ▲	464	49	82	26
Experimental 1 ■ x Experimental 2 ▲	476	105	99	37
Experimental 1 ■ x Experimental 3 ▲	413	108	162	30
Experimental 1 ■ x Experimental 4 ▲	364	114	211	24
Experimental 3 ■ x Experimental 4 ▲	362	22	81	26
Experimental 5 ■ x Experimental 2 ▲	445	49	44	68
Experimental 5 ■ x Experimental 4 ▲	371	32	118	17

5.7 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

No presente estudo foram submetidos à análise de identificação, por meio de espectrometria de massas, 115 *spots*. Destes, 109 *spots* continham proteínas que apresentaram similaridade com o banco de dados SWISS PROT.

Para esta análise os espectros de massas encontrados foram verificados individualmente, utilizando o algoritmo do programa MASCOT, cujo resultado está 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%).

Neste sentido, adotou-se como critério um valor limite igual ou superior a 50, conforme exemplificado na figura 9, que apresenta o gráfico referente ao *spot* Controle 139.

Figura 9. Gráfico obtido a partir do MASCOT para o *spot* Controle 139. As barras presentes na área sombreada em verde não foram considerados *matches* significativos, uma vez que estão abaixo do valor limite. Porém, outro *match* foi considerado significativo e provavelmente apresenta coincidência com alguma proteína.

Dos 109 *spots* identificados, 25 *spots* atenderam aos critérios de inclusão estabelecidos, gerando a identificação de 29 proteínas. Destas, 22 (75,85%) pertenciam à análise da comparação Controle x Experimental 1, quatro (13,80%) pertenciam à análise da comparação Controle x Experimental 3, uma (3,45%)

pertencia à análise da comparação Controle x Experimental 2, uma (3,45%) pertencia à análise da comparação Controle x Experimental 5 e uma proteína (3,45%) era exclusiva do grupo Experimental 1 quando comparadas aos demais grupos, conforme será apresentado nas tabelas e figuras a seguir.

A figura 10 apresenta os 17 *spots* analisados com base na comparação entre o grupo **Controle** e **Experimental 1**, sendo destacado um *spot* que teve sua expressão aumentada no grupo experimental em relação ao controle. Em seguida, a tabela 9 apresenta as 22 proteínas identificadas no tronco encefálico de ratos diferentemente expressas entre os grupos controle e Experimental 1 com base nos 17 *spots* analisados.

Figura 10. Imagem referente aos 17 *spots* identificados com base na comparação entre os grupos Controle x Experimental 1, onde a imagem superior representa o grupo controle e a inferior o grupo experimental.

Tabela 9. Proteínas identificadas no tronco encefálico de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental 1.

Uniprot ID	Proteína	Função	PM (kDa) / PI (teórico)	PM (kDa) / PI (experimental)	Score	Dif. de expressão (p < 0,05)
P62738 (ACTA_RAT)	<i>Actin, aortic smooth muscle</i>	Estrutura e organização	42,0 / 5,24	46 / 5,16	210	↑ no Experimental 1
P60711 (ACTB_RAT)	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	Estrutura e organização	41,7 / 5,29	46 / 5,16	298	↑ no Experimental 1
P63259 (ACTG_RAT)	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	Estrutura e organização	41,7 / 5,31	46 / 5,16	298	↑ no Experimental 1
P63269 (ACTH_RAT)	<i>Actin, gamma-enteric smooth muscle</i>	Estrutura e organização	41,8 / 5,31	46 / 5,16	210	↑ no Experimental 1
P68035 (ACTC_RAT)	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	Estrutura e organização	42,0 / 5,23	46 / 5,16	225	↑ no Experimental 1
P68136 (ACTS_RAT)	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	Estrutura e organização	42,0 / 5,23	46 / 5,16	225	↑ no Experimental 1
P31399 (ATP5H_RAT)	<i>ATP synthase subunit d, mitochondrial</i>	Metabolismo	18,7 / 6,16	24 / 6,20	91	↑ no Experimental 1
O88989 (MDHC_RAT)	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	Metabolismo	36,4 / 6,16	37 / 6,31	82	↓ no Experimental 1
P07335 (KCRB_RAT)	<i>Creatine kinase B-type</i>	Metabolismo	42,7 / 5,39	50 / 5,48	270	↑ no Experimental 1
P04764 (ENOA_RAT)	<i>Alpha-enolase</i>	Metabolismo	47,1 / 6,16	52 / 4,98	81	↓ no Experimental 1
P15429 (ENOB_RAT)	<i>Beta-enolase</i>	Metabolismo	47 / 7,08	85 / 4,96	77	↓ no Experimental 1
O35244 (PRDX6_RAT)	<i>Peroxiredoxin-6</i>	Proc. Celulares	24,8 / 5,64	26 / 5,96	141	↓ no Experimental 1

P07895 (SODM_RAT)	<i>Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial</i>	Proc. Celulares	24,6 / 8,96	24 / 8,39	68	↓ no Experimental 1
P07323 (ENOG_RAT)	<i>Gamma-enolase</i>	Proc. Celulares	47,1 / 5,03	52 / 4,98	92	↓ no Experimental 1
Q8CJ99 (SCLT1_RAT)	<i>Sodium channel and clathrin linker 1</i>	Proc. Celulares	80,3 / 5,98	72 / 5,25	51	↓ no Experimental 1
P23565 (AINX_RAT)	<i>Alpha-internexin</i>	Proc. Celulares	56,1 / 5,20	72 / 5,25	176	↓ no Experimental 1
Q9Z2L0 (VDAC1_RAT)	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 1</i>	Transporte	30,7 / 8,62	35 / 9,14	88	↑ no Experimental 1
P14659 (HSP72_RAT)	<i>Heat shock-related 70 kDa protein 2</i>	Vias de Informação	69,6 / 5,50	79 / 5,39	126	↓ no Experimental 1
P10111 (PPIA_RAT)	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	Vias de Informação	17,8 / 8,34	16 / 8,69	56	↓ no Experimental 1
P34058 (HS90B_RAT)	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	Vias de Informação	83,2 / 4,96	94 / 4,94	107	↑ no Experimental 1
P82995 (HS90A_RAT)	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	Vias de informação	84,8 / 4,93	94 / 4,87	94	↑ no Experimental 1
P63018 (HSP7C_RAT)	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	Vias de Informação	70,8 / 5,37	79 / 5,39	148	↓ no Experimental 1

PM: peso molecular; PI: ponto isoelétrico

Com base na comparação entre grupo **Controle** e **Experimental 2**, uma proteína foi identificada, tendo apresentado score de 169 no programa MASCOT. A *Dihydropyrimidinase-related protein 2* (P47942 (DPYL2_RAT)), apresenta Peso Molecular e Ponto Isoelétrico teóricos de 62,2 kDa e 5,95 kDa e Peso Molecular e Ponto Isoelétrico experimentais de 79 kDa / 6,39 kDa, e por apresentar função relacionada à defesa do organismo e à regulação intracelular, foi classificada na categoria Processos Celulares. Com relação à diferença de expressão, houve diminuição significativa de sua expressão (0,038) no grupo Experimental 2 quando comparado ao controle, conforme pode ser observado na figura 11.

Figura 11. Imagem referente ao *spot* identificado com base na comparação entre os grupos Controle x Experimental 2, onde a imagem superior representa o grupo Controle e a inferior, o grupo experimental.

A figura 12 apresenta os 5 *spots* analisados com base na comparação entre o grupo **Controle** e **Experimental 3**, sendo destacado um *spot* que teve sua expressão diminuída no grupo experimental em relação ao controle. A tabela 10, apresentada na sequência, contém as 4 proteínas identificadas no tronco encefálico de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental 3, com base nos 5 *spots* analisados.

Figura 12. Imagem referente aos 5 *spots* identificados com base na comparação entre os grupos Controle x Experimental 3, onde a imagem superior representa o grupo controle, e a inferior, o grupo experimental.

Tabela 10. Proteínas identificadas no tronco encefálico de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental 3.

Uniprot ID	Proteína	Função	PM (kDa) / PI (teórico)	PM (kDa) / PI (experimental)	Score	Dif. de expressão (p < 0,05)
P15999 (ATPA_RAT)	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	Metabolismo	59,7 / 9,22	66 / 5,13	51	↓ no Experimental 3
P48500 (TPIS_RAT)	<i>Triosephosphate isomerase</i>	Metabolismo	26,8 / 6,89	29 / 7,61	58	↑ no Experimental 3
P47819 (GFAP_RAT)	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>	Proc. Celulares	49,9 / 5,35	64 / 5,20	217	↓ no Experimental 3
P06761 (GRP78_RAT)	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	Vias de Informação	72,3 / 5,07	90 / 4,73	93	↑ no Experimental 3

PM: peso molecular; PI: ponto isoelétrico

Com base na comparação entre grupo **Controle** e **Experimental 5**, uma proteína foi identificada, tendo apresentado score de 87 no programa MASCOT. A *Neurofilament light polypeptide* (P19527 (NFL_RAT)), apresenta Peso Molecular e Ponto Isoelétrico teóricos de 61,3 kDa e 4,62 kDa, respectivamente e Peso Molecular e Ponto Isoelétrico experimentais de 65 kDa e 5,08 kDa, respectivamente. Foi classificada na categoria Processos Celulares por apresentar função relacionada à defesa do organismo e à regulação intracelular. Com relação à diferença de expressão, houve um aumento significativo de sua expressão (0,017) no grupo Experimental 5 quando comparado ao controle, conforme pode ser observado na figura 13.

Figura 13. Imagem referente ao *spot* identificado com base na comparação entre os grupos Controle x Experimental 5, onde a imagem superior representa o grupo controle e a inferior, o grupo experimental.

A figura 14 apresenta o *spot* analisado que se mostrou exclusivo do grupo **Experimental 1**, quando comparado aos demais grupos.

Figura 14. Imagem referente ao *spot* exclusivo do grupo Experimental 1 quando comparado aos demais grupos.

Com a análise do *spot* foi identificada uma proteína exclusiva no tronco encefálico de ratos pertencentes ao grupo **Experimental 1** em comparação aos demais grupos, a *Fructose-bisphosphate aldolase C* (P09117 (ALDOC_RAT)). Tal proteína apresenta Peso Molecular e Ponto Isoelétrico teóricos de 39,2 kDa e 6,67 kDa respectivamente, e Peso Molecular e Ponto Isoelétrico experimentais de 45 kDa e 6,70 kDa respectivamente, tendo sido classificada na categoria Metabolismo.

Todas as proteínas identificadas foram classificadas de acordo com as categorias funcionais, propostas por Rison, Hodgman e Thornton (2000). No presente trabalho, nenhuma proteína identificada atendeu às funções que envolvem a categoria *Miscelânea*. A figura 15 apresenta a descrição percentual de cada categoria proposta pelos autores.

Figura 15. Gráfico de distribuição funcional das proteínas identificadas no tronco encefálico de ratos, de acordo com Rison, Hodgman e Thornton (2000).

5.8 CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

5.8.1 Proteínas relacionadas aos Processos Celulares

As proteínas pertencentes à categoria “Processos Celulares” desempenham especialmente as funções relacionadas à defesa do organismo e à regulação intracelular.

Nesta categoria, das oito (27,6%) proteínas identificadas, sete delas tiveram sua expressão diminuída nos grupos experimentais em comparação ao controle, sendo no grupo Experimental 1 a *Peroxiredoxin-6*, *Superoxide dismutase [Mn]*

mitochondrial, *Gamma-enolase*, *Sodium channel and clathrin linker 1* e *Alpha-internexin* (tabela 9), no grupo Experimental 2 a *Dihydropyrimidinase-related protein 2* e no grupo Experimental 3 a *Glial fibrillary acidic protein* (tabela 10). Apenas a *Neurofilament light polypeptide* estava aumentada nos grupos experimentais 5 e 1 em relação ao controle, bem como no grupo Experimental 3 quando comparado ao grupo Experimental 5.

5.8.2 Proteínas relacionadas ao Metabolismo

Proteínas relacionadas ao metabolismo podem ser compreendidas como aquelas cuja função está relacionada com a obtenção de energia e degradação de macromoléculas, além de pequenas moléculas.

Oito proteínas (27,6%) foram classificadas nesta categoria, sendo sete (87,5%) pertencentes à comparação entre grupo controle e experimentais e uma (12,5%) exclusiva do grupo Experimental 1, a *Fructose-bisphosphate aldolase C*. Foi observado um equilíbrio com relação à diferença de expressão das proteínas, já que quatro tiveram sua expressão diminuída nos grupos experimentais quando comparadas ao Controle, sendo elas no grupo Experimental 1 a *Malate dehydrogenase cytoplasmic*, *Alpha-enolase* e *Beta-enolase* (tabela 9) e no grupo Experimental 3 a *ATP synthase subunit alpha mitochondrial* (tabela 10) e três tiveram sua expressão aumentada em relação ao Controle, sendo elas no grupo Experimental 1 a *ATP synthase subunit d mitochondrial* e a *Creatine kinase B-type* (tabela 9) e no grupo Experimental 3 a *Triosephosphate isomerase* (tabelas 10).

5.8.3 Proteínas relacionadas ao Transporte

De modo geral, entende-se por função das proteínas desta categoria, promover o transporte de macromoléculas, pequenas moléculas e íons.

Apenas uma proteína (3,4%), pertencente à comparação entre grupo Controle e Experimental 1, foi classificada na categoria Transporte, a *Voltage-dependent anion-selective channel protein 1*, que apresentou aumento significativo de expressão ($p = 0,0004$) no grupo experimental quando comparado ao controle (tabela 9).

5.8.4. Proteínas relacionadas a Vias de Informação

A principal função das proteínas relacionadas a Vias de Informação é a sua atuação nos processos de síntese e degradação de DNA e RNA.

