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

MARCIO LUIZ LIMA TAGA

**Análise proteômica em cérebro de ratos
submetidos a tratamento subcrônico com chumbo:
influência da suplementação com ferro**

**BAURU
2015**

MARCIO LUIZ LIMA TAGA

**Análise proteômica em cérebro de ratos
submetidos a tratamento subcrônico com chumbo:
influência da suplementação 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: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

**BAURU
2015**

Taga, Marcio Luiz Lima

T126a Análise proteômica em cérebro de ratos submetidos a tratamento subcrônico com chumbo: influência da suplementação com ferro / Marcio Luiz Lima Taga. – Bauru, 2015.
103p. : il. ; 30cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

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

Marcio Luiz Lima Taga

Data:

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho por inteiro ao meu querido **Deus**, que proporcionou todas as situações possíveis e colocou anjos em nossos caminhos que nos auxiliaram para a concretização de mais esta etapa alcançada.

Aos meus filhos, **Maria Eduarda** e **Henrique**, crianças mais do que amadas, lutaram para vir para este mundo e chegaram cheios de amor e saúde. São a minha razão de viver e sempre querer ser uma pessoa melhor. Vocês me dão força para superar todas as dificuldades da vida. Hoje me sinto um homem mais completo.

Aos meus pais **Eulázio** e **Maria Silvia** que com todo esforço fizeram de mim um homem íntegro e com personalidade para que eu pudesse realizar meus objetivos de vida.

Dedico esta Tese a minha querida e amada esposa **Josilene** (Ninha), a quem eu escolhi como mãe dos meus filhos. Obrigado por deixar de viver momentos importantes em sua vida para me ajudar na concretização de mais esta etapa de minha vida. Sem você minha amada, hoje eu não estaria aqui fazendo este agradecimento, e não estaria com minha tese de doutorado pronta e maravilhosa.

Ao meu irmão **Marcel**, que esteve ao meu lado em momentos difíceis de minha vida, e não poupou esforços para me estender a mão.

Ao **Marcelo Taga**, meu irmão mais novo, por ser companheiro e estar sempre presente e cuidando de nosso pai. Considero você meu irmão de verdade. Conte comigo em todos os momentos da sua vida, que está apenas começando.

Aos meus queridos sogros **Walter** e **Ana**, meus segundos PAIS, por cuidaram dos meus filhos, e estarem sempre a disposição e prontos para ajudar.

A minha orientadora, **Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf**, por acreditar em mim, me ajudar, orientar e me incentivar. Sem a sua ajuda e compreensão, este lindo trabalho não seria concretizado.

Por fim, à **Faculdade de Odontologia de Bauru - USP**, onde convivi por muitos anos de minha vida, transformando-se na minha segunda casa.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores da Disciplina de Bioquímica, **Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf**, **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**, **Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães** pela atenção que me dispensaram e pelos brilhantes ensinamentos que me transmitiram.

Aos funcionários da Disciplina de Bioquímica, **Telma**, **Ovídio**, **Aline** e **Vera** pelos esforços e colaboração em minha Tese.

Aos funcionários do Biotério da FOB-USP, **Luiz**, **Erasmus**, **Elias** e **Richard**, pela colaboração e ensinamentos na fase inicial deste estudo.

Aos **funcionários** do departamento de Pós-Graduação e Biblioteca.

Agradeço em especial aos **animais experimentais** deste estudo, pois sem eles, não poderíamos realizar este estudo.

Agradeço de forma muito especial à **Telma**, **Fernanda Zucki**, **Mileni Rodrigues** e **Aline Leite** que colaboraram muito na análise proteômica e não mediram esforços na obtenção de uma Tese de qualidade. Agradeço também pelos ensinamentos e experiências a qual me transmitiram.

Agradeço também a **Thais**, funcionária do Departamento de Genética da USP (Piracicaba), pela atenção e ajuda na obtenção das imagens dos géis da eletroforese.

Agradeço a **Fernanda Zucki** pela grandiosa e sincera amizade!!!!

“À DESCOBERTA DO AMOR

Ensaia um sorriso e oferece-o a quem não teve nenhum. Agarra um raio de sol e desprende-o onde houver noite. Descobre uma nascente e nela limpa quem vive na lama. Toma uma lágrima e poussa-a em quem nunca chorou. Ganha coragem e dá-a a quem não sabe lutar. Inventa a vida e conta-a a quem nada compreende. Enche-te de esperança e vive á sua luz. Enriquece-te de bondade e oferece-a a quem não sabe dar. Vive com amor e fá-lo conhecer ao Mundo.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

O chumbo (Pb) é um metal pesado que pode ocasionar alterações em todos os sistemas. Porém os maiores danos à saúde ocorrem quando este acomete o sistema nervoso central (SNC). Muitos estudos demonstram as alterações clínicas/comportamentais causadas pela ação do Pb no SNC. Entretanto, ainda são necessários estudos que demonstrem as alterações bioquímicas causadas pelo Pb neste sistema. Por outro lado, tem sido relatado que o ferro (Fe) parece ter um efeito protetor na toxicidade cerebral causada pelo Pb. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a concentração de Pb no tecido cerebral, bem como realizar análise proteômica em cérebro de ratos intoxicados por Pb, submetidos à suplementação com Fe ou não. O experimento foi realizado com 30 ratos recém-desmamados (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar) divididos em 6 grupos (n=5/grupo), de acordo com o tratamento recebido por 6 semanas, a saber: Controle (não exposto ao Pb ou Fe), Controle Fe (exposto à administração de 20 mg/Kg p.c. de FeSO₄ a cada 2 dias, por gavagem gástrica), Pb 100 (exposto à água contendo 100 mg/L de Pb), Pb 400 (exposto à água contendo 400 mg/L de Pb) Pb100 + Fe (exposto à água contendo 100 mg/L de Pb e à gavagem com FeSO₄) e Pb400 + Fe (exposto à água contendo 400 mg/L de Pb e à gavagem com FeSO₄). Decorrido o período experimental, os animais foram eutanasiados e o cérebro dos animais foi removido, sendo descartados o cerebelo e o tronco encefálico. O restante foi submetido à concentração de Pb e à análise proteômica. Foi observada uma dose-resposta em relação à concentração de Pb no cérebro. A administração de FeSO₄ reduziu os níveis de Pb no cérebro, embora sem significância estatística. A análise dos géis com os *spots* proteicos demonstrou uma redução na quantidade destes de acordo com o tratamento recebido pelos grupos. O grupo controle mostrou a maior quantidade de *spots*, ao passo que os grupos que receberam a maior concentração de Pb (400 mg/L) apresentaram as menores quantidade de *spots*. Também houve uma diminuição na quantidade de *spots* detectados quando administrado FeSO₄. Dos *spots* que apresentaram diferença de expressão nas comparações entre o grupo controle e os grupos experimentais e os grupos experimentais comparados aos seus pares suplementados ou não com FeSO₄, 75 proteínas foram identificadas por espectrometria de massas, sendo 20 proteínas (26,0%) relacionadas à função de metabolismo, 21 proteínas (28,0%) relacionadas a estrutura e organização das estruturas, 22 proteínas (30,0%) relacionadas à função de processos celulares, nove proteínas (12,0%) relacionadas às vias de informação e três proteínas (4,0%) pertencentes à categoria miscelânea. A expressão das proteínas diminuiu na maioria das vezes, para todas as classificações funcionais. O presente estudo, associado a achados anteriores, aponta para um papel deletério do Pb no córtex cerebral dos animais expostos a este metal, independente da concentração utilizada, não sendo possível observar um efeito protetor do FeSO₄. Este processo parece ser mediado por proteínas como *Gamma-enolase*, *Alpha-internexin*, várias isoformas de *14-3-3* e *Homer protein homolog 1*.

Palavras-chave: Chumbo. Ferro. Cerebro. Proteoma.

ABSTRACT

Proteomic analysis of brain in rats submitted to subchronic treatment with lead: influence of iron supplementation

Lead (Pb) is a heavy metal that may yield changes in all body systems, yet the greatest health damages occur when it affects the central nervous system (CNS). Many studies demonstrate the clinical/behavioral changes caused by the action of Pb on the CNS. However, studies are necessary to demonstrate the biochemical changes caused by Pb in this system. Conversely, it has been reported that iron (Fe) seems to play a protective role on the brain toxicity caused by Pb. Therefore, this study analyzed the concentration of Pb in the brain tissue, and conducted proteomic analysis in the brain of rats intoxicated by Pb, submitted or not to Fe supplementation. The study was conducted on 30 weaning rats (*Rattus norvegicus*, Wistar type) divided in 6 groups (n=5/group), according to the treatment established for 6 weeks, as follows: Control (not exposed to Pb or Fe), Control Fe (exposed to administration of 20 mg/Kg p.c. of FeSO₄ at every 2 days, by gastric gavage), Pb 100 (exposed to water containing 100 mg/L of Pb), Pb 400 (exposed to water containing 400 mg/L of Pb) Pb100 + Fe (exposed to water containing 100 mg/L of Pb and gavage with FeSO₄) and Pb400 + Fe (exposed to water containing 400 mg/L of Pb and gavage with FeSO₄). After the experimental period, the animals were killed and the brains of animals were removed, discarding the cerebellum and brainstem. The remaining structure was submitted to analysis of Pb concentration and proteomic analysis. A dose-response relationship was observed in Pb concentration in the brain. The administration of FeSO₄ reduced the levels of Pb in the brain, though without statistical significance. The analysis of gels with proteic spots demonstrated reduction in their quantity according to the treatment performed in the groups. The control group exhibited greater concentration of spots, while groups receiving higher Pb concentration (400 mg/L) presented the lowest quantity of spots. There was also reduction in the quantity of spots detected when FeSO₄ was administered. Among the spots presented different expression in the comparisons between the control group and experimental groups and between the experimental groups and their counterparts supplemented or not with FeSO₄, 75 proteins were identified by mass spectrometry, being 20 proteins (26.0%) related to metabolic functions, 21 proteins (28.0%) related to structure and organization of structures, 22 proteins (30.0%) related to cell functions and processes, nine proteins (12.0%) related to information pathways and three proteins (4.0%) from the miscellaneous category. The expression of proteins was reduced in most cases, for all functional classifications. The present study, combined to previous findings, indicates a harmful effect of Pb in the cerebral cortex of animals exposed to this metal, regardless of the concentration employed, without observation of a protective effect of FeSO₄. This process seems to be mediated by proteins as Gamma-enolase, Alpha-internexin, several isoforms of 14-3-3 and Homer protein homolog 1.

Keywords: Lead. Iron. Brain. Proteome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA

- Figura 1** - Imagens em triplicata dos géis bidimensionais dos grupos controle e experimentais escaneados, e analisados pelo programa *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare)..... **51**

- GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Número total de spots proteicos detectados nos grupos controle e experimentais pelo método de detecção automática (software) e edição manual de adição e remoção de spots **52**
- Gráfico 2** - Gráfico de distribuição funcional das proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos, de acordo com Rison, Hodgman e Thornton (2000) **62**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração de proteínas do homogenato do córtex cerebral e volume de amostra utilizado para obtenção do <i>pool</i>	41
Tabela 2 -	Concentração média ($\pm$ DP) de Pb no córtex cerebral (ng/g) dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb ou Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄ ...	50
Tabela 3 -	Análise quantitativa dos <i>spots</i> proteicos detectados no córtex cerebral dos animais após comparações entre os grupos controle e experimentais, e grupos experimentais tratados com água contendo 100 e 400 mg/L de Pb e seus pares suplementados com 20 mg/Kg FeSO ₄	53
Tabela 4 -	Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental (20 mg/Kg FeSO ₄)	54
Tabela 5 -	Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental (100 mg/L Pb)....	55
Tabela 6 -	Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental (100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄).....	56
Tabela 7 -	Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental (400 mg/L Pb) ...	57
Tabela 8 -	Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental (400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄).....	58
Tabela 9 -	Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Experimentais (100 mg/L Pb e 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄).....	59

Tabela 10 - Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Experimentais (400 mg/L Pb e 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄).....	60
Tabela 11 - Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos que não apresentaram diferença de expressão entre os grupos e foram identificadas em grupos aleatórios.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
µg	Microgramas
µg/dL	Microgramas/decilitro
µgPb/mL	Microgramas de chumbo/mililitro
µL	Microlitro
µm	Micromolar
µV	Microvoltz
2DE	<i>Two dimensional electrophoresis</i> (Eletroforese bidimensional)
ACN	Acetonitrila
AMBIC	Bicarbonato de amônio
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina de soro bovino
Ca ⁺²	Íon Cálcio
CaM	Calmodulina
Cd	Cádmio
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (centro de controle e prevenção de doenças)
CHAPS	3-(cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propane sulfonate
cm	Centímetro
CRMs	<i>Certified Reference Materials</i>
dL	Decilitros
DMT1	Transportador de metal divalente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
dpi	<i>Dots per inch</i> (pontos por polegada)
DTT	Ditiotreitol
EQAS	External Quality Control System
Fe	Ferro
FeSO ₄	Sulfato ferroso
g	Gramas

g/Kg	Gramas/quilograma
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
h	Hora(s)
H₂O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HNO₃	Ácido nítrico
IAA	Iodoacetamida
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
IEF	<i>Isoelectric Focusing</i> (Focalização Isoelétrica)
INSP	Instituto Nacional de Saúde Pública de Quebec, Canadá
IPG	<i>Immobilized pH Gradient</i> (gradiente de pH imobilizado)
kDa	kiloDalton
kg	Quilograma
L	Litro
m/z	Razão massa/carga
mA	Miliampere
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight</i>
mg	Miligramas
mg/Kg	Miligramas/quilograma
mg/L	Miligramas/Litro
mgFe/Kg	Miligramas de ferro/quilograma
min	Minuto(s)
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm³	Milímetro cúbico
mmol	Milimoles
Mn	Manganês
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometria de Massa)
mΩ	Milli-ohm
n	Número
N1	Pico negativo um do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
ng	Nanogramas

ng/g	Nanogramas/grama
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia Americano
nm	Nanômetro
NYSDOH	Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque
°C	Graus centígrados
p	Nível de significância
P1	Pico positivo um do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
P2	Pico positivo dois do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
Pb	Chumbo
Pb⁺²	Íon chumbo
PbCO₃	Carbonato de chumbo
PbS	Sulfeto de chumbo
PbSO₄	Sulfato de chumbo
PEAC	Potencial Evocado Auditivo Cortical
PEATE	Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
pH	Potencial de hidrogênio
pI	Ponto isoelétrico
PKC	Proteína quinase C
r²	Coeficiente de determinação
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dedocil sulfato de sódio)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TFA	Ácido trifluoroacético
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio
TUNEL	<i>Terminal transferase-mediated dUTP nick end labeling</i>
V	Volts
v/v	Fração volumétrica
W	Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O CHUMBO	19
1.2	PROTEÔMICA	20
1.2.1	Eletroforese bidimensional (2DE)	21
1.2.2	Detecção das proteínas em gel	22
1.2.3	Espectrometria de massas	23
1.3	PROTEÔMICA EM CÉREBRO DE RATOS	23
1.4	PROTEÔMICA EM CÉREBRO DE RATOS EXPOSTOS AO Pb	26
1.5	INTERAÇÃO Pb x Fe	28
2	PROPOSIÇÃO	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS	37
3.2	COLETA DAS AMOSTRAS	38
3.3	ANÁLISE DE Pb NO CÓRTEX CEREBRAL	39
3.4	ANÁLISE PROTEÔMICA	40
3.4.1	Preparo da amostra	40
3.4.1.1	<i>Extração das proteínas</i>	40
3.4.2	Eletroforese bi-dimensional	41
3.4.2.1	<i>Primeira dimensão - focalização isoeletrica</i>	41
3.4.2.2	<i>Segunda dimensão - SDS-PAGE</i>	42
3.4.3	Visualização e análise de imagens da eletroforese bi-dimensional	42
3.4.4	Preparo das amostras para a espectrometria de massas	44
3.4.5	Sequenciamento das proteínas	45
3.4.6	Análise das sequências peptídicas	46
3.5	ANÁLISE DOS DADOS	46
4	RESULTADOS	47
4.1	ANÁLISE DE Pb NO CÓRTEX CEREBRAL	49
4.2	ANÁLISE DAS IMAGENS	50
4.3	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS	52
4.4	CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	62

4.4.1	Proteínas relacionadas ao metabolismo	62
4.4.2	Proteínas relacionadas a estrutura e organização da estrutura	64
4.4.3	Proteínas relacionadas a processo celular	65
4.4.4	Proteínas relacionadas a vias de informação	67
4.4.5	Miscelânea	67
5	DISCUSSÃO	69
5.1	PROTEÍNAS RELACIONADAS AO METABOLISMO	72
5.2	PROTEÍNAS RELACIONADAS À ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA ESTRUTURA.....	75
5.3	PROTEÍNAS RELACIONADAS A PROCESSOS CELULARES	78
5.4	PROTEÍNAS RELACIONADAS A VIAS DE INFORMAÇÃO	81
5.5	PROTEÍNAS RELACIONADAS A CATEGORIA MISCELÂNEA	82
6	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXO	101

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O CHUMBO

O chumbo (Pb) é um metal amplamente utilizado nas indústrias extrativa, petrolífera, de acumuladores, tintas, corantes, gráfica e bélica (SILVA, 2000), sendo encontrado na natureza sob a forma de compostos minerais (sulfeto de chumbo – PbS, carbonato de chumbo - PbCO₃, Sulfato de chumbo - PbSO₄) ou ligado a outros metais como o Cobre, Zinco, Prata e Urânio (MAINENTI, 2006; MOREIRA; NEVES, 2008), sendo considerado um dos contaminantes mais comuns do ambiente (NAKAMURA, 2002; MOREIRA; MOREIRA, 2004).

A absorção do Pb ocorre principalmente por inalação (30 a 50%) e ingestão (10 a 80%) (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999; MOREIRA; MOREIRA, 2004) e, após cair na corrente sanguínea, é rapidamente acumulado nos tecidos moles, seguido por uma vagarosa redistribuição para o osso, que contém aproximadamente de 90 a 95% do conteúdo corpóreo total com meia vida de 27 a 36 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995; SMITH; OSTERLOH; FLEGAL, 1996; SANÍN et al., 1998; SILVA, 2000; MOREIRA; MOREIRA, 2004).

Não há nenhuma ação fisiológica relacionada ao Pb para o organismo humano, e, além disso, ele é capaz de danificar todas as atividades biológicas, com atenção especial aos sistemas enzimáticos. As alterações que ocorrem em nível molecular podem ser relacionadas aos mecanismos de estresse oxidativo, alterações biofísicas da membrana celular, alterações na sinalização celular e, no cérebro, perda de neurotransmissores (GILMORE; WILSON, 1999; LIDSKY; SCHNEIDER, 2003).

No sistema nervoso central o Pb chega principalmente pelo plexo coroide, que é o responsável pela estabilidade química do cérebro (ZHENG; ASCHNER; GHERSI-EGEA, 2003). As alterações moleculares no tecido neural são bem deletérias e podem levar a condições clínicas que refletem em danos ao sistema cognitivo, como déficits no processamento visual e auditivo, os quais resultam em distúrbios no processo de aprendizagem (OTTO; FOX, 1993; GILBERT; MACK;

LASLEY, 1996, 1999a, 1999b; LASLEY; GILBERT, 2002; VERSTRAETEN; AIMO; OTEIZA, 2008; SHARIFI; MOUSAVI; JORJANI, 2010).

Tem sido relatado por Lidsky e Schneider (2003) que os efeitos neurotóxicos do Pb no desenvolvimento do sistema cognitivo podem estar relacionados à sua ação nos mecanismos de apoptose ou morte celular programada; aos mecanismos regulatórios intraneuronal; à ação sobre a proteína quinase C, que participa de muitas funções celulares na proliferação e diferenciação celular, na plasticidade neuronal e está envolvido nas funções cognitivas de memória e aprendizagem; ação sobre os mecanismos dos Neurotransmissores em nível pré-sináptico e pós sinápticos e acúmulo nas células da glia.

O estudo das alterações neurológicas causadas pelo Pb pode ser realizado tanto por meio de pesquisa clínica, como de forma experimental em animais. A análise proteômica parece ser uma ferramenta eficiente para medir os danos causados pelo Pb no sistema nervoso central de animais.

1.2 PROTEÔMICA

O estudo da proteômica é um dos segmentos da Biologia Molecular que vem crescendo bastante. Proteômica é o termo que define a caracterização em larga escala do conjunto de proteínas expressas em uma célula ou tecido (WILKINS et al., 1996). Como precursor da proteômica, o estudo genômico favoreceu o sequenciamento dos genes de varias espécies, como plantas, animais e humanos. Porém, com o avanço nestes estudos ficou evidente que somente o sequenciamento genômico não era capaz de responder a muitos dos processos biológicos que ocorrem no indivíduo, pois apesar das células de um organismo terem o mesmo genoma, elas expressam proteínas distintas que assumem diferentes funções e morfologias (SILVA; CORRÊA; REIS, 2007). Neste sentido, a proteômica tem contribuído para elucidar respostas relativas à expressão gênica (DA SILVA NETO et al., 2009). De acordo com Silva, Corrêa e Reis (2007) os dados gerados por análise proteômica permitem identificar as proteínas envolvidas em rotas metabólicas relacionadas aos diferentes processos celulares, identificar novos alvos farmacológicos e marcadores biológicos relacionados ao processo de

estabelecimento e progressão de doenças, identificar moléculas bioativas a partir de extratos biológicos naturais (desenvolvimento de novos fármacos) e caracterizar as respostas celulares a determinadas drogas, doenças e mudanças ambientais.

A primeira etapa em estudos de proteômica consiste na padronização do processo de extração protéica para o tipo de tecido estudado, com o objetivo de se ter um bom rendimento em termos quantitativos, além de uma maior variabilidade de bandas, de forma a maximizar o número de proteínas presentes na amostra a ser avaliada (THONGBOONKERD; KLEIN; KLEIN, 2004; SILVA; SOUZA, 2009). Em estudos de proteômica, uma boa preparação da amostra, ou seja, a extração do máximo número de proteínas de uma dada célula, tecido, órgão ou organismo, é o mais importante passo para a subsequente separação, resolução e identificação das proteínas (PARK, 2004). Posteriormente, ocorre a separação de proteínas utilizando métodos com gel (2-D PAGE) ou livre de gel (cromatografia líquida), e, assim, as proteínas separadas são então identificadas por espectrometria de massas (MS) (PIERCE; CAI, 2004; SECHI, 2004).

1.2.1 Eletroforese bidimensional (2DE)

O estudo de proteínas pelo método de eletroforese bidimensional foi aprimorado pelo desenvolvimento de novas matrizes e novas técnicas analíticas, e a análise de proteomas por esta técnica tem contribuído para o estudo da fisiologia de vários organismos (ALMEIDA, 2001). Esta técnica é definida pela separação de proteínas, caracterizada pela análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975). A separação ocorre em duas dimensões, sendo que na primeira, chamada de focalização isoeletrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). Nesta etapa as proteínas são desnaturadas com o objetivo de expor todas as cadeias laterais dos aminoácidos de suas sequências ao solvente (GÖRG et al., 1998; MAGALHÃES, 2010). Para solubilizar as amostras, são utilizados tampões que contenham agentes caotrópicos (ureia e/ou tio-ureia), detergentes não iônicos (CHAPS ou Triton X-100), agentes de redução (ditiotretol - DTT), proteases e inibidores de fosfatase (SALVATO; CARVALHO; LEITE, 2012). Os agentes de

redução que contêm DTT são capazes de desfazer as pontes dissulfeto, eliminando assim a forma nativa da proteína e conferindo-lhe uma conformação linear. 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. Estas são submetidas a uma corrente elétrica, sendo que as proteínas se movimentam, de acordo com suas cargas residuais, em direção a um dos polos da corrente, até que cheguem a uma região de pH que neutralize a sua carga residual, alcançando assim o pI.

As proteínas que foram separadas por IEF, são então transferidas para um gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que é um tensoativo aniônico, que torna as proteínas negativamente carregadas, fazendo com que a migração das mesmas dependa basicamente de sua massa molecular (GE HEALTHCARE, 2004). Sendo assim, a segunda dimensão promove uma nova separação baseada na massa molecular (O'FARRELL, 1975; WESTERMEIER; NAVEN, 2002).

1.2.2 Detecção das proteínas em gel

Após a separação das proteínas pela eletroforese bidimensional, o gel deve ser corado para a visualização das proteínas. O método 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. Por isso, cada método de coloração requer um protocolo específico para sua execução. As duas principais metodologias de coloração utilizam o corante azul brilhante de Coomassie ou sais de prata (soluções amoniacaís de prata ou nitrato de prata). A coloração de prata é cerca de cem a mil vezes mais sensível que a coloração de Coomassie, podendo detectar moléculas em quantidade de 0,1 a 1,0 ng em uma única banda (CANDIANO et al., 2004). Entretanto, o azul de *Coomassie* é o método colorimétrico mais confiável para quantificação dos *spots*, pois sua reprodutibilidade diminui a chance de erros, em virtude da utilização de protocolos mais simples (CANDIANO et al., 2004), e não

causa interferência na análise dos *spots* pela espectrometria de massa (REINDERS; SICKMANN, 2002; CANDIANO et al., 2004).

1.2.3 Espectrometria de massas

Após a detecção das proteínas no gel e seus respectivos pontos isoelétricos e massas moleculares determinados, existe a necessidade de um método capaz de identificá-las. A espectrometria de massas é uma ferramenta física que caracteriza as moléculas pela medida da relação massa/carga de seus íons. A identificação desses íons é possível, pois ao submeter a substância a ser analisada ao espectrômetro de massas ocorre um bombardeio de moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons ou íons de alta energia para extrair íons da amostra. Assim, os íons atravessam um campo magnético que curva suas trajetórias de modos diferentes, dependendo de sua relação carga-massa. O campo separa os íons em um padrão chamado espectro de massa. A massa e a carga dos íons podem ser medidas por sua posição no espectro (DASS, 2007).

Com o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais especializados, a espectrometria de massas passou a ser amplamente utilizada para determinar massas moleculares de proteínas. A proteína a ser identificada passa pela ação de uma enzima proteolítica (tripsina), produzindo peptídeos, e as massas desses peptídeos são então determinadas. As massas obtidas formam uma “impressão digital da proteína” (*peptide mass fingerprinting*) e, por meio de softwares específicos é possível comparar a “impressão digital da proteína” que queremos identificar com os gerados teoricamente para todas as sequências de proteínas presentes nos bancos de dados (MANN; HØJRUP; ROEPSTORFF, 1993; THIEDE et al., 2005).

1.3 PROTEÔMICA EM CÉREBRO DE RATOS

Muitos estudos já foram realizados utilizando-se da análise proteômica para verificar a resposta cerebral a diversas substâncias. Deshane et al. (2004) realizaram a análise proteômica, por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, no cérebro de ratas fêmeas adultas (35 dias de vida) que

ingeriram extrato de semente de uva (5%) por seis semanas. Após o período experimental, o cérebro foi dissecado (descartando o tronco encefálico), sendo pesado e congelado em nitrogênio líquido. Para a eletroforese foi utilizado o hemisfério cerebral direito, que foi homogeneizado em temperatura ambiente com tampão de lise (CHAPS), sendo realizada a extração das proteínas para posterior separação, por meio da focalização isoeletrica e *Western Blots* (2D). Após análise das imagens e análise estatística foi possível identificar 13 proteínas que aumentaram em quantidade e/ou sofreram variação de carga. Os autores acreditam que estas proteínas mediam a ação neuroprotetora do extrato da semente de uva. Kim et al. (2006) também realizaram um estudo com enfoque em análise proteômica em cérebro de ratas que ingeriram o extrato de semente de uva. Neste estudo, foram utilizadas ratas fêmeas com 35 dias de vida que foram submetidas a dois tipos de dieta por seis semanas, uma baseada em proteína caseína específica em dieta de ratos, e outra em que foi utilizada a mesma dieta acrescida de 5% de extrato de semente de uva. Após este período, os animais foram sacrificados por asfixia, e todo o cérebro acima do tronco encefálico foi removido e armazenado em nitrogênio líquido (-80°C) para posterior análise. Posteriormente, os cérebros foram homogeneizados com tampão de lise (CHAPS), sendo realizada a extração de 200 µg de amostra de proteína do sobrenadante, para posterior separação, por meio da focalização isoeletrica e eletroforese bidimensional, totalizando 30 géis que foram analisados para a verificação dos *spots* com diferenças significativas, recorte, digestão em tripsina e análise no espectrômetro de massa, para posterior identificação no MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>). Os autores verificaram que as proteínas que são afetadas pelo extrato de semente de uva são aquelas envolvidas no metabolismo de energia (*creatine kinase*, *brain isoform*), protein folding (*heat shock protein 60*, *heat shock cognate protein 70 e 71*), proteína citoesquelética (*neurofilament protein light chain*, *medium chain* e *glial fibrillary acidic protein*). Concluiu-se que o extrato de semente de uva pode ser uma terapia favorável para prevenir os danos causados ao SNC devido à idade, pois as proteínas que foram afetadas neste estudo são as mesmas afetadas, porém de maneira oposta, na doença de Alzheimer e em modelo de demência em ratos.

Li et al. (2004) utilizaram da análise proteômica em cérebro de ratos para caracterizar a densidade pós-sináptica. Foram utilizados dois métodos para

separação e detecção das proteínas, a eletroforese em gel bidimensional (2D) de alta resolução para separar os *spots* das proteínas mais abundantes, e a detecção dos peptídeos por “Mapeamento de massa dos peptídeos por espectrometria de massa” (*Matrix Assisted laser desorption ionization-time of flight* - MALDI-TOF). Grupos funcionais das proteínas identificadas indicaram que a densidade pós-sináptica é caracterizada por organelas complexas que são estruturalmente e funcionalmente envolvidas na atividade pós-sináptica. Estas incluem os receptores, canal iônico para neurotransmissor glutamato, proteínas que mantêm e modulam a arquitetura sináptica, a geração de energia anaeróbica, a sinalização, síntese de proteínas locais, entre outros.