Foram classificadas como pertencentes a esta categoria seis proteínas (20,7%), havendo aumento significativo de expressão em três (50%) nos grupos experimentais quando comparados ao controle, sendo elas no grupo Experimental 1 a *Heat shock protein HSP 90-beta* e a *Heat shock protein HSP 90-alpha* (tabela 9) e no grupo Experimental 3 a *78 kDa glucose-regulated protein* (tabela 10). Outras três proteínas tiveram sua expressão diminuída no grupo Experimental 1 em comparação ao Controle, sendo elas a *Heat shock-related 70 kDa protein 2*, *Heat shock cognate 71 kDa protein* e a *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A* (tabela 9).

5.8.5. Proteínas relacionadas a Estrutura e Organização da Estrutura

A categoria Estrutura e Organização da Estrutura abrange proteínas que desempenham funções relacionadas ao citoesqueleto e membrana celular. Assim, foram identificadas nesta categoria seis (20,7%) proteínas, onde observou-se em todas um aumento significativo de expressão no grupo Experimental 1 quando comparadas ao Controle, sendo elas a *Actin aortic smooth muscle*, *Actin cytoplasmic 1*, *Actin cytoplasmic 2*, *Actin gamma-enteric smooth muscle*, *Actin alpha cardiac muscle 1* e *Actin alpha skeletal muscle* (tabela 9).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A inter-relação entre chumbo e sistema auditivo tem sido apresentada pela literatura por meio de estudos clínicos e experimentais. Na análise dos resultados descritos, os procedimentos eletrofisiológicos têm sido considerados biomarcadores mais sensíveis quando comparados aos procedimentos comportamentais (ALVARENGA, 2005b). Entretanto, até o momento, não existe um consenso quanto ao efeito do chumbo neste sistema e nem quanto às possíveis estruturas que estariam alteradas pela intoxicação, independente da concentração do metal no sangue (DISCALZI et al., 1992; COUNTER et al., 1997b; MONTEIRO et al., 2003; ALVARENGA et al., 2003; ALVARENGA, 2005b; DASCANIO; VALLE, 2008).

Contudo, o poder de toxicidade do chumbo no homem é inegável. Por esta razão, trabalhos voltados para a proteção contra esses efeitos têm sido desenvolvidos, como, por exemplo, o uso de agentes com poder quelante, antioxidante, entre outros (GURER; ERCAL, 2000; GAUTAM; FLORA, 2010). Nesta mesma vertente, o ferro passou a despertar o interesse de alguns pesquisadores, por considerarem que ele poderia diminuir a concentração de chumbo no sangue, proteger a integridade da barreira hematoencefálica e até mesmo prevenir contra a citotoxicidade e apoptose celular induzida (BRADMAN et al., 2001; WANG et al., 2007a; WANG et al., 2007b).

O consumo de água dos animais foi mensurado ao longo do experimento, uma vez que a adição de acetato de chumbo em água de beber e/ou a administração de sulfato ferroso por gavagem gástrica poderia alterar o padrão de consumo da mesma. Os valores obtidos nos diferentes grupos demonstraram que a ingestão de acetato de chumbo aparentemente causou uma diminuição no consumo de água, com exceção do grupo Experimental 2 (tabela 2). Apesar deste fato, as concentrações mínimas de chumbo no sangue requeridas (10 e 30 µg/dL) para a exposição a baixa e alta dose de acetato de chumbo foram alcançadas nos grupos estudados (tabela 4).

A análise da variável peso médio (inicial e final) demonstrou ganho de massa corporal semelhante para os animais de todos os grupos durante o período experimental (tabela 3), o que demonstra que o acetato de chumbo, administrado

em baixas ou altas concentrações, não foi capaz de interferir no ganho de peso dos animais. Estes resultados também foram descritos por Gautam e Flora (2010) que trataram ratos *Wistar* com 13,18 mmol/L de acetato de chumbo na água de beber por três semanas e não observaram mudanças na massa corporal dos animais.

No presente estudo foram realizadas análises relacionadas a concentração de chumbo no sangue e no tronco encefálico. Foi observado um efeito dose-resposta para a concentração média de chumbo no sangue, bem como uma redução de sua concentração no sangue quando administrado o sulfato ferroso, com diferença estatisticamente significativa para a menor dosagem de acetato de chumbo administrada. Com relação ao sulfato ferroso, utilizou-se neste estudo a dosagem de 20 mg/kg de FeSO_4 , que corresponde a um valor médio dos apresentados na literatura, que varia de 7 a 40 mg/kg. Foi possível verificar que a utilização do sulfato ferroso nesta dosagem apresentou ação na redução da concentração do chumbo no sangue, ao contrário do descrito por Wang e colaboradores (2007a; 200b) que constataram que doses mais elevadas de FeSO_4 (14 mg/kg) aumentaram a plumbemia nos ratos.

A análise da concentração de chumbo no tronco encefálico, assim como no sangue, apresentou um efeito dose-resposta, confirmado pela alta correlação entre a concentração do chumbo nos dois compartimentos ($r^2=0,905$, $p<0,0001$). Em contrapartida, apesar de ter sido verificada uma redução na concentração de chumbo no tecido nos grupos Experimental 2 e 4, a mesma não demonstrou significância quando comparados aos seus pares não suplementados (Experimental 1 e 3). No estudo de Wang e colaboradores (2007a), que utilizou apenas uma dose de acetato de chumbo (342 $\mu\text{g/mL}$) associada à suplementação com duas dosagens de sulfato ferroso (7 e 14 mg/kg) a análise de chumbo no tecido cerebral (três regiões diferentes), demonstrou que os grupos suplementados com a baixa dose de sulfato ferroso tiveram uma redução significativa das concentrações de chumbo nas três regiões do cérebro em comparação com o grupo que recebeu apenas acetato de chumbo, ao passo que a dose elevada de suplementação com sulfato ferroso não teve nenhum efeito significativo sobre os níveis cerebrais de chumbo.

Neste estudo, optou-se por realizar a pesquisa do PEATE para acompanhar o processo maturacional do nervo auditivo e tronco encefálico, uma vez que mudanças fisiológicas destas estruturas refletem-se na latência absoluta dos

componentes analisados (ondas I, II, III e IV) e consequentemente nos valores de intervalos interpicos.

Inicialmente, ao analisar os resultados obtidos no PEATE com relação ao **efeito tempo** (momento pré e pós-intoxicação), observou-se uma redução significativa nas latências absolutas das ondas I, II, III e IV e os valores de intervalos interpicos I-II, II-III, III-IV e I-IV em todos os grupos (tabelas 5, 6 e 7). Este resultado era esperado, uma vez que o estudo foi desenvolvido em um período em que o nervo auditivo e tronco encefálico estavam em processo de maturação (conforme demonstrado no quadro 1), ou seja, a idade inicial dos ratos era de 26 dias (pré intoxicação) e a final era de 63 dias de vida (pós intoxicação). Assim, os valores demonstram que a intoxicação pelo acetato de chumbo não impediu o processo maturacional das estruturas do sistema auditivo, pois houve a redução da latência absoluta das ondas e dos valores de intervalos interpicos com o aumento da idade. Isso reflete a mielinização progressiva das fibras, sincronização neural e aumento da eficiência da transmissão na sinapse dentro dos núcleos que compõem a via auditiva do tronco encefálico (ROMAND et al., 1976; DUM, 1984; BLATCHLEY; COOPER; COLEMAN, 1987).

Contudo, as análises do **efeito grupo** e do **efeito interação** apresentaram resultados que sugerem a ação do acetato de chumbo e do sulfato ferroso neste processo maturacional.

Na análise do **efeito grupo** (tabela 7), observou-se que os grupos Controle e Experimental 2 apresentam no momento pré-intoxicação diferença estatisticamente significativa na latência absoluta da onda III, 3,41 ms e 3,06 ms, respectivamente. Semelhante comportamento foi constatado para o valor de intervalo interpico I-II, com diferença significativa entre o grupo Experimental 5 e Experimental 1, 1,18 ms e 0,96, respectivamente. Ao analisar estes grupos no momento pós-intoxicação, a diferença estatística não se manteve, ou seja, as latências absolutas e valores de intervalos interpicos mostraram-se semelhantes, 2,88 ms (Controle) / 2,75 ms (Experimental 2) e 0,92 ms (Experimental 5) / 0,91 ms (Experimental 1), respectivamente. Estes dados sugerem que, apesar do processo maturacional ter ocorrido, este apresentou-se de forma mais lenta no nervo auditivo e região do núcleo coclear (porção baixa do tronco encefálico) nos grupos expostos as baixas doses de chumbo.

Adicionalmente, a análise do **efeito interação** demonstra que a redução esperada para o valor de intervalo interpico I-II, foi menor nos grupos Experimental 1 e 3 quando comparados aos demais grupos (tabelas 6 e 7), o que reforça o efeito do chumbo no processo maturacional das estruturas mais periféricas do sistema auditivo, pois a onda I corresponde à atividade do nervo auditivo e onda II região de núcleo coclear.

Desta forma, os resultados obtidos com base na análise do **efeito grupo** e **efeito interação**, indicaram que independente da concentração de acetato de chumbo a que os ratos foram expostos, o processo maturacional mostrou-se mais lento na porção correspondente as regiões do nervo auditivo (onda I) e núcleos cocleares (onda II), o que corrobora com os resultados descritos por Huang (1980) e Möller (1983).

Os demais estudos descritos na literatura que realizaram o PEATE em animais e humanos com histórico de intoxicação por chumbo, foram desenvolvidos em uma fase na qual o sistema auditivo periférico e central até tronco encefálico encontravam-se com o processo maturacional concluído, não permitindo assim, uma análise comparativa. Entretanto, cabe ressaltar que, neste contexto, o efeito tóxico do chumbo nestas estruturas do sistema foi confirmado na maioria dos estudos (OTTO et al., 1985; HOLDSTEIN et al., 1986; LILIENTHAL; WINNEKE; EWERT, 1990; DISCALZI et al., 1992; DISCALZI et al., 1993; MURATA et al., 1993; HIRATA; KOSAKA, 1993; ROTHENBERG; POBLANO; GARZA-MORALES, 1994; LASKY et al., 1995; LILIENTHAL; WINNEKE, 1996; OSMAN et al., 1999; ROTHENBERG; POBLANO; SCHNAAS, 2000; WANG; WANG; FENG, 2005; JONES et al., 2008). Porém há descrições de resultados normais no PEATE (MURATA et al., 1995; COUNTER et al., 1997a; 1997b; LASKY et al., 2001), assim como ausência de correlação entre o resultado do PEATE e a concentração de chumbo no sangue (COUNTER, 2002; ALVARENGA, 2005).

Por outro lado, os resultados obtidos direcionam para o fortalecimento da hipótese inicial de que o sulfato ferroso apresenta um efeito protetor diante da exposição ao acetato de chumbo. Isto porque, a ocorrência de um processo maturacional mais lento nos grupos intoxicados por acetato de chumbo, independente da dosagem, como discutido acima, não foi observada quando foi administrado o sulfato ferroso, uma vez que não houve diferença significativa das latências absolutas e dos valores de intervalos interpicos dos grupos Experimental 2

e 4 com o grupo Controle. Esta hipótese é reforçada ainda, pelos resultados da análise do **efeito grupo** para o valor do intervalo interpico I-IV, que demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Experimental 1 e 2 no momento pós-intoxicação (tabela 7), cujos valores encontrados foram 2,92 ms e 2,62 ms, respectivamente. Ao considerar que no momento pré-intoxicação os valores de intervalo interpico nestes grupos eram semelhantes, 3,30 ms (Experimental 1) e 3,25 ms (Experimental 2), é possível verificar uma redução mais lenta no grupo não suplementado. Assim, os resultados sugerem o efeito protetor do sulfato ferroso na ação tóxica do acetato de chumbo em uma região específica do sistema auditivo.

Nos trabalhos que investigaram o possível efeito protetor do ferro na exposição ao chumbo, foi constatada a capacidade do ferro prevenir contra a citotoxicidade e apoptose induzida pelo chumbo (WANG et al., 2007b), além de parecer proteger a integridade da barreira hematoencefálica (WANG et al., 2007a). Por outro lado, em estudos realizados em nosso grupo, o efeito protetor do ferro no córtex não foi confirmado (FERREIRA, 2012; DUARTE, 2013). É importante ressaltar que no estudo de Duarte (2013) o chumbo e o ferro apresentaram ações diferentes, que não contradizem, porém, com os resultados do presente estudo, uma vez que a pesquisa de Duarte (2013) avaliou estruturas corticais do sistema auditivo. Assim, faz-se necessário que análises envolvendo diferentes aspectos da fisiologia do sistema auditivo sejam amplamente realizadas.

Como relatado anteriormente, no presente trabalho o chumbo, independente da dosagem, foi capaz de interferir no processo maturacional de parte do sistema auditivo, especificamente na porção auditiva correspondente ao nervo auditivo (onda I) e região do núcleo coclear (onda II). Quando analisada a ação do chumbo sobre o perfil proteico do tronco encefálico, observou-se a reprodução deste padrão encontrado no potencial auditivo, uma vez que o número de *spots* proteicos detectados diminuiu em todos os grupos experimentais, quando comparados ao grupo controle (figura 8). Assim, serão discutidas as proteínas identificadas com expressão alterada na análise proteômica, que poderiam estar envolvidas com os efeitos do chumbo no sistema auditivo.