Poon et al. (2004) realizaram a análise proteômica para verificar a expressão de proteínas específicas e modificações oxidativas em cérebro de seis ratos com idade de 4 meses e seis ratos com idade de 12 meses, para verificar o efeito da idade no estresse oxidativo de proteínas específicas e déficits de memória e aprendizagem relacionados à idade. Os cérebros foram removidos, dissecados, homogeneizados em tampão de lise, centrifugados e recolhido o sobrenadante para quantificar as proteínas (Pierce). Foi utilizada a eletroforese bidimensional para a separação das proteínas, por meio da focalização isoelétrica e peso molecular, além do *Western blotting*. Posteriormente, os géis da eletroforese e a membrana do *western blotting* foram escaneados para a análise das proteínas, para posterior digestão em tripsina e detecção no espectrômetro de massa (MALDI-TOF). Os autores verificaram que nos animais com idade de 12 meses foi significativamente diminuída a expressão de *neurofilament triplet protein L*, *lactase dehydrogenase 2*, *heat shock protein 86 α spectrin*, enquanto que a expressão de *triosephosphate isomerase* foi aumentada comparada aos animais com idade de 4 meses. Outro achado importante foi que a proteína *carbonyl levels of LDH-2*, *dihydropyrimidinase-like protein 2*, *α spectrin* e *creatina kinase* foi significativamente aumentada no cérebro de animais com 12 meses de vida. Os resultados do estudo mostraram evidências de que o estresse oxidativo afeta proteínas específicas que podem resultar em déficits na memória e aprendizado.

Poon et al. (2006) em estudo similar ao anterior avaliaram ratos *Wistar* machos, que foram divididos em dois grupos de acordo com a ingestão calórica. Um grupo que ingeriu até 28 meses de idade alimentação “*ad libitum*” preparada de

acordo com as recomendações do AIN e o grupo com restrição calórica que recebeu de 12 a 28 meses de vida a mesma dieta, porém menos calórica (60%). Após 28 meses os animais foram sacrificados, os cérebros removidos e homogeneizados em tampão de lise, centrifugados, recolhido o sobrenadante para quantificar as proteínas (Pierce). Foi realizada a imunohistoquímica, eletroforese bidimensional para a separação das proteínas e *western blotting*. Posteriormente, os géis da eletroforese e a membrana de *western blotting* foram escaneados para a análise das proteínas, para posterior digestão em tripsina e detecção no espectrômetro de massa (MALDI-TOF). Os resultados demonstraram que houve redução na oxidação de proteínas em todas as regiões analisadas no cérebro dos animais que tiveram a redução calórica. Na região do *striatum* houve diminuição significativa dos níveis da proteína *carbonyl pyruvate kinase M2* e na região do hipocampo houve diminuição significativa na expressão da proteína *3-nitrotirosina*. A análise proteômica mostrou as proteínas que foram modificadas pela oxidação dentro destas regiões cerebrais. Os níveis das proteínas *carbonyl kinase piruvate M2*, *α -enolase*, *inositol monofosfatase*, e *F1-ATPase chain B* estavam significativamente diminuídos. Já os níveis de expressão de *phosphoglycerate kinase 1*, *inosine monophosphate cyclohydrolase* e *F1-ATPase chain A* estavam significativamente aumentados no *striatum* dos animais com diminuição calórica; os níveis de *3-NT* de *malate dehydrogenase*, *phosphoglycerate kinase 1* e *14-3-3 zeta protein* estavam significativamente diminuídos; e os níveis da expressão de *DLP1 splice variant 1*, *mitochondrial aconitase*, *dihydrolipoamide dehydrogenase*, *peptideo H3 neuroprotetor* e *eukaryotic translation initiation factor 5A* estavam aumentados no hipocampo dos animais com diminuição calórica. Os autores sugerem que a diminuição calórica induz uma resposta leve de estresse metabólico pelo aumento da produção de proteínas neurotróficas.

1.4 PROTEÔMICA EM CÉREBRO DE RATOS EXPOSTOS AO Pb

Lui et al. (2008) observaram os efeitos da exposição crônica ao Pb na expressão das proteínas quinase (PKC) e calmodulina (CaM) no hipocampo de ratos bebês. A espectrometria de absorção atômica foi utilizada para determinar a quantidade de Pb no cérebro dos ratos, que foi muito maior nos cérebros dos

animais expostos ao Pb quando comparados aos grupo controle, e a análise por *western blotting* foi utilizada para observar a expressão protéica da PKC e CaM, demonstrando um decréscimo no nível da expressão destas no hipocampo, o que pode ser relacionado a um dos mecanismos moleculares da perda da aprendizagem e memória que ocorrem na exposição ao Pb.

Ainda verificando a expressão de proteínas específicas, Gu et al. (2009) avaliaram o RNAm e os níveis de proteínas DMT1 (responsável pelo transporte de metais bivalentes pela membrana) no cerebelo, córtex e hipocampo de 24 ratos que foram tratados intragastricamente com Pb, Cd ou não (controle). O nível de RNAm da DMT1 não diferiu entre os grupos. Entretanto, a expressão da proteína DMT1 foi significativamente aumentada no cerebelo, córtex e hipocampo dos animais tratados com Pb e Cd. Tais metais induzem a síntese da proteína DMT1 e têm implicação no transporte de íons tóxicos no cérebro de ratos em desenvolvimento.

Zucki (2013) realizou um estudo da análise proteômica da porção auditiva do tronco encefálico de ratos expostos a acetato de chumbo e suplementados com sulfato ferroso. Neste estudo foram utilizados 30 ratos *Wistar* (machos) com 21 dias de vida que foram divididos em 6 grupos, sendo que dois grupos experimentais, receberam acetato de chumbo em água de beber nas concentrações de 100 mg/L e 400 mg/L de Pb, dois grupos experimentais receberam o mesmo tratamento, porém com administração simultânea de 20 mg/Kg de FeSO₄ a cada 2 dias, por gavagem gástrica, um grupo (controle) recebeu água deionizada e um grupo recebeu água deionizada e 20 mg/Kg FeSO₄ por gavagem gástrica a cada 2 dias. 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. Concluiu-se por meio da análise proteômica do tronco encefálico de ratos que o acetato de chumbo altera a expressão proteica desta estrutura, contudo o efeito protetor do sulfato ferroso não foi confirmado nas proteínas identificadas.

1.5 INTERAÇÃO Pb x Fe

Acredita-se que o Pb possa interferir na homeostasia celular do Fe, contribuindo com a apoptose celular induzida pelo Pb em nível do córtex cerebral (WANG et al., 2007b). Ele interfere no transporte normal do Fe pela transferrina e inibe a endocitose da transferrina e o transporte de Fe pela membrana celular do reticulócito (QIAN; MORGAN, 1990). Ao nível da membrana celular, o Pb produz danos peroxidativos a lipídeos e proteínas. Este efeito parece ser causado por uma combinação de mecanismos, como liberação de Fe (o que, por sua vez, está relacionado à formação de radicais livres), perturbação de mecanismos antioxidantes e efeitos oxidativos diretos do Pb (ADONAYLO; OTEIZA, 1999; VILLEDA-HERNÁNDEZ et al., 2001). Estes mecanismos poderiam justificar a neurotoxicidade causada pelo Pb.

O Pb também pode ser capaz de competir com o Fe, inibindo sua ligação com a proteína transportadora DMT1 (*Divalent Metal Transporter1*), já que esta pode transportar outros íons divalentes como o cobre, zinco e Pb, quando há deficiência de Fe no organismo (ALABDULLAH et al., 2005; SOUZA; TAVARES, 2009). Diante disto, tem sido recomendada a suplementação de Fe em crianças com risco de intoxicação por Pb, porém como a sobrecarga de Fe no organismo é muito prejudicial, mais estudos são necessários antes de adotar esta medida terapêutica (AHAMED; SIDDIQUI, 2007; SOUZA; TAVARES, 2009).

Wang et al. (2007b) trataram ratos machos (20-22 dias) com massa corporal de 30-50 g com acetato de sódio em água de beber para o grupo controle e, acetato de Pb em água de beber nas concentrações 400 µgPb/ml e 342 µgPb/ml + gavagem gástrica com FeSO₄ dia sim, dia não, nas concentrações de 20 mgFe/Kg para o terceiro grupo e 40 mgFe/Kg para o quarto grupo, nos grupos experimentais. O objetivo dos autores foi verificar os efeitos da suplementação com Fe para prevenir a apoptose de células cerebrais induzida pelo Pb. Os animais expostos ao Pb apresentaram fragmentação de DNA, aumento na porcentagem da positividade para o TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling) e aumento de ativação de caspase 3, além de diminuir a concentração de Fe no córtex cerebral, quando comparados ao grupo controle. Nos animais suplementados com ambas as concentrações de Fe, o menor nível deste (20 mgFe/kg) restabeleceu as

concentrações normais no cérebro, ao contrário do maior nível (40 mgFe/kg). Por outro lado, ambos reduziram a fragmentação de DNA, mostraram pouca porcentagem da positividade para o TUNEL e diminuíram a degradação da procaspase 3. Os autores acreditam que a suplementação com FeSO₄ (20 mg/Kg peso corporal) pode proteger contra a citotoxicidade e a apoptose induzidas pelo acetato de Pb (400 mg/L administrado na água de beber por 6 semanas).

Posteriormente, Wang et al. (2007a) trataram ratos machos (20-22 dias) com massa corporal de 30-50 g com acetato de sódio em água de beber para o grupo controle e acetato de Pb em água de beber na concentração de 342 µgPb/mL + gavagem gástrica de FeSO₄ dia sim, dia não, na concentração de 7 mgFe/Kg para o terceiro grupo e 14 mgFe/Kg para o quarto grupo, nos grupos experimentais. Os autores tiveram como objetivo verificar os efeitos da suplementação com Fe para prevenir os danos que o Pb causa na barreira sanguínea cerebral. Os animais expostos a Pb apresentaram, comparados ao grupo controle, níveis significativamente maiores de Pb no sangue e tecido cerebral; a microscopia eletrônica demonstrou imagens sugestivas de edema cerebral, enquanto que o *western blotting* mostrou que o tratamento com Pb reduziu de 29 a 68% a expressão de *occludin*; já os animais suplementados com baixo nível de Fe (7 mgFe/Kg) mostraram níveis mais reduzidos de Pb em sangue e cérebro, além de restaurarem a estrutura cerebral normal e a expressão de *occludin*. Por outro lado, os animais suplementados com 14 mgFe/Kg tiveram níveis mais altos de Pb em sangue e no córtex cerebral quando comparados aos demais grupos, porém a expressão de *occludin* também foi restaurada. Os autores concluíram que o Pb aumenta a permeabilidade da barreira sanguínea cerebral, facilitando o acúmulo deste metal no tecido cerebral, mas baixas doses de suplementação com Fe diminuem os efeitos tóxicos do Pb no cérebro.

Ferreira (2012) realizou um estudo com ratos machos tratados com acetato de Pb (100 ou 400 mg/L) na água de beber, associado ou não a suplementação com FeSO₄ (20 mg/Kg de peso corporal) administrado por gavagem gástrica, a cada 2 dias, e os grupos controle receberam água deionizada e gavagem ou não com FeSO₄. A autora teve o objetivo de verificar os marcadores de estresse oxidativo no cérebro desses animais. Os resultados demonstraram que a atividade das enzimas glutathione peroxidase e superóxido dismutase, bem como a concentração de

glutathione reduzida diminuíram nos grupos experimentais em relação ao controle. Hidroperóxido de lipídios apresentou tendência de aumento nos grupos experimentais sem suplementação com ferro, enquanto que a catalase demonstrou tendência de aumento na atividade em relação ao controle. A autora concluiu que as enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase e a glutathione reduzida no cérebro podem ser afetadas pelo acetato de Pb e o tratamento com FeSO_4 pode afetar esta dinâmica.

Duarte (2013) avaliou a atividade elétrica cerebral [Potencial Evocado Auditivo Cortical (PEAC)] com a análise da latência dos componentes P1, N1 e P2], as concentrações de Pb no sangue e tecido cerebral, e observou o aspecto morfológico do cérebro de ratos intoxicados por Pb, submetidos à suplementação com Fe ou não [(mesmos grupos de tratamento analisados por Ferreira (2012)]. A administração de FeSO_4 reduziu os níveis de Pb no sangue e no cérebro, e embora a diferença só tenha sido significativa para o sangue (grupo que recebeu 100 mg/L de Pb), houve correlação significativa entre os níveis de Pb no sangue e cérebro ($r^2 = 0,94$; $p < 0,0001$). A latência média dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC foi maior para os animais do grupo 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO_4 . Não foram observadas alterações morfológicas significativas no tecido cerebral dos animais dos diferentes grupos, com exceção de alguns espaços pericelulares nos animais do grupo 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO_4 . Concluiu-se que a ingestão de Pb sozinho não foi capaz de causar aumento nas latências dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC e alteração morfológica no tecido cerebral, com exceção da maior dose de Pb utilizada (400 mg/L), associada ao uso do Fe (20 mg FeSO_4). Além disso, a suplementação com o Fe diminuiu os níveis do metal no sangue e no cérebro. Assim, seria interessante conduzir um estudo proteômico a fim de se compreender os mecanismos envolvidos nas alterações observadas no tecido cerebral e potencial evocado auditivo cortical em consequência da exposição do Pb, associado ou não à exposição ao Fe.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar o perfil proteico do cérebro de ratos intoxicados por duas doses distintas de Pb, submetidos simultaneamente à suplementação com Fe.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS

O protocolo deste estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP (processo número 019/2009).

Trinta ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *Wistar*), recém-desmamados (21 dias) receberam, por seis semanas, os seguintes tratamentos (n=5 por grupo) mesmo tratamento dos animais do estudo piloto, com a inclusão de um animal a mais por grupo e um grupo que recebeu como tratamento água de beber deionizada e gavagem a cada dois dias com FeSO_4 . Sendo assim, os animais foram divididos em seis grupos de cinco animais cada (dois controles e quatro experimentais) que foram tratados da seguinte maneira:

- Grupo 1 – controle – tratamento com ração e água de beber deionizada + gavagem gástrica com água deionizada a cada dois dias;
- Grupo 2 – controle Fe – tratamento com ração e água de beber deionizada + gavagem gástrica com 20 mg/Kg de FeSO_4 a cada dois dias;
- Grupo 3 – experimental – tratamento com ração e água de beber preparada pela dissolução de acetato de Pb em água destilada e deionizada na concentração de 100 mg/L de Pb + gavagem gástrica com água deionizada a cada dois dias;
- Grupo 4 – experimental – tratamento com ração e água de beber preparada pela dissolução de acetato de Pb em água destilada e deionizada na concentração de 100 mg/L de Pb + gavagem gástrica com 20 mg/Kg de FeSO_4 a cada dois dias;
- Grupo 5 – experimental – tratamento com ração e água de beber preparada pela dissolução de acetato de Pb em água destilada e deionizada na concentração de 400 mg/L de Pb + gavagem gástrica com água deionizada a cada dois dias;
- Grupo 6 – experimental – tratamento com ração e água de beber preparada pela dissolução de acetato de Pb em água destilada e

deionizada na concentração de 400 mg/L de Pb + gavagem gástrica com 20 mg/Kg de FeSO_4 a cada dois dias.

A dose mais alta de exposição ao Pb escolhida (400 mg/L), quando administrada a ratos por seis semanas, está associada a déficits súbitos de desenvolvimento (CORY-SLECHTA; WEISS; COX, 1983), sendo que concentrações maiores podem induzir hemorragias cerebrais (PRESS, 1977). De acordo com Wang et al. (2007b), a dose mais alta deve produzir níveis de Pb no sangue em torno de 30 $\mu\text{g/dL}$, e a dose mais baixa níveis de Pb no sangue em torno de 10 $\mu\text{g/dL}$, que de acordo com o CDC, corresponde ao nível aceitável de Pb no sangue. Estas concentrações de Pb no sangue foram confirmadas em estudo piloto (DUARTE, 2013).

Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas, numa sala com um ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro, temperatura e umidade controladas, livre acesso a uma dieta padrão de laboratório e água de beber pré-preparada, por seis semanas. A dieta escolhida foi a ração da marca Purina, a mesma utilizada no Biotério Central da FOB-USP, pois em análise prévia, foi verificado que a mesma apresenta quantidade insignificante do metal Pb, não interferindo assim nos resultados da pesquisa.

A água de beber foi preparada pela dissolução de acetato de Pb em água destilada e deionizada nas duas concentrações distintas (400 mgPb/L e 100 mgPb/L).

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Ao final do período experimental, os animais foram pesados e sacrificados por eutanásia (injeção intramuscular de Quetamina e Xilazina). Os cérebros dos animais foram rapidamente dissecados, sendo removida e descartada a região de tronco encefálico e cerebelo, e preservada a região cortical, sendo imediatamente inserida em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C , para posterior análise de Pb no tecido e análise proteômica.

3.3 ANÁLISE DE Pb NO CÓRTEX CEREBRAL

A determinação de Pb^{+2} foi realizada no Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, utilizando 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). Em resumo, 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, 1 mL de solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 50% (v/v) foi adicionado às amostras e incubado à temperatura ambiente por 12 h num homogeneizador rotacional. Após solubilização, o volume foi trazido para 10 mL com uma solução diluída contendo HNO_3 0,5% (v/v), 10 $\mu\text{g/L}$ Ródio (Rh) e Triton X-100 0,01% (v/v). Padrões de calibração analíticos foram preparados numa concentração variando entre 0 e 20 $\mu\text{g/L}$ de Pb^{+2} , utilizando a mesma solução das amostras. O limite de detecção para o Pb^{+2} foi de 0,0066 $\mu\text{g/L}$.

Após a preparação da amostra, a mesma foi diretamente injetada no equipamento. O controle de qualidade para as análises de Pb^{+2} 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 elementos traço no sangue) foram também analisados.

3.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

3.4.1 Preparo da amostra

3.4.1.1 Extração das proteínas

Os cérebros previamente congelados e armazenados a -80°C foram pesados e transferidos individualmente para serem pulverizados em moinho criogênico por um ciclo de 30 segundos. Posteriormente o tecido foi retirado do moinho e armazenado em tubo *ependorf* a -80°C em nitrogênio (N_2) líquido, pois a baixa temperatura promovida por este evita a degradação das proteínas. Foram pesados 100 mg das amostras devidamente homogeneizadas, e adicionados 300 μL de tampão de lise contendo ureia 7 mol/L, tiourea 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 300 μL do sobrenadante foi coletado (GE HEALTHCARE, 2004).

O excesso de sais, açúcares, ácidos nucleicos e lipídeos foram removidos do sobrenadante utilizando-se 1,5 mL de *wash buffer* e agitado por 30 seg em vórtex. Os tubos foram incubados a -20°C por 2h e 50 min em freezer, 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 que 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 ressuspensão em 200 μL de solução de reidratação contendo ureia 7 mol/L, tiourea 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 StartTM 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 1000 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 - Concentração de proteínas do homogenato do córtex cerebral e volume de amostra utilizado para obtenção do *pool*

Grupos	A ^{595 nm}	[proteína] µg/mL	Vol. (µL) equivalente a 1000 µg
Controle	0,844	30847	38,90
20 mg/Kg FeSO ₄	0,887	32574	36,84
100 mg/L Pb	0,863	31621	37,95
100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	0,917	33744	35,56
400 mg/L Pb	0,819	29874	40,17
400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	0,883	32395	37,04

3.4.2 Eletroforese bi-dimensional

3.4.2.1 Primeira dimensão - focalização isoeletrica

A fim de separar as proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI), as amostras foram submetidas à focalização isoeletrica (IEF). Para isto, 1000 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 isoeletrica foi realizada no sistema *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), 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.

3.4.2.2 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 [ureia 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 15 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 15 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 µL) 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), 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.

3.4.3 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 a 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, Upssala, Suécia) e analisados com o Software ImageMaster 2D Platinum versão 7.0 (GE Healthcare, Upssala, Suécia).

Para a detecção e análise dos *spots* de proteína e a determinação do seu volume foram estabelecidos os seguintes parâmetros: *smooth* = 6, área mínima = 5 e saliência = 190. 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 isoeletricos 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%.

3.4.4 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 ponteiros universais de 1000 μL e 200 μL , os *spots* foram excisados em segmentos de aproximadamente 1 mm^3 , transferidos para tubos de 2,0 mL contendo 200 μL de ácido acético 5% e armazenados a 4°C até o passo seguinte.

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

3.4.5 Sequenciamento das proteínas

A identificação dos peptídeos foi feita utilizando-se o sistema nanoACQUITY UPLC-Xevo QToF MS (Waters, Manchester, Reino Unido). O nanoACQUITY UPLC estava equipado com a coluna analítica de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 (75 μ m X 150 mm, 1.8 μ m particle size, Waters Manchester, UK). A coluna foi equilibrada com a fase móvel A (ácido fórmico 0,1 % em água). Então, os peptídeos foram separados com um gradient linear de 7-85% da fase móvel B (Ácido fórmico 0,1% em ACN) por 31 minutos, num fluxo de 0,4 μ L/minuto. A temperatura da coluna foi mantida em 35°C. O espectrômetro de massas Xevo G2 Q-TOF (Waters, Manchester, Reino Unido) foi operado em modo iônico *nanoelectrospray* positive e os dados foram coletados usando o método MS^E em energia elevada (19-45 V), que permite a aquisição tanto dos íons precursores quanto dos fragmentos iônicos, numa única injeção. As condições de fonte utilizadas incluíram: voltagem capilar 2,5 kV; cone de amostra 30 V; cone de extração 5,0 V e temperatura da fonte 80°C. A aquisição dos dados ocorreu durante 20 minutos e a amplitude de escaneamento foi

50–2000 Da. O *lockspray*, usado para garantir acurácia e reprodutibilidade, foi corrido com uma solução de [Glu1] fibrinopeptide (1 pmol/ μ L) num fluxo de 1 μ L/min, com íon de referência no modo positivo a m/z 785.8427.

3.4.6 Análise das sequências peptídicas

A versão 3,0 do *ProteinLynx Global Server* (PLGS) foi utilizada para processor e pesquisar os dados contínuos LC-MS^E. As proteínas foram identificadas com o algoritmo incluso no *software*, conjuntamente com busca na base de dados *Rattus* (revisada apenas, UniProtKB/Swiss-Prot) baixada em dezembro de December 2013 a partir do UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>).

3.5 ANÁLISE DOS DADOS

Para análise dos dados, foi utilizado o *software* GraphPad InStat (versão 3.0 para *Windows*, GraphPad software Inc. La Jolla, CA, EUA). Inicialmente foram checadas a normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade dos dados (teste de Bartlett), para a seleção do teste estatístico apropriado. Os dados referentes à concentração de Pb no córtex cerebral passaram no teste de normalidade, mas não no de homogeneidade. Foram então analisados por ANOVA, após transformação logarítmica e teste de Tukey para comparações individuais.

O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os dados de consumo de água e massa corporal dos animais, bem como a concentração de Pb no sangue total foram descritos em trabalho prévio do nosso grupo (DUARTE, 2013).

4.1 ANÁLISE DE Pb NO CÓRTEX CEREBRAL

A Tabela 2 apresenta a concentração média de Pb no córtex cerebral (ng/g) dos animais dos grupos controle e experimentais. A ANOVA após transformação logarítmica detectou diferença significativa entre os grupos ($F=191,15$, $p<0,0001$). As menores concentrações de Pb no córtex cerebral foram observadas nos grupos controle e FeSO_4 , que não diferiram significativamente entre si. Valores intermediários foram encontrados para os grupos que receberam água contendo 100 mg/L Pb, que diferiram significativamente dos grupos que receberam água contendo 400 mg/L de Pb. Por outro lado, o grupo que recebeu água contendo 100 mg/L de Pb diferiu significativamente dos grupos controle e FeSO_4 , mas a administração concomitante de FeSO_4 (Grupo 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO_4) foi capaz de reduzir as concentrações de Pb no cérebro, de forma que, embora este grupo não tenha sido significativamente diferente do que recebeu somente 100 mg/L Pb, ele não diferiu significativamente dos grupos controle e FeSO_4 . A administração concomitante de FeSO_4 reduziu os níveis de Pb no cérebro dos animais expostos a este elemento, em cerca de 30% e 15% para os grupos que receberam água contendo 100 e 400 mg/L de Pb, mas estes grupos não foram significativamente diferentes daqueles em que foi administrada apenas a concentração correspondente de Pb.

Tabela 2 - Concentração média ($\pm$ DP) de Pb no córtex cerebral (ng/g) dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb ou Pb + 20 mg/Kg FeSO₄

Grupos	[Pb] córtex (ng/g)
Controle	13,51 $\pm$ 5,48 ^c
20 mg/Kg FeSO ₄	11,59 $\pm$ 2,54 ^c
100 mg/L Pb	32,14 $\pm$ 12,01 ^b
100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	23,21 $\pm$ 11,77 ^{bc}
400 mg/L Pb	350,57 $\pm$ 55,86 ^a
400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	293,52 $\pm$ 73,16 ^a

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

4.2 ANÁLISE DAS IMAGENS

A Figura 1 apresenta as imagens em triplicata dos géis bidimensionais que foram escaneados e analisados pelo programa *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare). O Gráfico 1 mostra o número total de spots proteicos detectados em cada grupo pelo método de detecção automática do *software*, assim como pela edição manual de adição e remoção de spots.

Figura 1 - Imagens em triplicata dos géis bidimensionais dos grupos controle e experimentais escaneados, e analisados pelo programa *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare)

Gráfico 1 - Número total de spots proteicos detectados nos grupos controle e experimentais pelo método de detecção automática (software) e edição manual de adição e remoção de spots

Foi observada uma redução dose-dependente na quantidade de *spots* detectados de acordo com o tratamento recebido por cada grupo. O grupo controle, que recebeu somente água deionizada, apresentou a maior quantidade de *spots* detectados, ao passo que os grupos que receberam a maior concentração de Pb (400 mg/L) apresentaram as menores quantidade de *spots*. Houve uma diminuição na quantidade de *spots* detectados quando administrado FeSO₄, tanto comparado com o controle, quanto com os respectivos grupos onde o Pb foi co-administrado.

4.3 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS

O perfil quantitativo dos *spots* proteicos detectados no córtex cerebral dos animais foi definido pela análise comparativa entre os grupos controle e os grupos experimentais, bem como entre os grupos experimentais que receberam 100 e 400 mg/L de Pb e seus pares suplementados com FeSO₄.

A Tabela 3 apresenta estas comparações referentes aos *spots* coincidentes, spots coincidentes com diferença de expressão, *spots* exclusivos no grupo controle e *spots* exclusivos nos grupos experimentais.

As Tabelas 4 a 10 mostram as proteínas com diferença de expressão entre os grupos controle x 20 mg/Kg FeSO₄, controle x 100 mg/L Pb, controle x 100 mg/L

Pb + 20 mg/Kg FeSO₄, controle x 400 mg/L Pb, controle x 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄, 100 mg/L Pb x 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄ e 400 mg/L Pb x 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄, respectivamente. A Tabela 11 mostra as proteínas que não apresentaram diferença de expressão e foram identificadas em diferentes grupos.

Tabela 3 - Análise quantitativa dos *spots* proteicos detectados no córtex cerebral dos animais após comparações entre os grupos controle e experimentais, e grupos experimentais tratados com água contendo 100 e 400 mg/L de Pb e seus pares suplementados com 20 mg/Kg FeSO₄

Comparação entre grupos	Spots			
	coincidentes	coincidentes com diferença de expressão	exclusivos do grupo controle	exclusivos do grupo experimental
Controle x 20 mg/Kg FeSO ₄	657	43	20	15
Controle x 100 mg/L Pb	657	23	20	7
Controle x 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	649	53	28	11
Controle x 400 mg/L Pb	641	43	38	10
Controle x 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	662	25	39	10
100 mg/L Pb x 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	650	27	17	13
400 mg/Pb x 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	645	30	27	25

Tabela 4 - Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental (20 mg/Kg FeSO₄)

Uniprot ID	Proteína	Função	PM (kDa) / PI (teórico)	Dif. de expressão (p<0,05)
B3GNI6	<i>Septin-11</i>	Estrutura e organização da estrutura	49,7/6,24	↓ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
P00507	<i>Aspartate aminotransferase_mitochondrial</i>	Metabolismo	47,3/ 9,13	↑ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
B0BND0	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6 (E-NPP6)</i>	Metabolismo	50,7/6,47	↓ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
P04797	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>	Metabolismo	35,9/8,14	↑ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
Q561S0	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial</i>	Metabolismo	40,5/7,64	↓ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
P38983	<i>40S ribosomal protein SA</i>	Estrutura e organização da estrutura	32,9/4,80	↓ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
P47819	<i>Glial fibrillary acidic protein (GFAP)</i>	Processo celular	49,9/5,35	↑ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
P13668	<i>Stathmin</i>	Estrutura e organização da estrutura	17,3/5,75	↑ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
P05065	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	Metabolismo	39,4/8,30	↓ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
Q91Y81	<i>Septin-2</i>	Estrutura e organização da estrutura	41,6/6,15	↑ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
P47942	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2)</i>	Estrutura e organização da estrutura	62,3/5,95	↑ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
P19527	<i>Neurofilament light polypeptide</i>	Processo celular	61,3/4,62	↓ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
P23565	<i>Alpha-internexin (Alpha-Inx)</i>	Estrutura e organização da estrutura	56,1/5,20	↓ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
P12839	<i>Neurofilament medium polypeptide</i>	Processo celular	95,8/4,77	↓ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
P16086	<i>Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1</i>	Estrutura e organização da estrutura	28,5/5,20	↑ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄
O88600	<i>Heat shock 70 kDa protein 4</i>	Vias de informação	94,1/5,12	↓ no experimental 20 mg/Kg FeSO ₄

Tabela 5 - Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental (100 mg/L Pb)

Uniprot ID	Proteína	Função	PM (kDa) / PI (teórico)	Dif. de expressão (p<0,05)
B3GNI6	<i>Septin-11</i>	Estrutura e organização da estrutura	49,7/6,24	↓ no experimental 100 mg/L Pb
P00507	<i>Aspartate aminotransferase_mitochondrial</i>	Metabolismo	47,3/9,13	↓ no experimental 100 mg/L Pb
B0BND0	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6</i>	Metabolismo	50,7/6,47	↑ no experimental 100 mg/L Pb
Q561S0	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial</i>	Metabolismo	40,5/7,64	↓ no experimental 100 mg/L Pb
Q68FY0	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial</i>	Metabolismo	52,9/5,57	↓ no experimental 100 mg/L Pb
P07335	<i>Creatine kinase B-type</i>	Metabolismo	42,7/5,39	↓ no experimental 100 mg/L Pb
P63259	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	Estrutura e organização da estrutura	41,8/5,31	↓ no experimental 100 mg/L Pb
P60711	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	Estrutura e organização da estrutura	41,8/5,29	↓ no experimental 100 mg/L Pb
Q91Y81	<i>Septin-2</i>	Estrutura e organização da estrutura	41,6/6,15	↑ no experimental 100 mg/L Pb
P47942	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	Estrutura e organização da estrutura	62,3/5,95	↑ no experimental 100 mg/L Pb
P60901	<i>Proteasome subunit alpha type-6</i>	Vias de informação	27,4/6,34	↓ no experimental 100 mg/L Pb
P25113	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	Metabolismo	28,8/6,67	↓ no experimental 100 mg/L Pb
P00330	<i>Alcohol dehydrogenase 1</i>	Miscelâneo	36,8/6,21	↓ no experimental 100 mg/L Pb
Q5XI73	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i>	Vias de informação	23,4/5,10	↓ no experimental 100 mg/L Pb