Uma proteína identificada esteve presente exclusivamente no grupo Experimental 1 em relação aos demais grupos, a *Fructose-bisphosphate aldolase C*). Esta proteína, também conhecida como *Aldolase C*, é uma enzima glicolítica que

catalisa a clivagem aldólica reversível da *fructose-1,6-biphosphate* em *dihydroxyacetone phosphate* e/ou *glyceraldehyde-3-phosphate*. A *Aldolase C*, encontra-se expressa em todos os tecidos, contudo, após o nascimento sua expressão diminui rapidamente, exceto no cérebro e neurônios, cujos níveis de expressão máxima são atingidos na vida adulta. A *Aldolase C* tem demonstrado ser, em estudos *in vivo*, a principal proteína de ligação ao RNAm da proteína *neurofilament light* (NF-L) e assim regula a estabilidade desse transcrito por meio da competição com a proteína de ligação (*polyA-binding protein*) (CAÑETE-SOLER; REDDY; TOLAN et al., 2005). Esses resultados podem ter consequências importantes para a compreensão dos mecanismos causais subjacentes das doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica, marcada pelo acúmulo da NF-L nos neurônios motores degenerados (CAÑETE-SOLER; REDDY; TOLAN et al., 2005). A presença de *Aldolase C* em células específicas do cérebro onde há a ausência de enzimas requeridas para metabolismo da frutose, pode significar, mais uma vez, que esta proteína possa desempenhar outras funções não catalíticas nas células, como por exemplo, na organização de circuitos neuronais (FUNARI; CRANDALL; TOLAN, 2007). O fato da *Fructose-bisphosphate aldolase C* ter sido encontrada exclusivamente no grupo Experimental 1 (quando comparada aos demais grupos) sugere que sua presença possa estar relacionada com alteração no padrão de metabolismo energético do tecido cerebral, especialmente em neurônios, causado pelo chumbo, mesmo em caso de exposição a baixas concentrações do metal.

Na análise da expressão das proteínas identificadas com base na comparação entre o grupo Controle e Experimental 1, 11 tiveram sua expressão diminuída no grupo experimental, sendo elas *Malate dehydrogenase, cytoplasmic*; *Alpha-enolase*; *Beta-enolase*; *Gamma-enolase*; *Peroxiredoxin-6*; *Superoxide dismutase [Mn] mitochondrial*; *Sodium channel and clathrin linker 1*; *Alpha-internexin*; *Heat shock-related 70 kDa protein 2*, *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A* e *Heat shock cognate 71 kDa protein*.

As proteínas *Alpha-enolase*, *Beta-enolase* e *Gamma-enolase*, pertencem à família da *Enolase*, na qual já foram identificados mais de 20 membros (LUKKA et al., 2012). A *Enolase* é considerada uma proteína multifuncional, pois além de ser uma enzima chave na atividade glicolítica, pode servir como um receptor de plasminogênio na superfície de células hematopoiéticas, epiteliais e endoteliais e,

consequentemente, desempenhar um papel importante no sistema intravascular e pericelular. Em adição, a *Enolase* ainda seria capaz de atuar como uma *Heat shock protein* e ligar estruturas do citoesqueleto e cromatina, indicando assim que a enolase pode desempenhar um papel crucial na transcrição gênica e processos fisiopatológicos (PANCHOLI, 2001).

Assim como as proteínas da família *Enolase*, duas outras proteínas pertencentes à família das *Heat Shock (related 70 kDa protein 2 e cognate 71 kDa protein)* também tiveram sua expressão diminuída no grupo Experimental 1. As proteínas desta família são reconhecidamente chaperonas moleculares, e estão envolvidas em diversas funções como, no processo de degradação de proteínas, na fusão de membrana e endocitose, na diferenciação neuronal, no estresse oxidativo e na apoptose. O aumento da expressão das *Heat Shock* tem sido relacionado a diferentes danos causados por agentes neurotóxicos, drogas, metais potencialmente tóxicos, estresse oxidativo e outros estados fisiopatológicos. Em contrapartida, sua diminuição de expressão ou sua indução tem sido compreendida como uma resistência celular para danos relacionados a hipertermia, privação de energia, estresse oxidativo, entre outros (FREYALDENHOVEN; ALI, 1997).

Neste sentido, a diminuição da expressão de proteínas como a *Enolase (alpha, beta e gamma)* e *Heat Shock (related 70 kDa protein 2 e cognate 71 kDa protein)* e *Superoxide Dismutase* no grupo Experimental 1 em comparação ao Controle, poderia acarretar em falha no processo de degradação das proteínas. Além disso, conforme já discutido anteriormente, a diminuição na expressão, especialmente da *Superoxide Dismutase*, indicaria a incapacidade desta proteína aumentar a tolerância das células neuronais para os efeitos do estresse oxidativo e a expressão das proteínas de desnaturação (MELONI et al., 2005). Assim, estes resultados reforçam a hipótese de que o chumbo, já em baixas concentrações, seria capaz de promover o estresse oxidativo neuronal, interferindo no processo de sinapses ao longo da via auditiva, comprometendo a transmissão das informações auditivas aos centros superiores.

Desta mesma comparação entre grupo Controle com o Experimental 1, 11 proteínas tiveram sua expressão aumentada no grupo experimental em relação ao controle, sendo elas *ATP synthase subunit d mitochondrial*, *Creatine kinase B-type*, *Actin aortic smooth muscle*, *Actin cytoplasmic 1*, *Actin cytoplasmic 2*, *Actin gamma-enteric smooth muscle*, *Actin alpha cardiac muscle 1*, *Actin alpha skeletal muscle*,

Voltage-dependent anion-selective channel protein 1, Heat shock protein HSP 90-beta, Heat shock protein HSP 90-alpha.

A proteína *Voltage-dependent anion-selective channel protein 1*, é do tipo porina, localizada na membrana mitocondrial externa, responsável por regular a permeabilidade mitocondrial de ânions, cátions, creatina fosfato, ATP, entre outros metabólitos (LEMASTERS, HOLMUHAMEDOV, 2006). Além disso é parte constitutiva do denominado poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP), um complexo multiproteico, que participa na liberação do citocromo, formado também pelas proteínas ciclofilina D (na matriz mitocondrial) e pelo translocador adenilato (na membrana interna). Quando o mPTP se abre, o potencial transmembrana que acopla o transporte de elétrons para a fosforilação oxidativa é perdido, fazendo com que a membrana mitocondrial interna torne-se permeável a solutos menores que 1,5 kDa. Essa permeabilidade aumentada compromete o metabolismo de energia, a homeostase do cálcio na célula, e leva à disfunção mitocondrial (SHOSHAN-BARMATZ, GINCEL, 2003; LEMASTERS; HOLMUHAMEDOV, 2006), ocorrendo liberação de fatores que induzem a apoptose dessa organela. Várias neuropatias e doenças neurodegenerativas foram associadas com a disfunção mitocondrial (WANG et al., 2009; AREA-GOMEZ; CASTILLO; TAMBINI et al., 2012), alteração na homeostase do cálcio (BEZPROZVANNY, MATTSON, 2008), assim como a intoxicação por chumbo (CHEN, YANG, JIAO et al., 2003). Em nosso estudo, mostramos que a exposição ao chumbo aumentou a expressão da VDAC-1, em relação ao grupo Controle. Isso pode ser um indicativo de que o chumbo induza a disfunção mitocondrial de neurônios auditivos (ou nervosos), promovendo a apoptose com consequência negativa para a função desempenhada especialmente pelo nervo auditivo, que constatamos ter sofrido alteração em seu processo maturacional, tanto na baixa quanto na alta concentração.

Resultados distintos com respeito à expressão da VDAC-1 foram obtidos por Prins et al. (2010) em estudos *in vivo* e *in vitro*, quando utilizaram concentrações de 0,01 mmol/L e 0,10 mmol/L de acetato de chumbo, concentrações estas bastante inferiores às utilizadas no presente estudo. Os autores verificaram diminuição da expressão desta proteína nos grupos experimentais em comparação ao controle. Para os autores, esta diminuição na expressão da VDAC indicaria que os neurônios auditivos podem ser extremamente sensíveis a pequenas mudanças na expressão

da VDAC, além de o chumbo ser capaz de afetar preferencialmente os sistemas de produção de energia no tronco encefálico. Os autores apontaram ainda que as consequências fisiológicas decorrentes da interrupção do metabolismo de energia pode ser mais pronunciada no sistema auditivo, já que neurônios auditivos requerem uma produção de energia regulada e eficiente, a fim de manter corretamente o grande número e o momento preciso da ocorrência dos potenciais de ação, necessários para o processamento auditivo central.

Das proteínas que foram identificadas com base na comparação do grupo Controle com o Experimental 3, duas tiveram sua expressão diminuída no grupo experimental, a *ATP synthase subunit alpha mitochondrial* e a *Glial fibrillary acidic protein*.

A mitocôndria, local primário de produção de energia celular e o consumo de oxigênio, desempenha papel central a geração de ATP pelo processo de fosforilação oxidativa, compreendida pelos elétrons gerados pela oxidação de moléculas de oxigênio que passam ao longo de uma cadeia de transporte, composta por quatro enzimas respiratórias dispostas na membrana mitocondrial interna. O transporte destes elétrons através da cadeia respiratória conduz à geração de ATP (CHOU, WU, TSAI et al., 2011). Uma das proteínas localizadas na membrana mitocondrial interna, que atua no processo de geração de APT é a *ATP synthase subunit alpha, mitochondrial*, classificada como uma ATPase. A literatura tem demonstrado que redução na expressão de *ATP synthase* pode acarretar 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 et al., 2004; REED et al., 2008). No presente estudo, foi verificada uma diminuição da expressão da *ATP synthase subunit alpha mitochondrial* no grupo Experimental 3 em relação ao Controle. Este resultado indica que o acetato de chumbo, em altas concentrações, deve ter reduzido a síntese de ATP, afetando todas as funções celulares dependentes desta, promovendo consideráveis prejuízos energéticos às células do tronco encefálico. Ao ser correlacionado este resultado proteico com o resultado obtido no PEATE, ou seja, que o chumbo foi capaz de interferir no processo maturacional, pode-se supor que a redução de produção de ATP nas células no tronco encefálico também tenha ocorrido para as células do nervo auditivo, uma vez que este demonstrou ser clinicamente mais sensível à ação do chumbo.

Do mesmo modo, das proteínas identificadas baseadas na comparação entre Controle e Experimental 3, duas tiveram sua expressão aumentada no grupo experimental, sendo a *Triosephosphate isomerase* e *78 kDa glucose-regulated protein*.

A *78 kDa glucose-regulated protein* é um membro da família *70-kDa heat shock protein*. Atua principalmente como uma chaperona molecular na associação das cadeias de imunoglobulina, na importação de proteínas para o retículo endoplasmático, além de atuar no dobramento e montagem das proteínas recentemente sintetizadas (CHUN; PARK; KIM et al., 1999). Sua expressão está relacionada a processos de estresse fisiológico que afetam a glicosilação das proteínas (WOODEN, LI, NAVARRO et al., 1991). No presente trabalho, o fato da expressão desta proteína ter aumentado significativamente no grupo Experimental 3 em relação ao Controle, sugere, mais uma vez, que o chumbo é capaz de alterar a homeostase celular, neste caso, seja pelo processo de glicosilação da proteínas, fundamental para a formação de proteínas de membrana e secretórias, seja pela ativação do sistema antioxidante, levando ao estresse oxidativo.

Outra proteína identificada foi a *Neurofilament light polypeptide*, a qual verificou-se aumento de sua expressão nos grupos Experimental 5 e 1 quando comparados ao Controle, bem como na comparação entre os grupos Experimental 5 e 4, a qual estava aumentada no grupo Experimental 4. Os neurofilamentos constituem os principais componentes do citoesqueleto de neurônios maduros. São compostos por três subunidades polipeptídicas divididas de acordo com seus pesos moleculares: leve (NFL-neurofilament light – 61 kDa), média (90 kDa) e pesada (110 kDa) (LEE, CLEVELAND, 1996). Possuem a função de controlar o calibre e a estrutura dos axônios e podem estar envolvidos em diversas desordens neuronais. A *Neurofilament light polypeptide* é particularmente abundante em neurônios durante o desenvolvimento e a regeneração do sistema nervoso central e periférico (TOSK et al., 1996; JULIEN; MUSHYNSKI, 1998). O fato de a expressão dessa proteína estar aumentada nos grupos experimentais em relação ao controle, pode ser devido a uma tentativa de o organismo compensar os possíveis efeitos tóxicos tanto por parte do chumbo, quanto por parte do ferro, já que a concentração aqui utilizada é maior do que aquela utilizada por Wang et al. (2007a), que apontou que a baixa dose de sulfato ferroso é capaz de reduzir significativamente a concentração de chumbo em sangue. Na comparação entre os grupos Experimental 5 e 4, pode-se observar que

a proteína em questão apresentou-se 1,6 vezes mais expressa no grupo que recebeu acetato de chumbo + sulfato ferroso em relação ao grupo que recebeu exclusivamente sulfato ferroso.

Por fim, a proteína *Dihydropyrimidinase-related protein 2* identificada com base na comparação entre grupo Controle e Experimental 2, teve sua expressão diminuída no grupo experimental. A proteína em questão, também conhecida como *Collapsin response mediator protein-2* (CRMP-2), é encontrada em abundância no cérebro e em especial em neurônios em desenvolvimento (MINTURN; FRYER; GESCHWIND et al., 1995; RICARD; STANKOFF; BAGNARD et al., 2000) e sua função é promover a elongação dos axônios (FUKATA; ITOH; KIMURA et al., 2002). Ainda de acordo com Fukata, Itoh, Kimura et al. (2002), a superexpressão da proteína CRMP-2 promoveria o aumento da taxa de crescimento axonal e a ramificação dos neurônios, enquanto aqueles com diminuição da expressão apresentam diminuição do crescimento. Em nosso estudo, a alteração da expressão da *Dihydropyrimidinase-related protein 2* mostrou ser dependente da associação entre chumbo + ferro, e não apenas de um ou outro, em relação ao Controle. Isso sugere que o grupo Experimental 2 possua menor capacidade no desenvolvimento de neurônios com axônios longos, e, conseqüentemente, menor capacidade de os impulsos nervosos percorrerem longas distâncias, em relação ao grupo controle. Além disso, assim como a *Neurofilament light polypeptide*, a *Dihydropyrimidinase-related protein 2* provavelmente não está relacionada com o efeito inibitório do ferro sob o impacto do chumbo no sistema auditivo, uma vez que a sua expressão manteve-se inalterada entre os grupos que receberam apenas acetato de chumbo e acetato de chumbo + sulfato ferroso, em ambas concentrações. Embora até o momento não tenhamos alvos proteicos que possam explicar a proteção do ferro diante da ação do chumbo na maturação do sistema auditivo (porção do nervo auditivo e tronco encefálico) obtido pelo exame clínico, esperamos que a identificação completa das proteínas com diferença de expressão entre os grupos que receberam acetato de chumbo e acetato de chumbo + sulfato ferroso possam, no futuro, esclarecer a(s) base(s) molecular(es) dessa resposta.