Tabela 6 - Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental (100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄)

Uniprot ID	Proteína	Função	PM (kDa) / PI (teórico)	Dif. de expressão (p<0,05)
Q561S0	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial</i>	Metabolismo	40,5/7,64	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P63259	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	Estrutura e organização da estrutura	41,8/5,31	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P60711	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	Estrutura e organização da estrutura	41,7/5,29	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P68136	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	Estrutura e organização da estrutura	42,1/5,23	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P68035	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	Estrutura e organização da estrutura	42,0/5,23	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P63269	<i>Actin, gamma-enteric smooth muscle</i>	Estrutura e organização da estrutura	41,9/5,31	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P62738	<i>Actin, aortic smooth muscle</i>	Estrutura e organização da estrutura	42,1/5,24	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P05065	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	Metabolismo	39,4/8,30	↑ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P04642	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	Metabolismo	36,4/8,45	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P47942	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	Estrutura e organização da estrutura	62,3/5,95	↑ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P16884	<i>Neurofilament heavy polypeptide</i>	Processo celular	11,5/5,74	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P25113	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	Metabolismo	28,9/6,67	↑ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P62815	<i>V-type proton ATPase subunit B, brain isoform (V-ATPase subunit B 2)</i>	Processo celular	56,5/5,57	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P08461	<i>Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial</i>	Metabolismo	67,2/8,76	↑ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P00507	<i>Aspartate aminotransferase mitochondrial</i>	Metabolismo	47,3/9,13	↑ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P46462	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	Processo celular	89,3/5,14	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄

Tabela 7 - Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental (400 mg/L Pb)

Uniprot ID	Proteína	Função	PM (kDa) / PI (teórico)	Dif. de expressão (p < 0,05)
B3GNI6	<i>Septin-11 OS</i>	Estrutura e organização da estrutura	49,7/6,24	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P38983	<i>40S ribosomal protein SA</i>	Estrutura e organização da estrutura	32,8/4,80	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P07323	<i>Gamma-enolase</i>	Processo celular	47,1/5,03	↑ no experimental 400 mg/L Pb
P07335	<i>Creatine kinase B-type</i>	Metabolismo	42,7/5,39	↑ no experimental 400 mg/L Pb
P47819	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>	Processo celular	49,9/5,35	↑ no experimental 400 mg/L Pb
Q5RK11	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-II</i>	Estrutura e organização da estrutura	46,4/5,33	↑ no experimental 400 mg/L Pb
Q9Z214	<i>Homer protein homolog 1</i>	Miscelânea	41,3/5,39	↑ no experimental 400 mg/L Pb
O88989	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	Metabolismo	36,5/6,16	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P85969	<i>Beta-soluble NSF attachment protein (SNAP-beta)</i>	Estrutura e organização da estrutura	33,5/5,32	↑ no experimental 400 mg/L Pb
O35244	<i>Peroxiredoxin-6</i>	Processo celular	24,8/5,64	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P04797	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Metabolismo	35,8/8,14	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P00489	<i>Glycogen phosphorylase, muscle form</i>	Metabolismo	97,3/6,77	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P09811	<i>Glycogen phosphorylase, liver form</i>	Metabolismo	97,5/6,75	↓ no experimental 400 mg/L Pb
Q99MA0	<i>Cbp/p300-interacting transactivator 4</i>	Vias de informação	18,2/4,60	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P09812	<i>Glycogen phosphorylase, muscle form</i>	Metabolismo	97,3/6,91	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P48500	<i>Triosephosphate isomerase (TIM)</i>	Metabolismo	26,8/6,89	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P49432	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHE1-B)</i>	Metabolismo	39,0/6,20	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P59215	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha</i>	Processo celular	40,1/5,34	↓ no experimental 400 mg/L Pb
Q99NA5	<i>Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial</i>	Metabolismo	39,7/6,46	↓ no experimental 400 mg/L Pb
Q6AYZ1	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>	Estrutura e organização da estrutura	49,9/4,96	↓ no experimental 400 mg/L Pb
Q6P9V9	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	Estrutura e organização da estrutura	50,1/4,94	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P68370	<i>Tubulin alpha-1A chain</i>	Estrutura e organização da estrutura	50,1/4,94	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P35704	<i>Peroxiredoxin-2</i>	Processo celular	21,8/5,34	↑ no experimental 400 mg/L Pb
P25113	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	Metabolismo	28,8/6,67	↑ no experimental 400 mg/L Pb
P14659	<i>Heat shock-related 70 kDa protein 2</i>	Vias de informação	69,6/5,50	↑ no experimental 400 mg/L Pb
Q07439	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>	Vias de informação	70,2/5,60	↑ no experimental 400 mg/L Pb
P55063	<i>Heat shock 70 kDa protein 1-like</i>	Vias de informação	70,5/5,91	↑ no experimental 400 mg/L Pb
P63259	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	Estrutura e organização da estrutura	41,8/5,31	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P60711	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	Estrutura e organização da estrutura	41,8/5,29	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P53369	<i>7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase</i>	Processo celular	18,0/5,61	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P68136	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	Estrutura e organização da estrutura	42,1/5,23	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P63269	<i>Actin, gamma-enteric smooth muscle</i>	Estrutura e organização da estrutura	41,9/5,31	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P68035	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	Estrutura e organização da estrutura	42,0/5,23	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P62738	<i>Actin, aortic smooth muscle</i>	Estrutura e organização da estrutura	42,0/5,24	↓ no experimental 400 mg/L Pb
O70437	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 4</i>	Processo celular	60,5/6,50	↓ no experimental 400 mg/L Pb
O09028	<i>Gamma-aminobutyric acid receptor subunit pi</i>	Processo celular	50,5/8,03	↓ no experimental 400 mg/L Pb
P05065	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	Metabolismo	39,4/8,30	↓ no experimental 400 mg/L Pb
O88600	<i>Heat shock 70 kDa protein 4</i>	Vias de informação	94,1/5,12	↓ no experimental 400 mg/L Pb
Q63610	<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>	Estrutura e organização da estrutura	29,0/4,75	↑ no experimental 400 mg/L Pb
P04692	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	Estrutura e organização da estrutura	32,7/4,69	↑ no experimental 400 mg/L Pb

Tabela 8 - Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Controle e Experimental (400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄)

Uniprot ID	Proteína	Função	PM (kDa) / PI (teórico)	Dif. de expressão (p<0,05)
P00507	<i>Aspartate aminotransferase_mitochondrial</i>	Metabolismo	47,3/ 9,13	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
B0BND0	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase family member 6</i>	Metabolismo	50,7/6,47	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P04797	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Metabolismo	35,8/8,14	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
Q561S0	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial</i>	Metabolismo	40,5/7,64	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P85515	<i>Alpha-centractin (Centractin)</i>	Estrutura e organização da estrutura	42,6/6,19	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P23565	<i>Alpha-internexin (Alpha-Inx)</i>	Estrutura e organização da estrutura	56,1/5,20	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P05065	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	Metabolismo	39,4/8,30	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
Q91Y81	<i>Septin-2</i>	Estrutura e organização da estrutura	41,6/6,15	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P47942	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	Estrutura e organização da estrutura	62,3/5,95	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P08461	<i>Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial</i>	Metabolismo	67,2/8,76	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄

Tabela 9 - Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Experimentais (100 mg/L Pb e 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄)

Uniprot ID	Proteína	Função	PM (kDa) / PI (teórico)	Dif. de expressão (p<0,05)
P04797	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Metabolismo	35,8/8,14	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
Q68FY0	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial</i>	Metabolismo	52,8/5,57	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P05065	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	Metabolismo	39,3/8,30	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P47942	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	Estrutura e organização da estrutura	62,3/5,95	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P35434	<i>ATP synthase subunit delta, mitochondrial</i>	Metabolismo	17,6/5,11	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P00330	<i>Alcohol dehydrogenase 1</i>	Miscelaneo	36,8/6,21	↓ no experimental 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄

Tabela 10 - Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos diferentemente expressas entre os grupos Experimentais (400 mg/L Pb e 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄)

Uniprot ID	Proteína	Função	PM (kDa) / PI (teórico)	Dif. de expressão (p<0,05)
B0BND0	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase family member 6</i>	Metabolismo	50,7/6,47	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P61983	<i>14-3-3 protein gamma</i>	Processo celular	28,3/ 4,80	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P35213	<i>14-3-3 protein beta/alpha</i>	Processo celular	28,0/ 4,81	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P68511	<i>14-3-3 protein eta</i>	Processo celular	28,2/4,81	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P68255	<i>14-3-3 protein theta</i>	Processo celular	27,8/4,69	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P54311	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1</i>	Processo celular	37,4/5,60	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P54313	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2</i>	Processo celular	37,3/5,60	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P52287	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-3</i>	Processo celular	37,2/5,51	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P04797	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>	Metabolismo	35,8/8,14	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P00507	<i>Aspartate aminotransferase, mitochondrial</i>	Metabolismo	47,3/9,13	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P38983	<i>40S ribosomal protein SA</i>	Estrutura e organização da estrutura	32,8/4,80	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P07323	<i>Gamma-enolase</i>	Processo celular	47,1/5,03	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P47819	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>	Processo celular	50,0/5,35	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
Q9Z214	<i>Homer protein homolog 1</i>	Miscelânea	41,3/5,39	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P00564	<i>Creatine kinase M-type</i>	Metabolismo	43,0/6,58	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
Q9QYU4	<i>Ketimine reductase mu-crystallin</i>	Processo celular	33,5/5,34	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P62260	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	Processo celular	29,1/4,63	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P25809	<i>Creatine kinase U-type, mitochondrial</i>	Metabolismo	47,0/8,72	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
O35244	<i>Peroxiredoxin-6</i>	Processo celular	24,8/5,64	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P47942	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	Estrutura e organização da estrutura	62,3/5,95	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P63018	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	Vias de informação	70,9/5,37	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
P08461	<i>Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial</i>	Metabolismo	67,2/8,76	↓ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄
Q68FY0	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial</i>	Metabolismo	52,9/5,57	↑ no experimental 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄

Tabela 11 - Proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos que não apresentaram diferença de expressão entre os grupos e foram identificadas em grupos aleatórios

Uniprot ID	Proteína	Função	PM (kDa) / PI (teórico)	Grupo
P80254	<i>D-dopachrome decarboxylase</i>	miscelânea	13,1/ 6,09	FeSO ₄ , controle, 100 mg/L Pb, 100 mg/L Pb + FeSO ₄ , 400 mg/L Pb + FeSO ₄
Q63716	<i>Peroxiredoxin-1</i>	Processo celular	22,1/8,27	FeSO ₄ , controle, 100 Pb+ FeSO ₄ , 400 mg/L Pb, 400 mg/L Pb + FeSO ₄
D3ZZC3	<i>Kelch-like protein 22</i>	Vias de informação	71,8/5,55	FeSO ₄ , controle, 100 mg/L Pb, 100 mg/L Pb + FeSO ₄ , 400 mg/L Pb + FeSO ₄

As proteínas identificadas pela espectrometria de massas foram classificadas por categorias funcionais de metabolismo, transporte, estrutura e organização da estrutura, vias de informação, processo celular e miscelânea, baseada na classificação de Rison, Hodgman e Thornton (2000). Nenhuma proteína identificada neste estudo atendeu à função que envolve a categoria transporte. O Gráfico 2 apresenta a porcentagem de proteínas identificadas em cada categoria funcional.

Gráfico 2 - Gráfico de distribuição funcional das proteínas identificadas no córtex cerebral de ratos, de acordo com Rison, Hodgman e Thornton (2000)

4.4 CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

4.4.1 Proteínas relacionadas ao metabolismo

As proteínas relacionadas ao metabolismo são aquelas cuja função está relacionada com a obtenção de energia e degradação de micro e macromoléculas. Neste estudo, 20 proteínas (26%) foram classificadas nesta categoria, sendo que todas foram relacionadas às comparações entre os grupos controle e experimentais e experimentais que receberam a mesma concentração de Pb e foram suplementados com Fe. Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 20 mg/kg FeSO_4 foram detectadas cinco proteínas, sendo que três proteínas tiveram a sua expressão diminuída no segundo grupo, sendo elas *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6*, *NADH dehydrogenase*

[ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial, Fructose-bisphosphate aldolase A, enquanto que duas aumentaram a sua expressão também no segundo grupo *Aspartate aminotransferase mitochondrial* e *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 100 mg/L Pb, foram detectadas seis proteínas, sendo que, com exceção da proteína *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6* que teve a sua expressão aumentada, todas as outras proteínas diminuíram a sua expressão, sendo elas a *Aspartate aminotransferase mitochondrial*, *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial*, *Cytochrome b-c1 complex subunit 1-mitochondrial*, *Creatine kinase B-type B-CK*, *Phosphoglycerate mutase 1*. Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 100 mg/L Pb, mas foi suplementado com 20 mg/kg FeSO₄, das seis proteínas identificadas com diferença de expressão, duas proteínas diminuíram a expressão no segundo grupo, sendo elas *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial* e a *L-lactate dehydrogenase A chain*, e quatro tiveram a expressão aumentada no segundo grupo, sendo elas *Aspartate aminotransferase mitochondrial*, *Fructose-bisphosphate aldolase A*, *Phosphoglycerate mutase 1* e *Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial*. Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 400 mg/L Pb, foram observadas 11 proteínas com diferença de expressão, sendo que, com exceção de duas proteínas que tiveram a sua expressão aumentada no segundo grupo, *Creatine kinase B-type B-CK* e *Phosphoglycerate mutase 1*, todas as demais tiveram a sua expressão diminuída no segundo grupo, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *Fructose-bisphosphate aldolase A*, *Malate dehydrogenase-cytoplasmic*, *Glycogen phosphorylase, muscle form*, *Glycogen phosphorylase, liver form*, *Glycogen phosphorylase, muscle form*, *Triosephosphate isomerase*, *Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial* e *Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondria*. Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 400 mg/L Pb, mas foi suplementado com 20 mg/kg FeSO₄, das seis proteínas identificadas com diferença de expressão, três diminuíram a sua expressão no segundo grupo, *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6*, *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial* e *Fructose-bisphosphate aldolase A*, e três aumentaram a expressão no segundo grupo, *Aspartate aminotransferase mitochondrial*, *Glyceraldehyde-3-phosphate*

dehydrogenase e Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial.

Ao comparar grupos que receberam a mesma concentração de Pb com seu par que foi suplementado com FeSO₄ foi observado que para a menor concentração, 100 mg/L Pb três proteínas tiveram sua expressão diminuída no grupo que recebeu 20 mg/kg FeSO₄ como suplemento. Foram elas a *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *Fructose-bisphosphate aldolase A* e *Cytochrome b-c1 complex subunit 1-mitochondria I*. Já no grupo que recebeu a concentração de 400 mg/L Pb, quatro proteínas diminuíram a sua expressão no grupo que recebeu 20 mg/kg FeSO₄ como suplemento, sendo elas *Aspartate aminotransferase mitochondrial*, *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6*, *Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial* e *Creatine kinase M-type*, e três tiveram a sua expressão aumentada, *Creatine kinase U-type, mitochondrial*, *Cytochrome b-c1 complex subunit 1-mitochondria I* e *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*.