Assim, nosso estudo reforça a hipótese do papel deletério do acetato de chumbo no sistema auditivo e é pioneiro em relação aos novos conhecimentos sobre os possíveis mecanismos proteicos envolvidos nessa resposta em nível do tronco encefálico, abrindo diferentes perspectivas para futuras pesquisas que busquem

compreender os mecanismos envolvidos no impacto causado pela intoxicação por chumbo no sistema auditivo.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

O presente estudo reforça a hipótese do papel deletério do acetato de chumbo nas dosagens de 100 e 400 mg/L na maturação do nervo auditivo e região do núcleo coclear, com possível efeito protetor do sulfato ferroso. A análise proteômica do tronco encefálico de ratos demonstrou que o acetato de chumbo altera a expressão proteica desta estrutura, contudo o efeito protetor do sulfato ferroso não foi confirmado pelas proteínas identificadas.

Referências

REFERÊNCIAS

Achor LJ, Starr A. Auditory brain stem responses in the cat. I. Intracranial and extracranial recordings. *Electroenceph Clin Neurophysiol.* 1980; 48 (2): 154-173.

ACCLPP Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. Low level lead exposure harms children: a renewed call for primary prevention. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC, Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention; 2012.

Adhikari A, Penatti CA, Resende RR, Ulrich H, Britto LR, Bechara EJH. 5-Aminolevulinate and 4,5-dioxovalerate ions decrease GABA(A) receptor density in neuronal cells, synaptosomes and rat brain. *Brain Res.* 2006; 1093 (1): 95-104.

Adonaylo VN, Oteiza PI. Pb²⁺ promotes lipid oxidation and alterations in membrane physical properties. *Toxicol.* 1999; 132 (1): 19–32.

Agency fo Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 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, Public Health Service, July. 1988.

Agency fo Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for lead. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, July. 1999.

Alvarenga KF, Jacob LCB, Martins CHF, Costa Filho AO, Coube CZV, Marques JM. Emissões otoacústicas - produto de distorção em indivíduos expostos ao chumbo e ao ruído. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003; 69 (5): 681-689.

Alvarenga KF, Martins CHF, Mariotto LD, Costa AO, Amantini RCB. O efeito da exposição ao chumbo associado ao ruído no sistema auditivo e vestibular: relato de caso. In: *Anais do 20º Encontro Internacional de Audiologia*, São Paulo. São Paulo, Academia Brasileira de Audiologia. 2005a.

Alvarenga KF. Avaliação do sistema auditivo periférico e central em crianças com histórico de contaminação por chumbo. [Livre-Docência]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2005b.

Alvarenga KF, Manoel DO, Zucki F, Jacob-Corteletti LCB, Lopes AC, Feniman MR. Avaliação audiológica em crianças com baixo nível de exposição cumulativa ao chumbo. *Rev. CEFAC*, ahead of print Epub Oct 26, 2012.

Alvarenga KF, Bernardez-Braga GRA, Zucki F, Duarte JL, Lopes AC, Feniman MR. Correlation analysis of the long latency auditory evoked potential N2 and cognitive P3 with the level of lead poisoning in children. *Int. Arch. Otorhinolaryngol.* 2013; 17 (1): 41-46.

Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, Veenstra TD, et al. The Human Plasma Proteome: A Non-Redundant List Developed by Combination of Four Separate Sources, *Mol. Cell Proteomics*. 2004; 3 (4): 311-26.

Andrade A. Sequenciamento, identificação e análise das proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis*. PAULO, U. D. S. 2006.

Araki S, Sato H, Yokoyama K, Murata K. Subclinical neurophysiological effects of lead: a review on peripheral, central and autonomic nervous system effects in lead workers. *Am J Ind Med*. 2000; 37 (2): 193-204.

Area-Gomez E, Castillo MCL, Tambini MD, Guardia-Laguarta C, Groof AJC, Madra M et al. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *The EMBO Journal*. 2012; 31: 4106-23.

Baloh RW, Spivey GH, Brown P, Morgan D, Campion DS, Browdy BL. Subclinical effects of chronic increased lead absorption – a prospective study: results of baseline neurologic testing. *J Occup Med*. 1979; 21: 490-496.

Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Rybicka M, Nowacki P, Chlubek D. Neurotoxicity of lead. Hypothetical molecular mechanisms of synaptic function disorders. *Neurol Neurochir Pol*. 2012; 46 (6): 569-78.

Basha R, Reddy GR. Developmental exposure to lead and late life abnormalities of nervous system. *Indian J Exp Biol*. 2010; 48: 636-41.

Batista BL, Grotto D, Rodrigues JL, Souza VCO, Barbosa F Junior. Determinate of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. *Analytica Chimica Acta*. 2009; 646 (1-2): 23-9.

Beard JL, Connor JR. Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr*. 2003; 23: 41-58.

Beaumont C, Vailont S. Iron homeostasis. In: Beaumont C, Beris P, Beuzard Y, Brugnara C, editors. Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis. Genova, Italy: Forum Service Editore; 2006, p. 393-406.

Bechara EJH. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 1996; 29 (7): 841-51.

Bellinger D. Very low lead exposures and children's neurodevelopment. *Curr Opin Pediatr*. 2008; 20 (2): 172-7.

Bezprozvanny I, Mattson MP. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 2008; 31 (9): 454-63.

Blatchley BJ, Cooper WA, Coleman JR. Development of auditory brainstem response to tone pip stimuli in the rat. *Developmental Brain Research*. 1987; 32 (1): 75-84.

Bleecker ML, Ford DP, Lindgren KN, Scheetz K, Tiburzi MJ. Association of chronic and current measures of lead exposure with different components of brainstem auditory evoked potentials. *Neurotoxicology*. 2003; 24 (4-5): 625-31.

Bovell-Benjamin AC, Ginard J-X. Novel approaches and application of contemporary sensory evaluation practices in Iron Fortification Programs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2003; 43 (4): 379-400.

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

Bradman A, Eskenazi B, Sutton P, Athanasoulis M, Goldman LR. Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated environments. *Environ. Health Perspect*. 2001; 109 (10): 1079-84.

Brasil. Ministério do Trabalho. Portaria n.º 24/GM, de 29 de dezembro de 1994. NR 7, Norma Regulamentadora 7 (1994). Programa de controle médico de saúde ocupacional. *Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 dez. 1994*

Buchwald JS, Huang C. Far-field acoustic response: origins in the cat. *Science*. 1975; 189 (4200): 382-4.

Candiano G, Ruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004; 25 (9): 1327-33.

Cañete-Soler R, Reddy KS, Tolan DR, Zhai J. Aldolases A and C are ribonucleolytic components of a neuronal complex that regulates the stability of the light-neurofilament mRNA. *J. Neurosci*. 2005; 25:4353-64.

Canfield RL, Henderson CR, Cory-Slechta DA. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microgram per deciliter. *New Engl J Med*. 2003; 348 (16): 1517-26.

Cantu MD. Análise proteômica diferencial aplicada para o estudo da morte súbita dos citos. [Tese]. São Carlos (SP). Universidade de São Paulo. 2007

CDC Center for Disease Control and Prevention. Preventing Lead Poisoning in Young Children. 1991. [online]. Available at: <http://www.cdc.gov/nceh/lead/Publications/books/plpyc/contents.htm> [Accessed 15 jan 2012].

CDC Center for Disease Control and Prevention. CDC response to Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention recommendations in "Low level lead exposure harms children: a renewed call for primary prevention." Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2012.

Chen L, Yang X, Jiao H, Zhao B. Tea catechins protect against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction, and calcium dysregulation in PC12 cells. *Chem Res Toxicol*. 2003; 16 (9): 1155-61.

Chevalier F. Highlights on the capacities of "Gel-based" Proteomics. In: *Proteome Science*. 2010; 8 (23): 2-10.

Chiodo LM, Jacobson SW, Jacobson JL. Neurodevelopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels. *Neurotoxicol*. 2004; 26 (3): 359-71.

Chiodo LM, Covington C, Sokol RJ, Hannigan JH, Jannise J, Ager J, Greenwald M, Delaney-Black V. Blood lead levels and specific attention effects in young children. *Neurotoxicol. Teratol*. 2007; 29 (5): 538-46.

Choi JW, Kim SK. Association between blood lead concentrations and body iron status in children. *Arch. Dis. Child*. 2003; 88 (9): 791-2.

Chou JL, Wu CH, Tsai C, Chang AYW, Chan SHH. Proteomic investigation of a neural substrate intimately related to brain death. *Proteomics*. 2011; 11 (2):239-48.

Chun YS, Park JW, Kim MS, ShimaH, Nagao M, Lee SH et al. Role of the 78-kDa Glucose-Regulated Protein as an Activity Modulator of Protein Phosphatase1g2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999; 259 (2): 300-4.

Coon S, Stark A, Peterson E, Gloi A, Kortsha G, Pounds J, Chettle D, Gorell J. Whole-body lifetime occupational lead exposure and risk of Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*. 2006; 114 (12): 1872-6.

Counter SA, Buchanan LH, Ortega F, Laurel G. Normal auditory brainstem and cochlear function in extreme pediatric plumbism. *J Neurol Sci*. 1997a; 152 (1): 85-92.

Counter SA, Vahter M, Laurell G, Buchanan LH, Ortega F, Skerfving S. High lead exposure and auditory sensory-neural function in andean children. *Environ Health Perspect*. 1997b; 105 (5): 522-6.

Counter SA. Brainstem neural conduction biomarkers in lead-exposed children of Andean lead-glaze workers. *J Occup Environ Med*. 2002; 44 (9): 855-64.

Counter SA, Buchanan LH. Neuro-ototoxicity in andean adults with chronic lead and noise exposure. *J Occup Environ Med*. 2002; 44 (1): 30-8.

Dascanio D, Valle TGM. A associação entre variáveis sócio-demográficas e plumbemia em crianças. *Paidéia*. 2008; 18 (41): 541-53.

Dass C. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Hoboken, Wiley-interscience, (2007).

Davis PA. The electrical response of the human brain to auditory stimuli. *Am J Physiol*. 1939; 126: 475-6.

Demasi M, Costa CA, Pascual C, Lesuy S, Bechara EJH. Oxidative tissue response promoted by 5-aminolevulinic acid promptly induces the increase of plasma antioxidant capacity. *Free Rad. Res.* 1997; 26 (3): 235-43.

Discalzi GL, Capellaro F, Bottalo L, Fabbro D, Mocellini A. Auditory brain-stem evoked-potentials (BAEPS) in lead-exposed workers. *Neurotoxicol.* 1992; 13 (1): 207-9.

Discalzi G, Fabbro D, Meliga F, Mocellini A, Capellaro F. Effects occupational exposure to mercury and lead on brainstem auditory evoked potentials. *Int J Psychophysiol.* 1993; 14 (1): 21-5.

Dum N. Postnatal development of the auditory evoked brainstem potentials in the guinea pig. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1984; 97 (1-2): 63-68.

Duarte JL. Potencial evocado auditivo cortical, análise bioquímica e morfológica em cérebro de ratos submetidos a tratamento subcrônico com chumbo: efeito protetor da suplementação com ferro. [Tese]. Bauru (SP). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2013.

Eggermont JJ. On the rate of maturation of sensory evoked potentials. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol, Ireland.* 1988; 70 (4): 293-305.

Fairbanks VG, Beutler E. Iron metabolism. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams-Hematology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill. 2001; 295-304.

Fang F, Kwee LC, Allen KD, Umbach DM, Ye W, Watson M, et al. Association between blood lead and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Epidemiol.* 2010; 171 (10): 1126-33.

Ferreira MCF. Efeito do acetato de chumbo associado ou não ao sulfato ferroso em cérebro de ratos: análise das enzimas antioxidantes. [Tese]. Bauru (SP). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2012.

Figueiredo MS, Castro Junior NP. Potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (ABR). In: Figueiredo MS. *Emissões otoacústicas e BERA*. São José dos Campos, São Paulo. Pulso Editorial. 2003: 85-97.

Flanagan PR, Chamberlain MJ, Valberg LS. The relation-ship between iron and lead absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 1982; 36 (5): 823-9.

Freyaldenhoven TE, Ali SF. Role of heat shock proteins in MPTP-induced neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 825: 167-78.

Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Menager C, Nishimura T, Shiromizu T, et al. CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol.* 2002; 4 (8): 583-91.

Funari VA, Crandall JE, Tolan DR. Fructose metabolism in the cerebellum. *The Cerebellum*. 2007; 6 (2): 130-40.

Gautam MSP, Flora SJS. Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. *Nutrition*. 2010; 26 (5): 563-70.

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*. 1999; 36 (4): 355-8.

Godwin HA. The biological chemistry of lead. *Curr Opin Chem Biol*. 2001; 5 (2): 223-7.

Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002; 66 (1): 39-63.

Grinnell AD. The neurophysiology of audition in bats: directional localization and binaural interaction. *J Physiol*. 1963; 167 (1): 97-113.

Grotto HZW. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2008; 30 (5): 390-397.

Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med*. 2000; 29 (10): 927-45.

Hall III JW. Handbook of auditory evoked responses. Boston: Allyn and Bacon; 1992.

Hall III JW. ABR Analysis and interpretation. In: Hall III JW. *New Handbook of Auditory Evoked Responses*. Boston: Pearson Education. 2007; 7: 212-57.