4.4.2 Proteínas relacionadas a estrutura e organização da estrutura

Na categoria estrutura e organização da estrutura estão presentes aquelas proteínas que desempenham funções relacionadas ao citoesqueleto e membrana celular. Nesta categoria, foram identificadas 21 proteínas (28%), sendo que todas foram relacionadas às comparações entre os grupos controle e experimentais e experimentais que receberam a mesma concentração de Pb e foram suplementados com Fe. Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 20 mg/kg FeSO₄ foram detectadas sete proteínas, três com expressão diminuída no segundo grupo, sendo elas *Septin-11*, *40S ribosomal protein AS*, e *Alpha-internexin (Alpha-Inx)*, e quatro proteínas com expressão aumentada no segundo grupo, *Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1*, *Stathmin*, *Septin-2* e *Dihydropyrimidinase-related protein 2*. Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 100 mg/L Pb, foram detectadas cinco proteínas, sendo que três tiveram a sua expressão diminuída (*Septin-11*, *Actin cytoplasmic 1* e *Actin cytoplasmic 2*), e duas tiveram a sua expressão aumentada (*Septin-2* e *Dihydropyrimidinase-related protein 2*).

Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 100 mg/L Pb, mas foi suplementado com 20 mg/kg FeSO₄, das sete proteínas identificadas com diferença de expressão, com exceção da proteína *Dihydropyrimidinase-related protein 2* que teve a sua expressão aumentada no segundo grupo, todas tiveram sua expressão diminuída no segundo grupo (*Actin cytoplasmic 1* e *Actin cytoplasmic 2*, *Actin aortic smooth muscle*, *Actin gamma-enteric smooth muscle*, *Actin alpha cardiac muscle 1* e *Actin alpha skeletal muscle*). Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 400 mg/L Pb, foram observadas 15 proteínas com diferença de expressão, sendo que dessas 11 tiveram a sua expressão diminuída no segundo grupo (*Septin-11*, *40S ribosomal protein AS*, *Actin cytoplasmic 1* e *Actin cytoplasmic 2*, *Actin aortic smooth muscle*, *Actin gamma-enteric smooth muscle*, *Actin alpha cardiac muscle 1* e *Actin alpha skeletal muscle*, *Tubulin alpha-1A chain*, *Tubulin alpha-1B chain*, *Tubulin alpha-1C chain*) e quatro aumentaram a sua expressão no segundo grupo [(*Tropomyosin alpha-3 chain*, *Tropomyosin alpha-1 chain*, *Eukaryotic initiation factor 4A-II*, *Beta-soluble NSF attachment protein (SNAP-beta)*]. Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 400 mg/L Pb, mas foi suplementado com 20 mg/kg FeSO₄, das quatro proteínas identificadas com diferença de expressão, duas diminuíram a sua expressão no segundo grupo [(*Alpha-internexin (Alpha-Inx)* e *Alpha-centractin (Centractin)*], e duas aumentaram a sua expressão no segundo grupo (*Septin-2* e *Dihydropyrimidinase-related protein 2*). Na comparação entre grupos que receberam a mesma concentração de Pb com seu par que foi suplementado com FeSO₄, foi observado que para a menor concentração (100 mg/L Pb) foi identificada somente a proteína *Dihydropyrimidinase-related protein 2*, que teve a sua expressão diminuída no segundo grupo. Já no grupo que recebeu a concentração de 400 mg/L Pb foram detectadas somente duas proteínas com expressão aumentada no grupo que recebeu a suplementação com 20 mg/kg FeSO₄, sendo elas *40S ribosomal protein AS* e *Dihydropyrimidinase-related protein 2*.

4.4.3 Proteínas relacionadas a processo celular

As proteínas pertencentes à categoria “processos celulares” desempenham especialmente as funções relacionadas à defesa do organismo e à regulação intracelular. Nesta categoria, foram identificadas 22 proteínas (30%), sendo que a

maioria delas foram relacionadas às comparações entre os grupos controle e experimentais (20 mg/Kg FeSO₄, 100 mg/L Pb + FeSO₄, e 400 mg/L Pb) e o grupo que recebeu a maior concentração de Pb 400 mg/L Pb comparado ao que foi suplementado com 20 mg/Kg de FeSO₄. Além disso, a proteína específica *Peroxiredoxin-1* não teve diferença de expressão entre os grupos, mas foi detectada nos grupos controle, grupo que recebeu 20 mg/kg FeSO₄, 100 mg/L Pb + FeSO₄, 400 mg/L Pb e 400 mg/L Pb + FeSO₄.

Das proteínas identificadas com diferença de expressão na comparação entre os grupos controle e o que recebeu 20 mg/kg FeSO₄, foram detectadas três proteínas, sendo a *Glial fibrillary acidic protein*, com sua expressão aumentada no segundo grupo e as proteínas *Neurofilament light polypeptide* e *Neurofilament medium polypeptide*, com sua expressão diminuída. Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 100 mg/L Pb suplementado com 20 mg/Kg de FeSO₄ foram detectadas três proteínas que tiveram a sua expressão diminuída no segundo grupo (*Neurofilament heavy polypeptide*, *V-type proton ATPase subunit B*, *brain isoform* e *Transitional endoplasmic reticulum ATPase*). Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 400 mg/L Pb, sete proteínas demonstraram diferença de expressão, sendo que as proteínas *Glial fibrillary acidic protein*, *Gamma-enolase* e *Peroxiredoxin-2* tiveram a sua expressão aumentada no segundo grupo, e as demais (*Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha*, *7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase*, *Mothers against decapentaplegic homolog 4*, *Peroxiredoxin-6* e *Gamma-aminobutyric acid receptor subunit pi*), tiveram a expressão diminuída neste mesmo grupo. Na comparação entre o grupo que recebeu a concentração de 400 mg/L Pb, e seu par suplementado com 20 mg/kg FeSO₄, 11 proteínas demonstraram diferença de expressão, sendo que seis diminuíram a expressão no segundo grupo (*Ketimine reductase mu-crystallin*, *Glial fibrillary acidic protein*, *Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1*, *Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2*, *Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-3* e *14-3-3 protein epsilon*), e, cinco aumentaram a sua expressão no segundo grupo (*14-3-3 protein gamma*, *14-3-3 protein beta/alpha*, *14-3-3 protein eta*, *14-3-3 protein theta* e *Gamma-enolase*).

4.4.4 Proteínas relacionadas a vias de informação

As proteínas que desempenham funções nas vias de Informação têm como função principal a síntese e degradação de DNA e RNA.

Foram classificadas como pertencentes a esta categoria nove proteínas (12%), que demonstraram diferença de expressão na comparação entre os grupos controle e experimentais (20 mg/Kg FeSO₄, 100 mg/L Pb e 400 mg/L Pb) e o grupo que recebeu a maior concentração de Pb 400 mg/L Pb comparado ao que foi suplementado com 20 mg/Kg de FeSO₄. Além disso, a proteína *Kelch-like protein 22* não teve diferença de expressão entre os grupos, mas foi detectada nos grupos controle, e grupos que receberam 20 mg/kg FeSO₄, 100 mg/L Pb, 100 mg/L Pb + FeSO₄ e 400 mg/L Pb + FeSO₄.

Na comparação entre o grupo controle e o grupo suplementado com 20 mg/Kg FeSO₄, somente a proteína *Heat shock-related 70 kDa protein 4* apresentou sua expressão diminuída no segundo grupo. Ao comparar o grupo controle com o grupo que recebeu 100 mg/L Pb, duas proteínas (*Proteasome subunit alpha type-6* e *Rho GDP-dissociation inhibitor 1*), tiveram a sua expressão diminuída no segundo grupo. Na comparação entre o grupo controle e o grupo que recebeu 400 mg/L Pb, duas proteínas (*Heat shock 70 kDa protein 4* e *Cbp/p300-interacting transactivator 4*), tiveram a sua expressão diminuída no segundo grupo, enquanto que três proteínas (*Heat shock-related 70 kDa protein 2*, *Heat shock 70 kDa protein 1A/1B*, *Heat shock 70 kDa protein 1-like*) tiveram sua expressão aumentada no segundo grupo. Na comparação entre o grupo que recebeu a concentração de 400 mg/L Pb, e seu par suplementado com 20 mg/kg FeSO₄, uma proteína (*Heat shock cognate 71 kDa protein*), apresentou a sua expressão aumentada, no segundo grupo.

4.4.5 Miscelânea

A categoria miscelânea faz referencia a vírus, componentes de origem externa, ou àquelas proteínas que não apresentam uma função clara, passível de classificação nas demais categorias funcionais propostas por Rison, Hodgman e

Thornton (2000). Nesta categoria foram encontradas três proteínas (4%), sendo que uma (*D-dopachrome decarboxylase*) não apresentou diferença de expressão entre os grupos e esteve presente nos grupos controle e nos grupos que receberam somente 20 mg/kg FeSO₄, 100 mg/L Pb, 100 mg/L Pb + FeSO₄, e 400 mg/L Pb + FeSO₄. Outra proteína, a *Alcohol dehydrogenase 1*, apresentou sua expressão diminuída no grupo que recebeu 100mg/L Pb, comparada ao controle e no grupo que recebeu esta mesma concentração de Pb e foi suplementado com FeSO₄, quando este grupo foi comparado com o seu par não suplementado. A proteína *Homer protein homolog 1* aumentou a sua expressão no grupo que recebeu 400 mg/L Pb quando comparado ao controle e diminuiu a sua expressão no grupo que recebeu 400 mg/L Pb e foi suplementado com FeSO₄, quando comparado ao seu par que recebeu a mesma concentração e não recebeu a suplementação.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A ação tóxica do chumbo no homem tem sido documentada pela literatura de forma robusta. Neste sentido, têm sido intensificadas as pesquisas no intuito de estabelecer mecanismos de proteção contra os efeitos tóxicos, como agentes antioxidantes, substâncias com poder quelante, etc. (GURER; ERCAL, 2000; GAUTAM; FLORA, 2010). Dentre estas substâncias, destaca-se o ferro, a medida em que as pesquisas apontam que o mesmo poderia diminuir a concentração de Pb no sangue, proteger a integridade da barreira hematoencefálica, bem como prevenir contra a citotoxicidade e apoptose celular induzida (BRADMAN et al., 2001; WANG et al., 2007a, 2007b). Neste sentido, nosso grupo de pesquisa iniciou uma série de estudos onde o tratamento com Pb, associado ou não à suplementação com FeSO_4 foi relacionado com substâncias oxidantes/antioxidantes no cérebro (FERREIRA, 2012), Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) (ZUCKI, 2013) e ao Potencial Evocado Auditivo Cortical (PEAC) (DUARTE, 2013). No estudo de Ferreira (2012), observou-se que as enzimas SOD e GPX e a GSH são afetadas pela exposição ao Pb e a exposição ao sulfato ferroso alterou essa dinâmica, mas tendeu a provocar um efeito oxidante e não neutralizador. Os trabalhos subsequentes, envolvendo análises funcionais de potenciais evocados auditivos vão de encontro a estes achados. No estudo de Zucki (2013), PEATE mostrou diferença estatisticamente significativa para o interpico I-II nos grupos experimentais 100 mg/L Pb e 400 mg/L Pb e interpico I-IV, quando comparados os grupos 100 mg/L Pb e 100 mg/L Pb + FeSO_4 . Na análise proteômica, o efeito protetor do Fe não pôde ser confirmado através das proteínas identificadas, o que vem de encontro ao estudo de Duarte (2013), onde a latência média dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC foi maior para os animais do grupo 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO_4 , os quais, na análise histológica, apresentaram aumento de espaços pericelulares no córtex cerebral. A ausência de efeito protetor do Fe na intoxicação causada pelo Pb pode ser devida à dose utilizada neste estudo (20 mg/Kg peso corporal), que foi capaz de reduzir as concentrações de Pb no córtex cerebral, mas não a sua toxicidade. Isto pode ser devido à alta dose de Fe utilizada, já que estudos que empregaram doses de 7 mg/Kg de FeSO_4 relataram efeito protetor (WANG et al., 2007a). Dentre as justificativas para este efeito é que a administração do Fe é capaz de aumentar a

quantidade de hemoglobina circulante no sangue (BRADMAN et al., 2001; RONDÓ et al., 2006), reduzindo assim, os níveis de Pb no sangue e, consequentemente nos tecidos.

A etapa subsequente de análise proteômica realizada no presente estudo teve por objetivo procurar desvendar os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos da interação entre a alta dose de Pb (400 mg/L) associado ao Fe (20 mg/Kg) nos achados funcionais descritos por Duarte (2013), referentes ao aumento da latência média dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC neste grupo. Entretanto, foi também feita uma comparação entre o grupo controle e todos os grupos tratados e ainda entre os grupos tratados com Pb e os respectivos grupos tratados com Fe, na tentativa de se buscar alterações no perfil de expressão proteica que ainda não tivessem refletido em alterações funcionais.

A análise do perfil proteico dos diferentes grupos avaliados mostrou que tanto o Pb quanto o Fe foram capazes de reduzir a expressão das proteínas identificadas (Gráfico 1), similar ao que foi relatado por Zucki (2013) na análise proteômica do tronco encefálico. No presente estudo, foram identificadas 75 proteínas, pertencentes a diferentes categorias funcionais, que apresentaram diferença de expressão entre os grupos.

5.1 PROTEÍNAS RELACIONADAS AO METABOLISMO

De modo geral, as proteínas pertencentes a esta categoria estão relacionadas a função de obtenção de energia e degradação de macromoléculas e pequenas moléculas.

Uma das proteínas de metabolismo identificadas foi a *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial* que é uma flavoproteína que contém no centro ferro-enzofre. É a maior e mais importante enzima da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Complexo I) seguida da Coenzima Q - citocromo c redutase (Complexo III) e citocromo c oxidase (complexo IV) (LOEFFEN et al., 1998). Ela também desempenha um papel no mecanismo de apoptose, sendo observada uma correlação entre a atividade mitocondrial e morte celular programada (MURRAY et al., 2003). Esta proteína teve a sua expressão diminuída em todos os

grupos que receberam a suplementação com FeSO₄, além do grupo que recebeu a menor concentração de Pb (100 mg/L). Estes achados sugerem que tanto o Fe, quanto o Pb (na concentração mais baixa) são capazes de interferir na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, gerando um distúrbio no metabolismo desta organela, favorecendo o processo de apoptose celular. Outra enzima que participa do processo de metabolismo mitocondrial que teve a sua expressão diminuída no grupo que recebeu a menor concentração de Pb (100 mg/L) é a *Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial* que é um componente essencial da cadeia respiratória celular. Em certas condições fisiológicas, inibidores do complexo bc1 do citocromo mitocondrial podem induzir a formação de superóxido, levando ao estresse oxidativo (ZHAO et al., 2010). Por outro lado, a expressão desta proteína aumentou no grupo que recebeu a maior concentração de Pb (400 mg/L) e foi suplementado com Fe (20 mg/Kg), numa possível tentativa de resgatar a função mitocondrial.

Outra enzima com função no metabolismo energético é a *Creatine kinase B-type* que está presente nos tecidos que consomem muita energia, como no cérebro (WALLIMANN et al., 1992). Sua função é manter a homeostase da energia celular cerebral, mas também está envolvida na neuroproteção. Esta enzima é importante para a manutenção e distribuição da energia celular nos neurônios e astrócitos (STREIJGER et al., 2005). Neste contexto, tem sido amplamente demonstrado que uma diminuição da atividade desta proteína está associada a um precursor neurodegenerativo que resulta em perda neuronal em doenças neurodegenerativas (BONG et al., 2008). Neste estudo, esta enzima apresentou sua expressão diminuída no grupo que recebeu 100 mg/L Pb e aumentou no grupo que recebeu 400 mg/L Pb.

O efeito das diferentes concentrações de Pb no presente estudo sobre as três proteínas citadas acima foi de diminuir a expressão na baixa concentração de Pb (100 mg/L) e aumentar a expressão na alta concentração (400 mg/L). Acredita-se assim que em baixas concentrações o Pb poderia levar a uma perturbação nos mecanismos de transporte de elétrons pela mitocôndria e na homeostase energética da célula, levando ao estresse oxidativo e, tendo um efeito sobre os mecanismos de apoptose celular. Tais processos poderiam acarretar em danos aos neurônios. Já foi relatado anteriormente que em certas condições de estresse oxidativo ocorre uma

diminuição na expressão da *Creatine kinase B-type*, levando a danos neurodegenerativos, relacionados a uma diminuição da capacidade de aprendizagem e memória (LUI et al., 2008). Por outro lado, na alta concentração de Pb (400 mg/L), os danos oxidativos causados as células neuronais devem ser mais intensos, e, assim, o aumento na expressão destas proteínas pode estar relacionado a um mecanismo de proteção celular na tentativa de manter a homeostase energética, pois o aumento de substratos referentes aos danos oxidativos levaria a um aumento no transporte de elétrons entre mitocôndria e citosol que é requerida para compensar os danos causados pelo Pb ao tecido cerebral.

A *Fructose-bisphosphate aldolase A*, também conhecida como *Aldolase A*, é uma enzima glicolítica encontrada no embrião em desenvolvimento, diminuindo sua expressão após o nascimento e atingindo seus níveis máximos na vida adulta, nos músculos e cérebro. A deficiência da Aldolase A está associada com miopatia e anemia hemolítica. Esta proteína teve a sua expressão diminuída em quase todos os grupos experimentais quando comparado ao controle, com exceção do grupo 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄ onde sua expressão aumentou. Por outro lado, ao comparar o grupo que recebeu menor concentração de Pb (100 mg/L) com seu par suplementado (100 mg/L Pb + 20 mg/Kg), a expressão desta proteína também foi diminuída no segundo grupo. Isso nos faz pensar que tanto o Fe quanto o Pb foram capazes de alterar a expressão desta proteína interferindo, assim, no mecanismo energético da via glicolítica. Recentemente, Zucki (2013), verificou a presença da proteína *Fructose-bisphosphate aldolase C* exclusivamente no grupo que recebeu a menor concentração de Pb (100 mg/L), justificando que a presença desta proteína pode 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. A alteração na expressão de outra enzima glicolítica, a *Fosfoglicerato mutase 1* que teve a sua expressão diminuída no grupo que recebeu a menor concentração de Pb (100 mg/L), e aumentou quando houve a suplementação com o Fe (20 mg/Kg), e também no grupo que recebeu a maior concentração de Pb (400 mg/L), tem sido relatada como um precursor de doenças neurodegenerativas (HITOSUGII et al., 2012). Assim, fica evidente que já em baixas concentrações o Pb pode ser capaz de interferir no mecanismo de obtenção de energia das células cerebrais, levando à

neurodegeneração, parecendo o Fe, em algumas situações, ter um efeito neuroprotetor, aumentando a expressão destas proteínas. Do mesmo modo, na alta concentração de Pb, o aumento da expressão de determinadas proteínas de metabolismo celular parece estar relacionado a um mecanismo de compensação dos danos causados pelo Pb. É importante ressaltar que, de uma forma geral, foi possível observar que a maioria das proteínas de metabolismo celular teve a sua expressão diminuída, tanto por ação do Pb, quanto por ação do Fe. O grupo onde foi possível observar com maior ênfase este achado foi o grupo que recebeu a maior concentração de Pb (400 mg/L), pois de 12 proteínas identificadas, nove tiveram a sua expressão diminuída. Sendo assim, tanto o Fe quanto o Pb foram capazes de interferir nos mecanismo energético das células, levando a prováveis danos oxidativos.

5.2 PROTEÍNAS RELACIONADAS A ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA ESTRUTURA

As proteínas pertencentes à categoria de estrutura e organização da estrutura desempenham funções relacionadas ao citoesqueleto e membrana celular. Dentre elas destaca-se a *Septin 11* que é uma GTPase que atua na formação do filamento do citoesqueleto (BARTSCH et al., 2010). No cérebro, ela desempenha um papel na citoarquitetura dos neurônios, incluindo a arborização dendrítica e espinhas dendríticas por estar presente na base de saliências dendríticas e nos pontos de bifurcação dos ramos dendríticos, da conectividade sináptica GABAérgica (MOSTOWY et al., 2011). Ela se expressa em altos níveis no cerebelo, bulbo olfatório, hipocampo, córtex cerebral, tálamo e corpo estriado. No hipocampo, tem forte expressão nas células piramidais do estrato piramidal e nas regiões CA2-CA3. Esta proteína teve a sua expressão diminuída nos grupos FeSO₄, 100 mg/L Pb e 400 mg/L Pb quando comparado ao controle, e não demonstrou diferença de expressão na comparação entre o grupo controle e os grupos que receberam as mesmas concentrações de Pb suplementados com o Fe. Isso nos leva a pensar que a ação independente do Fe e do Pb, mesmo que em baixa concentração, é capaz de interferir na citoarquitetura dos neurônios, principalmente no que diz respeito à sua conectividade. Por outro lado, a ação conjunta destes, Fe e Pb, parece não causar o

mesmo efeito deletério. O efeito da ação do Pb interferindo na citoarquitetura no cérebro fica ainda mais evidente ao analisar a expressão das proteínas *Actin cytoplasmic*, que é um grupo de proteínas globulares com multifunções que formam os microfilamentos, que é um dos três maiores componentes do citoesqueleto celular. Estes microfilamentos desempenham um importante papel na mobilidade e contração celular durante a divisão celular, movimentação de organelas e vesículas, sinalização celular e manutenção e estabelecimento da junção celular. Além da função de formar os microfilamentos, esta proteína também apresenta um importante papel na fisiologia celular e apoptose. Todas as proteínas *Actin* identificadas neste estudo diminuíram de expressão. Elas foram identificadas na comparação do grupo controle com 100 mg/L Pb, e deste grupo com seu par suplementado (100 mg/L + 20 mg/Kg FeSO₄) e o grupo que recebeu a maior concentração de Pb (400 mg/L) comparado ao grupo controle. Sendo assim, fica claro que o Pb é capaz de interferir negativamente na citoarquitetura, e este efeito parece não ser reduzido com o uso de Fe como protetor destas estruturas. Estes achados de certa forma vão ao encontro do trabalho de Duarte (2013), que observou, na análise histológica, um aumento de espaços pericelulares no córtex cerebral dos animais tratados com 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄.

Já a *Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2)* desempenha um importante papel na polaridade, desenvolvimento neuronal, crescimento e orientação axonal, colapso do cone de crescimento neuronal, migração das células e sinalização sináptica através de interações com os canais de cálcio. A hiperfosforilação desta proteína pode desempenhar um papel no desenvolvimento da doença de Alzheimer. Esta proteína teve a sua expressão aumentada em quase todos os grupos experimentais, com exceção do grupo que recebeu 400 mg/L Pb, em que não foi verificada diferença de expressão de forma significativa. Isso nos leva a pensar que tanto o Fe quanto a menor concentração de Pb (100 mg/L), foram capazes de causar um estímulo para a produção aumentada desta proteína. E a alteração na expressão desta proteína pode ser um sinal de danos que podem estar associados a doenças neurodegenerativas, já que foi demonstrado o aumento de sua expressão na doença de Alzheimer (CASTEGNA et al., 2002). Outra proteína que pode nos levar a pensar em alterações precursoras destas doenças é a diferença de expressão na proteína *SEPT2* que desempenha um importante papel

na citocinese, na ligação da actina em adesões focais e na reorganização do citoesqueleto (DAMALIO, 2011). No cérebro de ratos, a *SEPT2* faz parte de um complexo multi-septina que desempenha um papel na secreção e crescimento de neurites. Esta proteína tem tido a sua expressão aumentada em cérebros de pacientes com doença de Alzheimer, sugerindo um papel na neurodegeneração. Ela teve a sua expressão aumentada nos grupos que receberam, somente FeSO_4 , 100 mg/L Pb e 400 mg/L Pb, comparados ao grupo controle, sendo que este aumento pode estar relacionado à tentativa de uma reestruturação da arquitetura celular devido aos danos causados pelo Pb, como um precursor de doenças neurodegenerativas. A *Alpha-internexin* são proteínas em alfa-hélice, que se agrupam de forma hierárquica, resultando em filamentos intermediários que formam as estruturas filamentosas no citoplasma e núcleo das células. Esta rede estrutural conecta as membranas celulares, organelas citoplasmáticas e o núcleo. A sua função principal é a de dar rigidez e elasticidade à célula (PERROT; EYER, 2009). Irregularidades na expressão genética das proteínas dos filamentos intermédios causam fragilidade e distrofias celulares. Os neurofilamentos são a classe mais abundante de filamentos de neurónios adultos no sistema nervoso central e periférico. Eles também estão associados a doenças neurodegenerativas, como a esclerose lateral amiotrófica ou atrofia muscular espinal infantil (RUIZ-EDERRA; VECINO, 2001). Nas doenças neurodegenerativas, ocorre uma falha na montagem dos neurofilamentos com acumulação de neurofilamentos dentro da soma e axónios dos neurónios motores. Esta proteína teve a sua expressão diminuída nos grupos tratados com FeSO_4 e no grupo que recebeu tratamento com 400 mg/L Pb suplementado com FeSO_4 . Esta última alteração poderia explicar o aumento da latência média dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC neste grupo, no estudo de Duarte (2013).

De uma forma geral, foi possível observar que a maioria das proteínas identificadas com função de estrutura celular e que tiveram diferença de expressão na comparação entre o grupo controle e experimentais, ou na comparação entre os grupos que receberam as duas dosagens de Pb e foram suplementados com Fe, tiveram a sua expressão diminuída, na maioria das vezes, tanto por ação do Pb, quanto por ação do Fe. O grupo onde é possível observar com maior ênfase a diminuição de expressão destas proteínas, é o grupo que recebeu a maior

concentração de Pb (400 mg/L), pois de 15 proteínas identificadas neste grupo com função de estrutura, 11 tiveram a sua expressão diminuída.

5.3 PROTEÍNAS RELACIONADAS A PROCESSOS CELULARES

As proteínas pertencentes à categoria “processos celulares” estão relacionadas às funções de defesa do organismo e à regulação intracelular.

As proteínas *14-3-3* são uma família de proteínas, atualmente conhecidas por sete isoformas *14-3-3 beta*, *épsilon*, *gama*, *eta*, *Sigma*, *tau* e *teta*. Estas foram evoluídas a partir de uma proteína específica do cérebro, sendo abundantes neste órgão. Elas têm a capacidade de se ligar funcionalmente a uma variedade de proteínas celulares, incluindo quinases, fosfatases, e receptores transmembranares, desempenhando papéis biológicos importantes em uma variedade de processos vitais de regulação, tais como resposta celular ao estímulo da insulina, apoptose, regulação da diferenciação dos neurônios, regulação da transdução de sinal, regulação negativa da atividade da proteína-quinase, regulação da plasticidade sináptica, ciclo celular (mitose - transição G2 / M) e direcionamento de proteínas (FU; SUBRAMANIAN; MASTERS, 2000; MOURA; VIDAL, 2011). Estas proteínas têm sido abundantemente expressas no cérebro e fluido cerebrospinal de pacientes com diferentes doenças neurológicas (STEINACKER; AITKEN; OTTO, 2011). As isoformas *14-3-3 gama*, *beta*, *eta* e *teta* mostraram aumento de expressão no grupo que recebeu a maior concentração de Pb suplementado com Fe, quando comparado ao seu par não suplementado. Acredita-se que o aumento da expressão desta proteína no cérebro dos animais do referido grupo poderia estar associado a um possível desenvolvimento de doenças neurológicas potencializadas pela associação entre Fe a altas concentrações de Pb, podendo ainda estar associado com o aumento da latência média dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC neste grupo, no estudo de Duarte (2013).

A proteína *Gamma-enolase*, pertence à família das *Enolases*, na qual já foram identificados mais de 20 membros (LUKK et al., 2012), são consideradas proteínas multifuncionais, pois além de serem enzimas chave na atividade glicolítica, podem servir como receptor de plasminogênio na superfície de células

hematopoiéticas, epiteliais e endoteliais e, conseqüentemente, desempenhar um papel importante no sistema intravascular e pericelular. As *Enolases* ainda podem atuar como uma *Heat shock protein* e ligar estruturas do citoesqueleto e cromatina, indicando assim a capacidade de desempenharem um papel crucial na transcrição gênica e processos fisiopatológicos (PANCHOLI, 2001). A proteína *Gamma-enolase* mostrou a sua expressão aumentada no grupo que recebeu a maior concentração de Pb comparada ao grupo controle e no grupo que recebeu a maior concentração de Pb suplementado com Fe comparado ao seu par não suplementado. Sendo assim, fica evidente que a alta dosagem de Pb foi capaz de danificar as células neuronais, mostrando que o aumento da expressão desta proteína pode indicar a ocorrências dos mecanismos fisiopatológicos ocorrendo neste tecido e sendo potencializado quando utilizado o Fe. Duarte (2013), já havia demonstrado recentemente que a resposta fisiológica do sistema auditivo central encontra-se alterada quando utilizada a maior dosagem de Pb associada ao uso do Fe.

As proteínas *Neurofilament light polypeptide*, *Neurofilament medium polypeptide* e *Neurofilament heavy polypeptide* são codificadas pelo gene que fornece as instruções para fazer o componente de suporte dos neurofilamentos, que são montados a partir de subunidades leves, médias, pesadas. Estes são essenciais para a função normal dos nervos. Eles formam um quadro estrutural, que ajuda a definir a forma e tamanho das células nervosas. A ligação entre os neurofilamentos mantém o diâmetro da fibra, ou axônios, que se estende a partir de uma célula nervosa. Este diâmetro axonal adequado é essencial para a condução de impulsos nervosos. Eles também podem desempenhar um papel no transporte intracelular de axônios e dendritos. Estas proteínas também são utilizadas como biomarcador de danos neuronais. Elas são abundantes em neurônios durante o desenvolvimento e na regeneração do sistema nervoso central e periférico (TOSK et al., 1996; JULIEN; MUSHYNSKI, 1998). Estas proteínas tiveram a sua expressão diminuída no grupo que recebeu somente a suplementação com o Fe (*Neurofilament light polypeptide* e *Neurofilament medium polypeptide*) e no grupo que recebeu a menor concentração de Pb também suplementado com Fe (*Neurofilament medium polypeptide*). Este fato nos leva a pensar que o Fe parece ter tido um efeito na redução da expressão destas proteínas. Zucki (2013), verificou aumento da expressão da *Neurofilament light polypeptide* nos grupos FeSO₄ e 100 mg/L Pb quando comparados ao Controle,

bem como na comparação entre os grupos FeSO_4 e 400 mg/L Pb + FeSO_4 , a qual estava aumentada neste último. O fato de a expressão dessa proteína estar aumentada nesses grupos pode ser devido a uma tentativa de o organismo compensar os possíveis efeitos tóxicos tanto por parte do chumbo, quanto por parte do ferro. Importante ressaltar que no referido estudo a estrutura avaliada foi tronco encefálico, que estruturalmente é composta por muitos prolongamentos de neurônios.