Hammad TA, Sexton M, Langenberg P. Relationship between blood lead and dietary iron intake in preschool children. A cross-sectional study. *Ann. Epidemiol*. 1996; 6: 30-3.

Haraguchi T, Ishizu H, Kawai K, et al. Diffuse neurofibrillary tangles with calcification (a form of dementia): X-ray spectrometric evidence of lead accumulation in calcified regions. *Neuroreport*. 2001; 12 (6): 1257-60.

Henry KR, Lepkowski CM. Evoked Potential Correlates of Genetic Progressive Hearing Loss: Age-related Changes from the Ear to the Inferior Colliculus of C57BL/6 and CBA/J Mice. *Acta Oto-laryngologica*. 1978; 86 (5-6): 366-74.

Hershko C, Konijn AM, Moreb J, Link G, Grauer F, Weissenberg E. Iron depletion and blood lead levels in a population with endemic lead poisoning. *Isr J Med Sci*. 1984; 20 (11): 1039-43.

- Hirata M, Kosaka H. Effects of lead exposure on neurophysiological parameters. *Environ Res.* 1993; 63 (1): 60-9.
- Holdstein Y, Pratt H, Goldsher M, Rosen G, Shenhav R, Linn S, et al. Auditory brainstem evoked potentials in asymptomatic lead-exposed subjects. *J Laryngol Otol* 1986; 100 (9): 1031-6.
- Huang CM. A comparative study of the brain stem auditory response in mammals. *Brain Research.* 1980, 184 (1): 215-9.
- Jacob LCB. Efeitos da exposição simultânea ao chumbo e ao ruído sobre o sistema nervoso auditivo central em trabalhadores de uma fábrica de baterias. [Tese]. Bauru (SP). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2000.
- Jamesdaniel S, Ding D, Kermany MH, Davidson BA, Knight PR 3rd, Salvi R, Coling DE. Proteomic analysis of the balance between survival and cell death responses in cisplatin-mediated ototoxicity. *J Proteome Res.* 2008; 7 (8): 3516-24.
- Jewett DL, Williston JS. Auditory-evoked far fields averaged from the scalp of humans. *Brain.* 1971; 94 (4): 681-96.
- Jewett DL, Romano MN. Neonatal development of auditory system potentials averaged from the scalp of rat and cat. *Brain Research.* 1972; 36 (1): 101-115.
- Jones LG, Prins J, Park S, Walton JP, Luebke AE, Lurie DI. Lead exposure during development results in increased neurofilament phosphorylation, neuritic beading and temporal processing deficits within the murine auditory brainstem. *The journal of comparative neurology.* 2008; 506 (6): 1003-17.
- Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res MolBiol.* 1998; 61:1-23.
- Kaltwaßer B, Schulenburg T, Beck F, Klotz M, Schäfer KH, Schmitt M, Sickmann A, Friauf E. Developmental changes of the protein repertoire in the rat auditory brainstem: A comparative proteomics approach in the superior olivary complex and the inferior colliculus with DIGE and iTRAQ. *J Proteomics.* 2013; 79: 43-59.
- Kamel F, Umbach DM, Hu H, Munsat TL, Shefner JM, Taylor JA, Sandler DP. Lead Exposure as a Risk Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegenerative Dis.* 2005; 2 (3-4): 195-201.
- Kim JS, Crichlow EC, Blakley BR. The effects of thiamin on the neurophysiological alterations induced by lead. *Vet Hum Toxicol.* 1990; 32 (2):101-5.
- Kim HS, Lee SS, Hwangbo Y, Ahn KD, Lee BK. Cross-sectional study of blood lead effects on iron status in Korean lead workers. *Nutrition.* 2003; 19 (7-8): 571-6.
- Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 1975; 26 (3): 231-43.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227 (5259): 680-5.

Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P, Cox C. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dL in US children and adolescents. *Public Health Rep*. 2000; 115 (6): 521-9.

Lasky RE, Maier MM, Snodgrass EB, Hecox KI, Laughlin NK. The effects of lead on otoacoustic emissions and auditory evoked potentials in monkeys. *Neurotoxicol Teratol*. 1995; 17 (6): 633-44.

Lasky RE, Melissa LL, Torre P, Laughlin N. The effects of early lead exposure on auditory function in rhesus monkeys. *Neurotoxicol Teratol*. 2001; 23 (6): 639-49.

Laukli E, Mair IW. Development of early auditory-evoked responses in the cat: filter effects. *Audiology*. 1982; 21 (4): 350-8.

Lee MK, Cleveland DW. Neuronal intermediate filaments. *Annual Review of Neuroscience*. 1996; 19: 187-217.

Lemasters JJ, Holmuhamedov E. Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor—thinking outside the box. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1762 (2): 181-90.

Li H, Swiercz R, Englander EW. Elevated metals compromise repair of oxidative DNA damage via the base excision repair pathway: implications of pathologic iron-overload in the brain on integrity of neuronal DNA. *J Neurochem*. 2009; 110 (6): 1774-83.

Liao H, Yang K, Hua QQ, Yang SM, Gao YK. Study on discrepant protein expression in rat auditory cortex under impulse noise exposure. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2011; 46 (10): 839-43.

Lidsky TI, Schneider JS. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain*. 2003; 126 (Pt 1): 5-19.

Lille F, Hazemann P, Garnier R, Dally S. Effects of lead and mercury intoxications on evoked potentials. *Clin. Toxicol*. 1988; 26 (1-2): 103-16.

Lilienthal H, Winneke G, Ewert T. Effects of lead on neurophysiological and performance measures: animal and human data. *Environ Health Persp*. 1990; 89: 21-5.

Lilienthal H, Winneke G. Lead effects on the brain stem auditory evoked potential in monkeys during and after the treatment phase. *Neurotoxicol Teratol*. 1996; 18 (1): 17-32.

Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*. 2004; 429: 883-91.

- Lucas S, Sexton M, Langenberg P. Relationship between blood lead and nutritional factors in preschool children: a cross-sectional study. *Pediatrics*. 1996; 97 (1): 74-8.
- Lukka T, Sakaia A, Kalyanaramanb C, Brownb SD, Imkera HJ, Songa L et al. Homology models guide discovery of diverse enzyme specificities among dipeptide epimerases in the enolase superfamily. *PNAS*. 2012; 109 (11): 4122-7.
- Lurie DI, Brooks DM, Gray L. The effect of lead on the avian auditory brainstem. *Neurotoxicology*. 2006; 27 (1): 108-17.
- Mahaffey K. Factors modifying susceptibility to lead toxicity. In: *Dietary and Environmental Lead: Human Health Effects* (Mahaffey K, ed). Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985; 373-419.
- Mahaffey KR. Environmental lead toxicity: nutrition as a component of intervention. *Environ Health Perspect*. 1990; 89: 75-8.
- Mann P, Hojrup P, Roepstorff P. Use of MS molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom*. 1993; 22 (6): 338-45.
- Markowitz ME, Rosen JF, Bijur PE. Effects of iron deficiency on lead excretion in children with moderate lead intoxication. *J Pediatr*. 1990; 116 (3): 360-4.
- Martins CHF. Avaliação cócleo-vestibular em indivíduos expostos simultaneamente ao chumbo e ao ruído. [Dissertação]. Bauru (SP): Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo. 2002.
- Meloni BP, Van Dyk D, Cole R, Knuckey NW. Proteome analysis of cortical neuronal cultures following cycloheximide, heat stress and MK801 preconditioning. *Proteomics*. 2005; 5 (18): 4743-53.
- Mendola P, Selevan P, Gutter S, Rice D. Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment Retard Dev Disabil Rev*. 2002; 8 (3): 188-97.
- Min MO, Singer LT, Kirchner HL, Minnes S, Short E, Hussain Z. et al. Cognitive development and low-level lead exposure in poly-drug exposed children. *Neurotoxicology and Teratology*. 2009; 31 (4): 225-31.
- Mills E, Dong X, Wang F, Xu H. Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Med Chem*. 2010; 2 (1): 51.
- Minturn JE, Fryer HJ, Geschwind DH, Hockfield S. TOAD-64, a gene expressed early in neuronal differentiation in the rat, is related to unc-33, a *C. elegans* gene involved in axon outgrowth. *J Neurosci*. 1995; 15 (10): 6757-66.
- Möller AR, Jannetta P, Bennett M, Möller MB. Intracranially recorded responses from human auditory nerve: new insights into the origin of brainstem evoked potentials. *Electroencephalogr and Clin Neurophysiol* 1981; 52 (1): 18-27.

Möller AR. On the origin of the compound action potentials (N1, N2) of the cochlea of the rat. *Exp. Neurol.* 1983; 80 (3): 633-44.

Monsen ER. The ironies of iron. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69 (5): 831-2.

Monteiro HP, Bechara EJH, Abdalla DSP. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Mol Cell Biochem.* 1991; 103 (1): 73-83.

Monteiro LP, Faria FV, Ferreira MV, Alvarenga KF, Martins CH, Costa AO, Jacob LC. Efeitos da exposição ao chumbo e ao ruído sob o sistema auditivo periférico e central: estudo eletrofisiológico. In: *Academia Brasileira de Audiologia, 18º Encontro Internacional de Audiologia.* Curitiba. 2003: 11-13.

Moore JK, Perazzo LM, Braun A. Time course of axonal myelination in the human brainstem auditory pathway. *Hear Res.* 1995; 87 (1-2): 21-31.

Moraes TFD, Gonçalves TS, Salvador KK, Lopes AC, Alvarenga KF, Feniman MR. Relationship between lead in the blood and performance in the abilities from hearing process Intl. *Arch. Otorhinolaryngol.* 2012; 16 (1): 39-43.

Moreira RF, Moreira J. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos a saúde. *Quim Nova.* 2004a; 27 (2): 251-60.

Moreira FR, Moreira JC. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Rev Panam Salud Publica.* 2004b; 15 (2): 119-29.

Moreira MFR, Neves EB. Uso do chumbo em urina como indicador de exposição e sua relação com chumbo no sangue. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 2008; 24 (9): 2151-9.

Mostafa GA, El-Shahawi HH, Mokhtar A. Blood lead levels in Egyptian children from high and low lead-polluted areas: impact on cognitive function. *Acta Neurol Scand.* 2009; 120 (1): 30-7.

Murata K, Araki S, Yokoyama K, Uchida E, Fujimura Y. Assessment of central, peripheral, and autonomic nervous system functions in lead workers: neuroelectrophysiological studies. *Environ Res.* 1993; 61 (2): 323-36.

Murata K, Araki S, Yokoyama K, Nomiyana K, Nomiyana H, Tao YX, Liu SJ. Autonomic and central nervous system effects of lead in female glass workers in China. *Am J Ind Med.* 1995; 28 (2): 233-44.

Musiek FE, Bornstein SP, Hall III JW, Schwaber MK. Audiometria de tronco encefálico (ABR): neurodiagnóstico e aplicações intra-operatórias. IN: Katz J, org. *Tratado de Audiologia Clínica.* 4ª. Ed. São Paulo: Manole. 1999. p. 349-71.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger princípios de bioquímica.* 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

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. 1988; 9 (6): 255-62.

Nothwang HG, Becker M, Ociepka K, Friauf E. Protein analysis in the rat auditory brainstem by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Molecular Brain Research. 2003; 116 (1-2): 59-69.

O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem. 1975; 250 (10): 4007-21.

Olympio KPK, Oliveira PV, Naozuka J, Cardoso MRA, Gunther WMR, Bechara EJH. Surface dental enamel lead levels and antisocial behavior in Brazilian adolescents. The Toxicologist (Supplement to Toxicological Sciences). 2009; 108 (1): 76-77.

Osman K, Pawlas K, Schutz A, Gazdzik M, Sokal JÁ, Vahter M. Lead exposure and hearing effects in children in Katowice, Poland. Environ Res. 1999; 80 (1): 1-8.

Otto D, Robinson G, Baumann S, Schroeder S, Mushak P, Kleinbaum D, Boone L. 5-year follow-up study of children with low-to-moderate lead absorption: electrophysiological evaluation. Environ Res. 1985; 38: 168-186.

Otto DA, Fox DA. Auditory and visual dysfunction following lead exposure. Neurotoxicology. 1993; 14 (2-3): 191-207.

Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. Cell Mol Life Sci. 2001; 58 (7): 902-20.

Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. J Mass Spectrom. 2001; 36 (10): 1083-91.

Prins JM, Brooks DM, Thompson CM, Lurie DI. Chronic low-level Pb exposure during development decreases the expression of the voltage-dependent anion channel in auditory neurons of the brainstem. NeuroToxicology. 2010; 31 (6): 662-73.

Reed T, Perluigi M, Sultana R, Pierce WM, Klein JB, Turner DM et al. Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: insights into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis. 2008; 30 (1): 107-20.

Reinders J, Sickmann A. Proteomics: Methods and protocols. New York, Humana Press, 2002: 71-72.

Rison SC, Hodgman TC, Thornton JM. Comparison of functional annotation schemes for genomes. Funct Integr Genomics. 2000; 1 (1): 56-69.

Ricard D, Stankoff B, Bagnard D, Aguera M, Rogemond V, Antoine JC et al. Differential expression of collapsin response mediator proteins (CRMP/ULIP) in

subsets of oligodendrocytes in the postnatal rodent brain. *Mol Cell Neurosci.* 2000; 16 (4): 324-37.

Romand R, Sans A, Romand MR, Marty R. The structural maturation of the stato-acoustic nerve in the cat. *J Comp Neurol.* 1976; 170 (1): 1-15.

Rothenberg S, Davis H. Auditory evoked response in chinchilla: Application to animal audiometry, Attention, Perception & Psychophysics. 1967; 2 (9): 443-7.

Rothenberg SJ, Poblano A, Garza-Morales S. Prenatal and perinatal low level lead exposure alters brainstem auditory evoked responses in infants. *Neurotoxicology.* 1994; 15 (3): 695-9.

Rothenberg SJ, Poblano A, Schnaas L. Brainstem auditory evoked response at five years and prenatal and postnatal blood lead. *Neurotoxicol Teratol.* 2000; 22 (4): 503-10.

Ruff HA, Markowitz ME, Bijur PE, Rosen JF. Relationships among blood lead levels, iron deficiency, and cognitive development in two-year-old children. *Environ Health Perspect.* 1996; 104 (2): 180-5.

Salamy A, McKean CM, Buda FB. Maturation changes in auditory transmission as reflected in human brain stem potentials. *Brain Research, San Francisco.* 1975; 96 (2): 361-6.

Salvato F, Carvalho MCG, Leite AL. Strategies for Protein Separation. In: Leung HCE, editor. *Integrative Proteomics.* Croatia: InTech; 2012. p. 3.

Sanin LH, Cossio TG, Romieu I, Avila MH. Acumulación de plomo en hueso y sus efectos en la salud. *Salud Publica Mex.* 1998; 40 (4): 359-68.

Saryan LA, Zenz C. Lead and its compounds. In: Zenz OC, Dickerson B, Horvath EP, eds. *Occupational medicine.* 3ª ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 1994; 506-41.

Schochat E. Avaliação eletrofisiológica da audição. In: Ferreira LP, Befi-Lopes DM, Limongi SCO. *Tratado de Fonoaudiologia.* São Paulo: Roca; 2004. p. 656-68.

Shaw NA. Effects of low pass filtering on the brainstem auditory evoked potential in the rat. *Exp Brain Res.* 1987; 65 (3): 686-90.

Shaw NA. The auditory evoked potential in the rat - a review. *Prog Neurobiol.* 1988; 31 (1): 19-45.

Shoshan-Barmatz V, Gincel D. The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys.* 2003; 39 (3): 279-92.

Silva IFTM. Análise das diferentes classes da fosfatase ácida e estudo morfohistopatológico em órgãos de ratos intoxicados por chumbo. [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas. 2000.

- Siqueira EMA, Almeida SG, Arruda S. Papel adverso do ferro no organismo. *Comun Ciênc Saúde*. 2006; 17 (3): 229-36.
- Shipley C, Buchwald JS, Norman R, Guthrie D. Brain stem auditory evoked response development in the kitten. *Brain Research*. 1980; 182 (2): 313-26.
- Shnerson A, Pujol R. Age-related changes in the C57B1/6J mouse cochlea. I. Physiological findings. *Develop Brain Res*. 1982; 2: 65-75.
- Skerfving S. Inorganic lead. In: Beije B, Lundberg P, editors. *Criteria documents from the Nordic Expert Group 1992*. Stockholm: Arbete och Hälsa. 1993; 125-238.
- Smith RD, Osterloh JD, Flegal AR. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from skeleton. *Environ Health Perspect*. 1996; 104 (1): 60-6.
- Sousa LCA, Piza MRT, Alvarenga KF, Cóser PL. *Eletrofisiologia da audição e emissões otoacústicas: princípios e aplicações clínicas*. 2 ed. – Ribeirão Preto: Editora Novo Conceito. 2010.
- Starr A, Hamilton AE. Correlation between confirmed sites of neurological lesions and abnormalities of far-field auditory brainstem responses. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1976; 41 (6): 595-608.
- Tannu NS, Hemby SE. Methods for proteomics in neuroscience. *Progress in Brain Research*. 2006; 158: 41-82.
- Thiede B, Hohenwater W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F et al. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 2005; 35 (3): 237-47.
- Tilton RG, Haidacher SJ, Lejeune WS, Zhang X, Zhao Y, Kurosky A et al. Diabetes-induced changes in the renal cortical proteome assessed with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2007; 7 (10): 1729-42.
- Toscano CD, Guilarte TR. Lead neurotoxicity: From exposure to molecular effects. *Brain Res Rev*. 2005; 49 (3): 529-54.
- Tosk JM, Farag M, Ho JY et al. The effects of nerve growth factor and ganglioside GM1 on the anti-proliferative activity of cocaine in PC12 cells. *Life Sci*. 1996; 59 (20): 1731-7.
- Tsalev DL, Zaprianov ZK. In: *Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice*. 2nd Ed. Boca Raton: CRC Press; 1985.
- 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*. 2001; 55 (2): 247-51.
- Wang WG, Wang YM, Feng LD. Effect of plumbism on auditory brainstem response of children. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2005; 40 (12): 896-8.

Wang Q, Luo W, Zheng W, Liu Y, Xu H, Zheng G et al. Iron supplement prevents lead-induced disruption of the blood–brain barrier during rat development. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007a; 219 (1): 33-41.

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. *Neurotoxicol*. 2007b; 28 (4): 850-9.

Wang X, Su B, Zheng L, Perry G, Smith MA, Zhu X. The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2009; 109 (1): 153-9.

Watson WS, Morrison J, Bethel MI, Baldwin NM, Lyon DT, Dobson H, Moore MR, Hume R. Food iron and lead absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 1986; 44 (2): 248-56.

Westermeier R, Naven T. *Proteomics in Practice: A laboratory manual of proteome analysis* - Weinhein, ed. Wiley-VCH, 2002.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteins projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996; 13: 19-50.

Wooden SK, Li LJ, Navarro D, Qadri I, Pereira L, Lee AS. Transactivation of the grp78 promoter by malfolded proteins, glycosylation block, and calcium ionophore is mediated through a proximal region containing a CCAAT motif which interacts with CTF/NF- κ B. *Mol Cell Biol*. 1991; 11 (11): 5612-23.

Wright RO, Shannon MW, Wright RJ, Hu H. Association between iron deficiency and low-level lead poisoning in an urban primary care clinic. *Am. J. Public Health*. 1999; 89 (7): 1049-53.

World Health Organization. *Environmental Health Criteria 3: Lead*, United Kingdom. 1977.

World Health Organization. *International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead*, Finland: Vammala. 1995.

Yip R, Norris TN, Anderson AS. Iron status of children with elevated blood lead concentrations. *J Pediatr*. 1981; 98 (6): 922-5.

Yip R, Dallman PR. Developmental changes in erythrocyte protoporphyrin: the roles of iron deficiency and lead toxicity. *J Pediatr*. 1984; 104 (5): 710-3.

Zou C, Zhao Z, Tang L, Chen Z, Du L. The effect of lead on brainstem auditory evoked potentials in children. *Chin Med J (England)*. 2003; 116 (4): 565-8.

Anexos

ANEXO 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. **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 019/2009

Bauru, 6 de agosto de 2009.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado *"Potencial evocado auditivo relacionado a eventos e análise proteômica e morfológica em cótex auditivo de ratos submetidos tratamento subcrônico com chumbo: efeito protetor da suplementação com Ferro"*, de autoria de Josilene Luciene Duarte foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator aprovando o projeto foi aceito *"ad referendum"* desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO 2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

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 019/2009

Bauru, 01 de junho de 2010.

Senhora Professora,

Autorizamos a inclusão das alunas Fernanda Zucki e Maria Cecília de Freitas Ferreira, conforme solicitação de Vossa Senhoria, no do projeto de pesquisa ***"Potencial evocado auditivo relacionado a eventos e análise proteômica e morfológica em córtex auditivo de ratos submetidos tratamento subcrônico com chumbo: efeito protetor da suplementação com Ferro"*** de autoria de Josilene Luciene Duarte, sob sua orientação, considerando não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO 3. Quadros referentes aos spots do tronco encefálico que apresentaram diferença significativa de expressão nas comparações entre os grupos.

Quadro 2. Spots do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Controle e Experimental 1. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada spot.

MATCH ID	Controle	Experimental 1	*p
1	2,42337	1,42729	0,043302
2	2,21456	2,04433	0,013327
9	1,46166	2,20587	0,038184
12	1,57816	2,91194	0,029152
20	2,01095	4,45918	0,010833
27	2,14851	2,11167	0,013064
38	2,00062	2,37586	0,013008
56	2,64273	2,63251	0,006190
64	2,03844	1,62831	0,025758
71	4,79644	1,78757	0,018254
84	1,62728	1,69217	0,029592
85	1,35924	1,66209	0,048289
92	2,72112	1,87782	0,014683
93	2,3917	2,09773	0,011475
94	1,65212	1,43833	0,040275
98	4,11227	1,56618	0,032279
102	1,76079	5,12864	0,019719
107	2,55368	17,2187	0,004086
120	2,85158	1,43481	0,044236
122	1,94395	1,70653	0,023178
126	1,80795	2,50638	0,017124
128	2,55819	2,45776	0,007439
130	3,65264	3,19262	0,002482
132	4,26031	2,02386	0,010531
136	6,10803	2,2805	0,006389
137	1,61071	1,49492	0,037051
139	4,34666	2,21929	0,007215
140	2,50716	2,59246	0,007005
141	2,75582	5,82713	0,002924
155	1,58073	1,34794	0,049607
158	2,60292	1,99572	0,012254
160	2,90864	7,6144	0,002267
161	1,96321	3,10704	0,012139
165	2,92891	3,48536	0,003255
168	4,77194	1,91001	0,013602
169	1,72053	2,04183	0,021893
170	4,57681	2,60482	0,003858
171	4,51775	2,4828	0,004631
176	2,32155	2,18931	0,010842
177	1,64736	16,7318	0,029916
179	2,28178	2,42089	0,009383
185	1,6998	1,92736	0,023572
187	4,41171	26,3842	0,000368
190	1,79689	1,44145	0,039372
199	3,89961	2,85674	0,003103
201	1,5574	1,88427	0,030381

207	1,83384	2,01173	0,018928
208	13,1512	1,72382	0,024025
213	4,25421	1,73926	0,020273
214	2,17798	2,07896	0,013174
215	4,49071	2,0248	0,010525
224	3,76637	3,65299	0,001765
226	2,25503	5,06712	0,006697
231	5,08573	3,99147	0,000919
234	2,44783	2,63784	0,007159
249	1,63534	2,26977	0,024793
257	1,82981	1,97234	0,019451
258	1,72373	1,63594	0,028648
259	4,28147	20,7443	0,000420
261	6,09817	3,25168	0,001538
267	2,62926	2,60246	0,006378
284	1,36529	1,4273	0,049857
289	1,76366	3,8654	0,018814
299	3,29483	4,28007	0,001884
306	6,53574	2,38128	0,005310
308	2,18851	3,85128	0,007748
312	2,58452	7,38979	0,003737
319	2,35864	1,47563	0,037228
321	4,43949	4,69742	0,000801
322	5,71848	4,00108	0,000804
323	1,54479	1,70186	0,032852
324	2,67905	3,25861	0,004422
325	3,07553	3,30094	0,003139
326	1,75586	2,39911	0,019147
327	1,60633	1,49537	0,037113
328	2,37541	1,67463	0,022644
333	1,81196	2,50632	0,016996
334	2,31104	2,4506	0,008981
345	6,29029	1,52508	0,038976
347	1,65372	2,85155	0,023844
349	1,64214	4,11312	0,026065
352	1,56218	1,45299	0,040490
353	2,01955	2,40506	0,012554
359	2,09596	1,62518	0,025699
362	2,04838	2,33548	0,012466
367	11,4818	9,06241	0,000036
369	2,27775	1,50162	0,034386
370	1,73325	7,72259	0,022339
371	3,64643	6,75356	0,000971
372	3,61889	3,96634	0,001650
375	3,12876	9,37092	0,001645
376	4,73891	3,59815	0,001322
384	7,74692	4,33259	0,000493
390	2,70414	1,87229	0,014859
391	1,88094	1,83034	0,020687
392	2,04526	1,77229	0,020215
395	1,36719	1,55716	0,047526
397	2,31886	8,70962	0,006049
408	3,17243	1,99002	0,011498
413	1,40058	1,54733	0,044529
420	1,41127	1,91147	0,042770

424	2,03026	2,36092	0,012601
427	5,99891	3,06967	0,001915
450	3,77819	3,35315	0,002110
456	2,42126	3,79209	0,005383
472	2,16126	2,74685	0,009337
478	2,41326	3,40658	0,005759
480	1,58603	2,76072	0,028274
484	3,82067	5,97041	0,000894
515	1,54889	2,85132	0,031485
520	1,93672	1,88486	0,018802
546	3,89624	1,95847	0,012056
550	3,11595	1,64266	0,024819
552	1,98828	1,71381	0,022533
556	3,30763	2,09952	0,009360

ANOVA $p < 0,05$

Quadro 3. *Spots* do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Controle e Experimental 2. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot*.

MACTH ID	Controle	Experimental 2	p*
1	1,59888	1,63087	0,032041
11	1,87012	1,39139	0,045036
29	5,4914	1,49434	0,041958
56	1,74765	1,62324	0,028679
57	2,00534	5,72776	0,011170
58	3,26742	1,41433	0,048901
66	1,3488	1,61561	0,049516
98	3,62144	1,63699	0,025843
116	1,75278	1,66556	0,027113
129	4,41042	3,83502	0,001228
137	1,4501	1,95378	0,038635
139	1,57855	8,18546	0,034373
142	6,79159	4,09668	0,000648
148	2,89132	2,6109	0,005461
160	1,60339	1,79274	0,028839
165	1,62666	1,4611	0,038868
167	1,52217	1,46611	0,040726
168	3,28335	1,49202	0,038372
204	4,97006	3,86729	0,001027
206	2,21043	1,89708	0,015907
220	2,30626	2,38597	0,009392
232	2,62586	1,53238	0,032431
258	1,57909	1,44348	0,040799
268	1,56662	1,41761	0,042886
272	3,91482	1,75234	0,019382
296	3,00014	2,85027	0,004285
306	6,54223	6,67969	0,000189
308	1,96316	1,71263	0,022791
321	2,17539	2,05998	0,013436
322	3,91271	3,84113	0,001491
331	5,27804	2,01985	0,010743
335	1,74867	1,45322	0,038447
337	1,89075	1,77666	0,021751
343	1,76382	1,35857	0,048851
345	11,3248	1,94859	0,013592

359	5,1753	2,81071	0,002795
371	2,10809	1,50515	0,033745
372	2,37516	1,42776	0,042996
376	1,74087	1,54019	0,032574
384	5,91401	2,16712	0,007960
387	3,24052	1,81847	0,016291
389	1,50442	1,61126	0,036528
391	2,0274	1,46173	0,037627
399	2,9456	4,73966	0,002457
420	1,69424	3,04374	0,021710
427	4,50653	1,50548	0,039294
472	1,62109	1,79715	0,028030
478	1,88737	1,43903	0,039640
556	2,10905	1,41221	0,043627

ANOVA $p < 0,05$

Quadro 4. *Spots* do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Controle e Experimental 3. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot*.

MACTH ID	Controle	Experimental 3	p*
6	1,38043	1,72865	0,045836
9	1,99019	2,61687	0,012320
25	2,23949	1,56849	0,028927
26	1,63258	3,67678	0,026226
29	2,62796	1,58825	0,027902
64	1,80492	2,66949	0,016976
84	1,48966	1,46375	0,041902
92	2,13477	4,07548	0,008476
97	1,71469	1,6735	0,027645
110	3,32401	2,60251	0,004686
112	2,16071	2,78345	0,009251
120	1,63623	1,4791	0,037550
126	2,01766	2,08293	0,014894
133	1,73016	1,48337	0,036225
141	2,48666	1,40993	0,046069
142	8,23233	2,92858	0,002190
149	2,74844	1,54541	0,031558
174	1,94546	1,42003	0,041873
175	1,63681	1,90241	0,026233
193	2,00276	1,40678	0,043753
203	1,43433	2,61271	0,043263
208	5,63319	4,35568	0,000642
222	2,05013	1,42038	0,042290
239	1,85755	1,63404	0,026782
241	1,37791	1,90054	0,047015
257	1,48002	7,72564	0,045672
261	4,31306	2,78082	0,003147
262	2,1414	2,29575	0,011524
267	1,48363	2,13121	0,035730
274	1,64403	2,9014	0,024483
278	3,14279	5,52179	0,001815
280	1,85587	1,54577	0,031247
282	2,245	2,06915	0,012762
285	2,81892	1,70748	0,020915

306	3,47653	3,44072	0,002292
308	2,18304	2,02064	0,013914
322	2,0904	1,55565	0,029865
336	1,45339	1,52809	0,041258
343	1,79805	1,71477	0,024830
345	13,2094	3,95425	0,000601
353	1,52939	2,62682	0,032705
357	1,41548	2,58094	0,045754
369	1,73453	1,39804	0,043808
388	2,52503	1,8486	0,015854
398	4,77643	2,00394	0,011037
411	2,02393	2,56719	0,011856
415	3,27032	3,95075	0,002108
500	1,51067	1,3531	0,049362
511	2,25722	2,8512	0,008008
524	2,00881	2,34584	0,013022
525	1,58904	1,39442	0,044611

ANOVA $p < 0,05$

Quadro 5. Spots do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Controle e Experimental 4. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada spot.

MACTH ID	Controle	Experimental 4	p*
6	1,84127	2,06589	0,018239
9	3,09411	4,01164	0,002401
10	2,63704	2,1456	0,009849
16	2,10168	1,40402	0,014673
58	7,52529	2,40531	0,005103
64	3,12582	2,25679	0,007505
67	1,85404	2,52197	0,015708
68	1,97942	2,03007	0,016037
94	1,85633	2,77517	0,015226
104	1,38142	1,60373	0,045791
110	4,07872	1,57038	0,031840
115	1,62505	1,91356	0,026661
116	3,03032	1,7118	0,020792
120	2,69128	1,56219	0,030016
121	2,16341	3,83071	0,008106
126	2,77487	2,09248	0,010205
129	5,30905	2,30344	0,006120
138	1,46186	1,53318	0,040647
139	190238	164598	0,025846
142	8,15844	4,61072	0,000386
164	1,78112	7,27877	0,019597
170	2,69352	2,50843	0,006594
193	4,14136	1,54796	0,034085
213	2,46217	1,44142	0,041644
222	2,1463	1,58711	0,027748
224	6,76789	1,48753	0,044014
235	3,64494	1,95169	0,012230
239	3,72047	3,20407	0,002399
245	1,5275	2,19047	0,031976
247	2,35671	4,77775	0,005615
256	2,04327	1,39943	0,044947

261	4,12475	1,45073	0,045770
262	4,31469	2,1994	0,007484
276	4,54759	1,74761	0,020041
278	3,83827	2,02629	0,010049
280	2,77344	1,89146	0,014242
282	1,76115	1,50782	0,034312
285	4,56466	1,62618	0,027734
299	2,12645	3,36939	0,008892
303	1,43193	1,40261	0,047260
306	5,47932	6,52856	0,000292
311	5,67434	1,72464	0,021972
334	2,94638	3,27436	0,003489
335	1,80215	1,53977	0,031991
338	1,43651	1,41325	0,046487
343	2,00711	2,22134	0,013822
345	39,5097	4,89256	0,000235
351	2,2822	1,80883	0,017757
359	1,46858	5,7949	0,000128
361	2,40955	1,48843	0,036058
364	3,03711	1,55339	0,031495
366	2,1087	2,21669	0,012489
371	3,52412	2,24828	0,007183
372	4,08155	1,96915	0,011796
375	2,26651	2,23537	0,010813
377	2,73248	7,0975	0,002956
392	1,83898	2,68641	0,015855
398	2,87165	1,48646	0,037799
399	2,50072	1,80424	0,017255
408	3,03839	1,9733	0,011970
411	1,66571	1,68189	0,028644
414	1,39714	1,83296	0,044157
456	3,06737	1,49867	0,037020
461	4,59791	3,23474	0,001856
464	4,04505	1,61967	0,027649
510	2,12768	2,99749	0,009849
525	2,03516	1,4247	0,041698
551	2,464	3,2752	0,005554

ANOVA $p < 0,05$

Quadro 6. *Spots* do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Controle e Experimental 5. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot*.

MACTH ID	Controle	Experimental 5	p*
4	2,4025	1,82947	0,016726
20	1,9259	1,71714	0,023009
82	3,80847	3,06088	0,002616
98	3,09984	1,79116	0,017305
116	3,149	1,42181	0,047304
118	1,49828	2,42965	0,035127
129	4,32008	3,0507	0,002337
132	2,99366	1,5797	0,029179
141	3,0041	1,4579	0,041707
142	7,73786	6,17078	0,000170
146	1,98552	1,57972	0,028587

178	1,48605	1,69225	0,036391
199	3,44479	11,5192	0,001082
261	4,17534	2,26776	0,006661
267	1,51185	1,68235	0,034914
268	1,88171	3,42537	0,014190
272	1,60244	1,6038	0,032705
278	4,45308	5,93798	0,000568
280	4,22393	4,36512	0,001011
282	1,41101	1,59041	0,043124
284	1,88013	2,14603	0,016715
285	2,90746	2,79491	0,004692
295	1,79815	2,41358	0,017651
308	1,50147	2,6891	0,035598
311	3,96183	3,73418	0,001545
321	1,56826	1,66077	0,032496
322	2,02188	2,3992	0,012543
331	6,06114	3,51713	0,001166
340	2,45821	3,38913	0,005454
345	43,0626	9,33183	0,000015
346	2,13233	4,35155	0,008481
348	1,58273	1,4079	0,043471
351	1,58944	1,42009	0,042387
369	3,5043	2,79214	0,003664
371	2,42259	1,57198	0,028816
372	3,42585	1,77235	0,018175
388	10,7693	1,94648	0,013601
398	8,82596	7,28498	0,000092
402	2,71727	2,67981	0,005706
408	2,95214	1,91263	0,013494
428	1,41012	1,81488	0,042592
450	1,68994	1,50725	0,035082
461	4,88744	2,10114	0,009019
464	3,14155	1,78271	0,017645
483	1,42952	1,93495	0,040763
488	1,67978	2,24397	0,022629
502	1,53263	1,73717	0,033037
532	1,4508	1,38917	0,047448
556	2,32221	1,56792	0,029011

ANOVA $p < 0,05$

Quadro 7. Spots do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Experimental 1 e 2. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada spot.

MACTH ID	Experimental 1	Experimental 2	p*
2	1,89724	2,16354	0,016222
6	1,84706	2,3855	0,016287
11	1,52503	1,54418	0,037352
12	1,72484	3,36982	0,020358
20	1,89795	3,99513	0,013766
25	2,10527	1,98983	0,015066
27	2,1956	1,96438	0,014711
37	2,40118	2,25813	0,009698
38	1,36019	1,47335	0,0491831
43	1,82458	28,0574	0,019305

45	1,6533	1,89796	0,02558
54	14,4594	3,11028	0,00167989
84	2,16722	1,57427	0,0285504
87	1,48481	2,29848	0,0360749
92	4,94841	2,2712	0,006506
93	5,25753	2,04923	0,010084
96	1,83868	1,57675	0,0296335
113	1,39573	1,86043	0,0444435
116	1,54712	1,57367	0,035551
121	1,98059	2,12743	0,015001
125	1,52849	1,56324	0,0366077
128	2,6951	6,87493	0,00313757
129	7,03008	4,85279	0,000370
130	1,35908	1,61913	0,0482464
139	34,3796	1,97917	0,013441
140	2,85654	2,95456	0,00437633
142	3,21038	3,31593	0,00285387
158	3,98858	2,00212	0,011008
160	1,71484	2,88559	0,02057
162	2,64005	2,17582	0,009474
165	5,58128	3,61623	0,00112187
168	2,52028	2,70214	0,006498
169	2,20507	1,81829	0,017853
170	2,61175	3,01981	0,005154
171	2,46045	2,20394	0,009893
177	32,5868	4,16111	0,000475
178	3,43256	2,67217	0,00422194
187	28,334	11,0325	0,00000908
189	1,8222	1,64553	0,0267368
199	3,52771	2,59389	0,00449564
204	6,32783	1,8694	0,015470
206	1,96663	3,31738	0,011940
212	2,71081	1,70853	0,020849
213	2,04482	1,77971	0,020000
218	2,04745	1,72771	0,0216052
226	1,45248	5,5554	0,0477991
231	3,62475	6,76009	0,000992
232	2,40362	6,66656	0,0051022
233	5,62775	2,54869	0,00401858
234	2,69464	1,89264	0,014328
238	2,36105	2,81667	0,007177
240	2,17745	4,97162	0,007756
251	1,67995	2,16446	0,022856
253	2,43253	4,56863	0,00499405
258	3,02348	2,76353	0,00451932
259	21,089	2,47473	0,00476035
261	3,89943	3,26607	0,00215134
264	1,54014	1,75612	0,0324051
267	3,463	6,38128	0,0012001
268	1,97761	2,90119	0,012029
269	1,85851	2,73201	0,015213
289	1,89342	6,75385	0,014714
296	4,77321	1,74017	0,020575
299	3,59841	8,41512	0,000945
312	5,41191	11,0693	0,000185

313	2,07187	1,62344	0,02587
315	1,87878	1,66406	0,025365
321	2,04178	2,24184	0,013160
322	1,76139	1,49647	0,0350728
324	3,0033	2,79198	0,00446556
325	1,59211	2,56746	0,0275454
326	1,75208	2,35544	0,019388
331	2,08405	2,3315	0,011992
333	1,5366	1,68904	0,0334658
334	1,87338	2,79851	0,014707
335	1,58526	1,35368	0,0489123
345	2,5265	2,64911	0,006665
347	1,50918	2,95741	0,0355783
349	4,21381	3,68788	0,00144078
358	2,02424	1,6	0,0277292
359	4,57736	3,71967	0,00125959
362	2,21482	2,22369	0,011347
367	7,46903	3,25148	0,00144711
371	11,3367	3,16745	0,0015501
372	6,65662	2,55345	0,00394191
373	2,23087	1,85738	0,016696
375	12,9578	3,45532	0,00106367
376	4,80787	4,99547	0,000609
377	1,4374	1,3943	0,0475533
380	1,46823	3,92299	0,0429303
384	7,25377	4,00707	0,000671
387	1,79474	2,04018	0,019629
389	2,31589	3,29462	0,006702
390	3,08046	1,86043	0,014898
392	3,8968	1,99172	0,011248
395	1,89028	1,53879	0,0314985
397	6,04463	3,79856	0,000902
399	3,4083	6,75042	0,00124296
413	5,65065	2,09391	0,009223
415	1,64906	1,80739	0,0268023
456	1,60953	6,09892	0,0303891
467	4,23236	1,61838	0,0279749
472	4,57106	5,18542	0,000638
501	2,19359	2,89685	0,008600
550	10,9669	1,52838	0,0407601

ANOVA $p < 0,05$

Quadro 8. Spots do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Experimental 1 e 3. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada spot.

MACTH ID	Experimental 1	Experimental 3	p*
6	3,74548	3,12681	0,00252588
12	6,56978	2,15815	0,0081627
25	3,23819	2,01622	0,0109098
27	2,88603	3,33001	0,00357716
33	1,43249	2,02386	0,0407423
37	2,62809	2,80049	0,0056429

38	2,5557	2,11836	0,0104796
56	2,45519	1,90714	0,0145456
78	2,16584	2,18942	0,0121113
84	3,33592	3,00494	0,00324957
93	2,0423	10,9493	0,0109402
97	1,84621	1,86451	0,0206484
110	3,62468	2,59755	0,00438603
113	1,46167	1,59318	0,0393519
121	1,71713	2,222	0,0211139
128	2,47136	2,91064	0,0061676
129	5,34845	1,51518	0,039248
139	1,40514	1,52972	0,0444429
142	3,94561	2,5392	0,00448735
149	1,98982	1,44389	0,0393687
168	2,416	1,98163	0,0131607
169	1,94573	1,78847	0,0207492
171	2,36791	1,38606	0,0490081
177	30,3989	4,0002	0,000564
179	1,89703	1,66236	0,0252408
187	27,095	8,16954	0,0000288
201	3,04727	1,92889	0,0130045
204	1,44378	2,62002	0,0420442
209	1,44732	1,506	0,0422148
211	1,64187	1,35812	0,0483854
213	1,78451	1,83666	0,0224043
218	2,06698	3,32236	0,0098976
224	4,95651	1,72197	0,0216953
226	9,92195	2,15345	0,0085268
231	3,22103	3,09588	0,00322434
232	5,38508	2,33067	0,0058249
233	5,29135	1,74614	0,0205684
234	2,24344	1,84941	0,0168282
238	2,78814	1,789	0,0174456
241	1,44522	2,02724	0,0393416
251	4,30853	8,0034	0,000493
253	2,53578	2,33627	0,0083605
258	3,06785	1,97617	0,0118804
259	28,9427	3,63073	0,000863
261	5,15661	6,05869	0,000378
264	2,822	2,74851	0,0050946
267	4,06169	8,28106	0,000599
268	2,43971	1,73444	0,0198976
274	1,58434	4,58353	0,0312399
278	3,33415	6,9217	0,00133888
280	1,82985	2,17121	0,0177404
284	2,03285	2,89677	0,0109565
289	4,58904	1,82622	0,0165005
295	6,63741	1,79094	0,0189011
299	3,00156	2,49095	0,0058429
306	1,51016	3,01498	0,0356347
312	5,69135	3,63289	0,0010895
321	3,76499	2,66683	0,0039330
322	2,05943	1,84882	0,0181233
323	1,66989	1,94145	0,0245385
324	3,93541	11,1146	0,000626

325	4,0829	5,36618	0,000811
328	2,66974	1,89205	0,0143861
334	2,50195	1,61978	0,0256494
336	1,65582	1,70799	0,0283219
344	2,15422	5,09586	0,0081193
345	2,83617	5,47629	0,00265497
349	6,34656	3,06723	0,00188926
352	1,45512	1,52628	0,0411995
356	2,10095	9,08088	0,0094644
357	2,54346	3,98137	0,00444215
359	2,90456	1,62599	0,0256504
362	3,58594	2,48378	0,0050882
367	4,84553	1,51113	0,0391131
369	2,18256	2,63237	0,009422
370	8,28617	2,47934	0,00448452
371	10,5871	2,81758	0,00257654
372	6,38912	2,41411	0,0050064
375	14,4457	3,08929	0,00173068
379	6,96818	6,0784	0,000206
384	4,9624	3,95424	0,000970
390	1,98414	2,09574	0,0152475
392	2,14549	2,38714	0,0109127
394	1,41791	1,47018	0,0450415
393	1,48674	1,37487	0,0476637
395	1,87596	1,8497	0,0203884
397	8,29907	5,62906	0,000202
399	2,2704	1,97913	0,0139526
411	3,30784	3,23442	0,00282458
415	6,84141	3,94895	0,000730
420	2,42789	1,7984	0,0176072
424	3,24627	1,91494	0,0132649
426	1,60069	1,35026	0,0493181
456	7,58716	1,96054	0,0127275
464	1,96027	1,56716	0,0294298
472	3,32138	2,68251	0,00431756
476	1,82258	1,83494	0,0216313
477	1,62005	2,00012	0,0263495
480	5,94805	1,61111	0,030149
484	5,69187	1,75326	0,0204015
488	1,81794	2,03705	0,0190597
496	1,541	1,9976	0,0310088
500	1,69239	1,43271	0,0404717
520	1,46989	2,08298	0,03695
527	1,78977	1,40897	0,0426717
550	1,551	3,75394	0,0331417

ANOVA $p < 0,05$

Quadro 9. *Spots* do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Experimental 1 e 4. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot*.

MACTH ID	Experimental 1	Experimental 4	p*
6	4,88487	2,9908	0,00229512
9	4,26402	2,79712	0,00310801
22	1,74247	4,50436	0,0202784
25	1,50091	1,73079	0,0350272
27	3,24137	2,24805	0,00744976
37	2,27151	1,7087	0,0213026
38	2,31694	1,40551	0,0457473
79	2,15199	4,496	0,00815815
84	2,27539	1,72922	0,0204711
85	2,14932	1,75908	0,01993
92	1,71346	2,07277	0,021945
93	1,82181	3,80881	0,0163284
96	1,94029	2,59938	0,0133855
104	1,82864	2,57317	0,0163466
110	4,47968	1,56905	0,0325169
115	1,85803	1,76163	0,022606
116	2,75801	1,66483	0,0231286
121	2,7105	6,83317	0,00306527
129	8,19926	2,67379	0,00322753
130	1,61329	1,4514	0,0397251
135	1,64147	1,4711	0,037994
139	1,38159	1,74977	0,0457581
142	3,9079	3,8742	0,00147054
149	3,00876	2,10782	0,00955307
152	1,73574	1,49924	0,0350917
164	1,47139	7,11494	0,0464862
165	2,86193	2,30802	0,00750404
168	2,46441	2,48164	0,00778415
171	2,57562	4,19022	0,00415454
177	23,6491	2,55655	0,00412867
181	2,69894	1,59084	0,0278187
187	18,7266	2,66105	0,0034059
188	2,84491	3,08206	0,004124
193	2,82771	1,44591	0,0426262
199	2,92971	5,45337	0,00235405
208	1,7759	3,0444	0,0179055
211	0,0231286	1,66035	0,0234755
213	2,2986	2,72574	0,00795657
224	10,1435	1,80588	0,0190463
226	6,34464	1,67371	0,0255707
231	3,67221	6,51025	0,000965
232	3,4984	1,46952	0,0417104
233	4,47357	2,05728	0,00983985
235	1,78482	1,51477	0,0336752
238	2,64201	2,71253	0,00587826
239	1,78563	2,43455	0,0180141
240	4,37937	3,45917	0,00160852
245	2,67221	2,66207	0,00594835
247	3,61449	4,52039	0,00137858
251	2,48309	1,56501	0,0294217
253	1,8511	2,07185	0,0179601

256	3,01822	1,61713	0,0264104
258	2,94178	1,41142	0,0480696
259	27,7658	2,55431	0,00417349
261	5,07344	2,33036	0,0058452
262	2,3	1,70682	0,0213099
267	2,99485	2,10049	0,00968434
268	2,16515	1,99715	0,0144141
276	1,54857	2,17721	0,0303407
278	3,91265	2,26616	0,00676733
280	2,24443	2,38449	0,00991895
289	3,32242	1,57821	0,0299064
295	3,06881	1,42669	0,0462693
296	1,34504	1,59146	0,0499651
299	1,99048	2,45761	0,0128302
311	2,73585	2,04364	0,01107
312	5,24929	2,45756	0,0046933
315	1,46692	2,1025	0,0372986
319	1,60093	1,37978	0,0459735
321	3,92009	2,93611	0,00285036
322	2,71377	1,93537	0,0132517
323	1,52148	2,89021	0,0341434
324	3,11195	1,99001	0,0115449
326	1,9255	1,62294	0,0266683
328	2,00822	2,91514	0,0113907
334	5,71062	5,97484	0,000308
335	1,37325	1,68654	0,0466103
342	1,50031	1,51291	0,03944
344	1,74025	1,57695	0,0307338
345	5,44658	5,52838	0,000392
347	7,56585	1,64354	0,0283855
349	7,88074	2,78206	0,00272598
350	3,17531	4,02669	0,00222777
351	2,89097	2,17817	0,00879832
352	1,58671	2,18447	0,0277333
353	2,62239	3,63201	0,00425321
359	10,0025	6,52924	0,000107
361	3,80231	1,57875	0,0306698
362	2,8546	2,80178	0,00481832
369	2,15341	2,43042	0,010592
371	14,4153	4,05158	0,000539
372	8,5894	3,1073	0,00170448
373	2,74515	5,668	0,00298528
375	18,2835	5,28722	0,000175
376	3,63051	1,55577	0,0324649
377	4,68757	10,408	0,000322
379	4,13578	1,92478	0,0129982
384	5,50157	3,01067	0,00212238
390	1,99014	1,94526	0,0170556
391	1,92154	2,84106	0,0133866
392	3,13101	6,79754	0,00171438
393	1,50361	2,29099	0,0342336
397	9,62116	3,6712	0,000849
399	3,05018	2,36486	0,00663203
411	2,74154	2,12843	0,00977479
414	3,49267	2,70443	0,0040154

456	9,81796	2,0827	0,00991423
459	1,73751	1,36427	0,0479238
464	2,15292	2,15071	0,0126094
472	4,63814	2,18182	0,00769996
476	1,71371	1,81749	0,0245362
484	6,00641	2,04587	0,0102672
509	1,76243	1,57429	0,03056
550	1,36008	1,71412	0,0483716

ANOVA $p < 0,05$

Quadro 10. *Spots* do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Experimental 3 e 4. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot*.

MACTH ID	Experimental 3	Experimental 4	p*
9	1,80258	1,70687	0,0249784
25	1,47757	2,53456	0,0376461
64	2,73969	1,49588	0,0363427
68	2,35028	2,20747	0,0104756
92	3,20209	1,62311	0,0262537
94	2,73046	2,46969	0,00668976
112	2,946	1,61339	0,0265696
121	1,69271	2,38631	0,0217742
208	4,98889	1,86442	0,0152087
239	1,37738	1,41353	0,049496
247	1,77632	2,53281	0,0181556
262	2,46719	1,46765	0,0385095
265	1,97986	1,44193	0,0395488
284	1,66333	1,76737	0,0269254
306	1,97384	2,21958	0,0143767
345	6,36375	3,24069	0,00153219
348	1,40976	1,58021	0,0433433
353	3,11142	2,53613	0,00536688
356	4,07469	1,46049	0,044287
359	2,33296	3,49083	0,00634764
373	2,21422	4,98487	0,00723
414	1,66028	2,2636	0,0235106

ANOVA $p < 0,05$

Quadro 11. *Spots* do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Experimental 5 e 2. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot*.

MACTH ID	Experimental 5	Experimental 2	p*
11	2,91942	1,77537	0,0179263
20	1,6121	1,81071	0,0282398
43	17,3949	1,78407	0,0209213
50	2,04502	1,63788	0,0252623
57	1,45186	4,53107	0,0463956
66	1,54985	1,86336	0,0309549
72	1,43554	1,93417	0,0401055
73	1,41444	1,49147	0,0446106
82	2,93622	15,8223	0,00217369

92	1,83513	2,09452	0,0181464
119	1,48061	1,35858	0,0492078
124	3,97992	2,42983	0,00521431
160	1,39485	1,43384	0,0476473
167	2,05833	1,65535	0,0243877
177	1,4471	1,60974	0,0400789
182	1,45979	2,36108	0,0389892
203	4,37938	1,66301	0,0248915
206	2,21562	1,70117	0,0217801
278	5,06067	4,08088	0,000872
280	4,16489	5,44258	0,000755
284	2,61098	2,68277	0,00612463
295	4,02332	4,44804	0,00108661
306	5,38984	5,99032	0,000347
322	2,58902	2,13198	0,0101829
331	6,14214	3,46478	0,00122026
335	2,10404	2,20703	0,0126236
345	5,13069	2,91591	0,00245135
346	2,58879	1,57039	0,0291784
349	4,42476	2,30924	0,00614961
351	2,04477	3,08439	0,010499
353	3,03168	1,56275	0,0306636
359	1,47128	1,87053	0,0366038
360	2,56988	1,97154	0,0128127
363	1,99395	4,63776	0,0112567
366	1,78833	1,39546	0,0442079
369	2,62165	1,83029	0,0162151
376	1,50926	2,13047	0,0334204
381	1,58745	1,71275	0,0307033
387	3,24031	2,11811	0,00912724
389	2,15318	1,82939	0,0178669
397	7,51493	1,61299	0,0308868
428	1,39013	1,49425	0,0462822
454	1,60157	1,8532	0,0282699
472	1,52618	1,57728	0,0362994
484	12,7564	1,49711	0,0451269
485	1,63347	1,34725	0,0497593
488	3,08342	2,41009	0,00622568
492	3,88174	1,85178	0,0152546
501	1,51347	1,74377	0,0341042

ANOVA $p < 0,05$

Quadro 12. *Spots* do tronco encefálico com diferença significativa de expressão entre grupo Experimental 5 e 4. Os valores indicam a porcentagem de volume média para cada *spot*.

MACTH ID	Experimental 5	Experimental 4	p*
6	3,37566	1,83419	0,0157456
58	1,99452	2,19485	0,0142178
67	4,93046	2,56925	0,00397912
85	3,36583	1,53556	0,0338912
104	3,20574	2,902	0,00372367
149	2,16268	1,66294	0,02363
199	12,4201	4,92224	0,000252
203	7,35629	2,31751	0,00600256
235	2,0503	1,64842	0,0247422
247	2,35031	4,76879	0,0056779
250	2,47872	1,59712	0,0271043
262	2,60787	1,81018	0,0168781
275	5,01068	2,45346	0,00475257
276	2,09205	2,00717	0,0149451
284	3,17615	5,15333	0,0018145
295	3,20988	3,19871	0,00304587
299	8,63462	2,38839	0,00530018
302	1,65529	2,03505	0,0245085
306	4,43164	5,6983	0,000604
331	6,04851	1,71361	0,0228242
334	3,38392	2,82865	0,00368336
335	2,13365	2,37768	0,0111039
336	5,45083	1,71231	0,02257
359	3,70415	5,03535	0,00114227
364	98,5604	1,54601	0,0412905
366	3,73257	2,59399	0,00431688
375	1,50551	2,22357	0,0339062
377	2,30249	4,2799	0,00625349
393	2,67357	2,11991	0,0100735
398	2,692	1,5476	0,0312414
414	2,01157	2,78104	0,0115464
510	3,39298	4,60551	0,00160854

ANOVA p<0,05