Outra proteína, a *Glial fibrillary acidic protein* é expressa por numerosos tipos de células do sistema nervoso central (SNC), incluindo os astrócitos e as células ependimais que ajuda a manter a força mecânica dos astrócitos (LUPHEN et al., 2004, CULLEN; SIMON; LAPLACA, 2007). Também está envolvida em muitos processos importantes do sistema nervoso central, incluindo a comunicação entre as células, astrocito-neurônio e o funcionamento da barreira hemato-encefálica. Ela é necessária para muitas funções críticas do CNS, e a perturbação em sua expressão pode levar a doenças neurodegenerativas que incluem mielinização anormal, deterioração das estruturas de matéria branca, e insuficiência funcional/estrutural da barreira hemato endcefálica (LIEDTKE et al., 1996). Esta proteína também tem mostrado ser importante na reparação após uma lesão no SNC, principalmente para o seu papel na formação de cicatrizes gliais numa multiplicidade de locais do SNC (PAETAU et al., 1985). Em casos de danos a estrutura do SNC os astrócitos interagem com o tecido fibroso para re-estabelecer a área da lesão e é parcialmente mediado por esta proteína (SMITH; ENG, 1987). Ela teve a sua expressão aumentada no grupo tratado com 20 mg/Kg de FeSO_4 e no grupo que recebeu a maior dosagem de Pb (400 mg/L Pb) comparados ao grupo controle e diminuída no grupo que recebeu a maior concentração de Pb suplementado com Fe (400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO_4) comparado ao seu par não suplementado. O aumento desta proteína pode ser atribuído a injúrias nas células do SNC, pois tem sido relatado que o aumento desta proteína está relacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (KIM et al., 2006), neste caso tendo o Fe e a alta dose de Pb como seu ativador. Efeito contrário, pode ocorrer na alta concentração de Pb quando ocorre a suplementação com Fe, onde parece que este último não potencializa os efeitos do Pb e talvez pode ter causado algum mecanismo de proteção nestas estruturas.

De uma forma geral, foi possível observar que a maioria das proteínas identificadas com função processos celulares e que tiveram diferença de expressão na comparação entre o grupo controle e experimentais, ou na comparação entre os grupos que receberam as duas dosagens de Pb e foram suplementados com Fe, tiveram a sua expressão diminuída, por ação do Fe e por ação do Pb. Em nenhum grupo foi possível observar com maior ênfase a diminuição de expressão das proteínas relacionadas a função de processos celulares.

5.4 PROTEÍNAS RELACIONADAS A VIAS DE INFORMAÇÃO

As proteínas relacionadas a vias de informação atuam especialmente nos processos de síntese e degradação de DNA e RNA. Nesta categoria funcional foram encontradas oito proteínas que mostraram diferença de expressão nas comparações entre o grupo controle e os grupos suplementados com 20 mg/Kg de FeSO₄, 100 mg/L de Pb, 400 mg/L de Pb e na comparação entre este último grupo e seu par suplementados com FeSO₄ (20 mg/Kg). Dentre estas proteínas, a maior parte delas, cinco, são pertencentes à família *Heat Shock* (*Heat shock-related 70 kDa protein 4*, *Heat shock-related 70 kDa protein 2*, *Heat shock 70 kDa protein 1A/1B*, *Heat shock 70 kDa protein 1-like*, *Heat shock cognate 71 kDa protein*). Com exceção da *Heat shock-related 70 kDa protein 4*, as demais proteínas desta família tiveram a sua expressão aumentada no grupo que recebeu a maior concentração de Pb comparado ao grupo controle, sendo que a última, *Heat shock cognate 71 kDa protein*, mostrou a sua expressão aumentada no grupo que recebeu a maior concentração de Pb, suplementado com Fe, comparado ao seu par não suplementado. Situações de estresse ambientais, infecções, processos fisiológicos normais e transferência de genes podem levar a um aumento na produção desta família de proteínas como um mecanismo de proteção contra insultos prejudiciais à célula (CHEN et al., 1999). Os mecanismos pelos quais elas protegem as células ainda não são bem entendidos, mas a sua expressão pode ser modulada por transdutores de sinal celular, tais como alterações no pH intracelular, AMP cíclico, Ca⁺², Na⁺, trifosfato de inositol, proteína quinase C, e fosfatases (FEDER; HOFMANN, 1999). Tem sido relatado que no cérebro estas proteínas desempenham funções relacionadas ao processo de degradação de proteínas, à fusão de

membrana e endocitose, à diferenciação neuronal, ao estresse oxidativo e à apoptose. O aumento da expressão das *Heat Shock* no cérebro tem sido relacionado a danos causados por agentes neurotóxicos, drogas, metais potencialmente tóxicos, estresse oxidativo e outros estados fisiopatológicos (FREYALDENHOVEN; ALI, 1997). Neste sentido, a alta concentração de Pb pode ter sido o gatilho para desencadear o aumento na expressão destas proteínas como um mecanismo de proteção. Vale ressaltar que não houve diferença de expressão ao comparar o grupo controle com o grupo que recebeu a maior concentração de Pb suplementado com Fe, o que pode sugerir que o Fe tenha funcionado com um protetor do SNC, relacionado aos danos desta concentração de Pb para algumas das proteínas desta família.

A proteína *Heat shock-related 70 kDa protein 4*, mostrou a sua expressão diminuída nos grupos suplementados com 20 mg/Kg e 400 mg/L de Pb comparados ao grupo controle. A diminuição de expressão desta proteína tem sido compreendida como uma resistência celular para danos relacionados a hipertermia, privação de energia, estresse oxidativo, entre outros (FREYALDENHOVEN; ALI, 1997). Zucki (2013) verificou expressão diminuída das proteínas *Heat Shock related 70 kDa protein 2* e *cognate 71 kDa protein* no tronco encefálico de animais que receberam a menor concentração de Pb (100 mg/L) em comparação ao Controle, sugerindo que o Pb, já em baixas concentrações, seria capaz de promover o estresse oxidativo neuronal.

5.5 PROTEÍNAS RELACIONADAS À CATEGORIA MISCELÂNEA

A proteína *Homer protein homolog 1* é uma proteína expressa no sistema nervoso central, pertencente a uma família com três membros, predominantemente localizada na densidade pós-sináptica em neurônios e que age como proteínas adaptadoras para muitas proteínas de densidade pós-sinápticas. Os agrupamentos *Homer* regulam e facilitam a transdução do sinal, estão envolvidas na plasticidade sináptica e sinalização pelo cálcio (SHIRAISHI-YAMAGUCHI; FURUICHI, 2007; HAYASHI et al., 2009). A expressão da proteína *Homer 1* é induzida pela atividade neuronal (MEYER; BONHOEFFER; SCHEUSS, 2014) e tem sido relatado alterações

em sua expressão em casos de distúrbios neurológicos (TAO-CHENG et al., 2014). No presente estudo, esta proteína teve a sua expressão aumentada no grupo que recebeu a maior concentração de Pb comparada ao grupo controle e comparada ao seu par suplementado com Fe. Isso mostra que o Pb foi capaz de alterar a atividade sináptica dos neurônios, e que o Fe, quando associado à maior concentração de Pb, parece ter atuado na manutenção da normalidade da atividade sináptica. Ao verificar este achado com os resultados encontrados no estudo de Duarte (2013), a expressão aumentada desta proteína no grupo tratado com 400 mg/L Pb não suplementado com Fe, quando comparado ao seu par suplementado, pode ter sido responsável pela ausência de alteração nos componentes do PEAC no grupo não suplementado, por facilitar a condução da resposta elétrica e, consequentemente, as sinapses nas vias auditivas centrais.

Este trabalho fecha uma série de estudos nos quais procurou-se desvendar os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos tóxicos causados pelo Pb no sistema nervoso central, e como a suplementação com Fe interfere neste processo. Quando analisados em conjunto, os dados do nosso grupo de pesquisa sugerem que o FeSO_4 , administrado na dose de 20 mg/Kg de peso por dia a cada dois dias não tem efeito protetor na intoxicação induzida pelo Pb, apesar de diminuir as concentrações plasmáticas e cerebrais do mesmo. Pelo contrário, parece exacerbar os efeitos tóxicos, já que quando co-administrado com dose elevada de Pb (400 mg/L) leva a aumento da latência média dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC e dos espaços pericelulares no córtex cerebral. Os mecanismos moleculares envolvidos nestes efeitos parecem ser mediados por proteínas como *Gamma-enolase* e *Alpha-internexin*, que têm sua expressão diminuída e várias isoformas de 14-3-3, que apresentam aumento de expressão mediante a este tratamento. Em adição o aumento da expressão da *Homer protein homolog 1* no grupo tratado com 400 mg/L Pb em comparação ao 400 mg/L Pb exposto ao FeSO_4 poderia melhorar a atividade sináptica dos neurônios, contribuindo para ausência de efeitos funcionais no sistema auditivo.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a administração tanto de Pb, quanto de Fe altera o perfil de expressão proteica no córtex cerebral de ratos, levando, na maioria dos casos, a uma redução na expressão de proteínas, pertencentes a todas as classes funcionais.

O presente estudo, associado a achados anteriores, aponta para um papel deletério do Pb no córtex cerebral dos animais expostos a este metal, independente da concentração utilizada, não sendo possível observar um efeito protetor do FeSO₄. Este processo parece ser mediado por proteínas como *Gamma-enolase*, *Alpha-internexin*, várias isoformas de *14-3-3* e *Homer protein homolog 1*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

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

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

Ahamed M, Siddiqui MKJ. Environmental lead toxicity and nutritional factors. *Clin Nutr*. 2007;26(4):400-8.

Alabdullah H, Bareford D, Braithwaite R, Chipman K. Blood lead levels in iron-deficient and non iron-deficient adults. *Clin Lab Haematol*. 2005;27(2):105-9.

Almeida BSV. Análise do proteoma do fluido intercelular de folhas de laranjeiras infectadas com *Xylella fastidiosa* [dissertação]. Piracicaba (SP): Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo; 2001.

Andrade A. Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis* [tese]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2006.

Bartsch I, Blaser S, Roseler S, Sandrock K, Busse A, Huber M, et al. Human endothelial and platelet septin SEPT11: cloning of novel variants and characterisation of interaction partners. *Thromb Haemost*. 2010;104(6):1201-10.

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. *Anal Chim Acta*. 2009;646(1-2):23-9.

Bong S, Moon J, Nam K, Lee K, Chi Y, Hwang K. Structural studies of human brain-type creatine kinase complexed with the ADP-Mg²⁺-NO₃⁻-creatine transition-state analogue complex. *FEBS Lett*. 2008;582(28):3959-65.

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;72:248-54.

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.

- Candiano G, Ruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004;25(9):1327-33.
- Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, et al. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, a-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem*. 2002;82(6):1524-32.
- Chen HC, Guh JY, Tsai JH, Lai YH. Induction of heat shock protein 70 protects mesangial cells against oxidative injury. *Kidney Int*. 1999;56(4):1270-3.
- Cory-Slechta DA, Weiss B, Cox C. Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1983;71(3):342-52.
- Cullen DK, Simon CM, LaPlaca MC. Strain rate-dependent induction of reactive astrogliosis and cell death in three-dimensional neuronal-astrocytic co-cultures. *Brain Res*. 2007;1158:103-15.
- da Silva Neto BR, Fátima JS, Mendes-Giannini MJ, Lenzi HL, Soares CMA, Pereira M. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. *BMC Microbiol*. 2009;9:272.
- Damalia JCP. Estudos bioquímicos, funcionais e estruturais da septina humana SEPT2: fatores que determinam a formação de agregados [tese]. São Carlos (SP): Física Aplicada, Instituto de Física de São Carlos; 2011.
- Dass C. Fundamentals of contemporary mass spectrometry. New Jersey, USA: John Wiley and Sons; 2007.
- Deshane J, Chaves L, Sarkonda KV, Isbell S, Wilson L, Kirk M, et al. Proteomics analysis of rat brain protein modulations by grape seed extract. *J Agric Food Chem*. 2004;52(26):7872-83.
- 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: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2013.
- Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. 1999;61(1):243-82.
- 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.

- Freyaldenhoven TE, Ali SF. Role of heat shock proteins in MPTP-induced neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;825:167-78.
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:617-47.
- 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;26:563-70.
- GE-Healthcare. 2-D Electrophoreses: principles and methods. Buckinghamshire: GE Healthcare; 2004.
- Gilbert ME, Mack CM, Lasley SM. Chronic developmental lead (Pb++) exposure increases threshold for long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Brain Res.* 1996;736(1-2):118-24.
- Gilbert ME, Mack CM, Lasley SM. Developmental lead exposure reduces the magnitude of long-term potentiation. *Neurotoxicology.* 1999a;20(1):71-82.
- Gilbert ME, Mack CM, Lasley SM. The influence of a developmental period of lead exposure on long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Neurotoxicology.* 1999b;20(1):57-69.
- 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.
- Görg A, Boguth G, Obermaier C, Weiss W. Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient. *Electrophoresis.* 1998;19(8-9):1516-19.
- Gu C, Chen S, Xu X, Zheng L, Li Y, Wu K, et al. Lead and cadmium synergistically enhance the expression of divalent metal transporter 1 protein in central nervous system of developing rats. *Neurochem Res.* 2009;34(6):1150-56.
- Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2000;29(10):927-45.
- Hayashi MK, Tang C, Verpelli C, Narayanan R, Stearns MH, Xu RM, et al. The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure. *Cell.* 2009;137(1):159-71.
- Hitosugi T, Zhou L, Elf S, Fan J, Kang HB, Seo JH, et al. Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth. *Cancer Cell.* 2012;22(5):585-60.

Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998;61:1-23.

Kim H, Deshane J, Barnes S, Meleth S. Proteomics analysis of the actions of grape seed extract in rat brain: technological and biological implications for the study of the actions of psychoactive compounds. *Life Sci*. 2006;78(18):2060-5.

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.

Lasley SM, Gilbert ME. Rat hippocampal glutamate and GABA release exhibit biphasic effects as a function of chronic lead exposure level. *Toxicol Sci*. 2002;66(1):139-47.

Li KW, Hornshaw MP, Van der Schors RC, Watson R, Tate S, Casetta B, et al. Proteomic analysis of rat brain postsynaptic density (implication of the diverse protein functional groups for the integration of synaptic physiology). *J Biol Chem*. 2004;279(2):987-1002.

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

Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, et al. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*. 1996;17(4):607-15.

Loeffen JL, Triepels RH, van den Heuvel LP, Schuelke M, Buskens CA, Smeets RJ, et al. cDNA of eight nuclear encoded subunits of NADH:ubiquinone oxidoreductase: human complex I cDNA characterization completed. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;253(2):415-22.

Lui J, Han D, Li Y, Zheng L, Gu C, Piao Z, et al. Lead affects apoptosis and related gene XIAP and Smac expression in the hippocampus of developing rats. *Neurochem Res*. 2008;35(3):473-9.

Lukk T, Sakaia A, Kalyanaraman C, Brown SD, Imker HJ, Song L, et al. Homology models guide discovery of diverse enzyme specificities among dipeptide epimerases in the enolase superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(11):4122-7.

Lupien C, Brenner M, Guérin SL, Salesse C. Expression of glial fibrillary acidic protein in primary cultures of human Müller cells. *Exp Eye Res*. 2004;79(3):423-9.

Magalhães AD. Subproteômica de *Trypanossoma Cruzi*: proteínas básicas e fosfoproteomas [tese]. Brasília (DF): Faculdade de medicina, Universidade de Brasília; 2010.

Mainenti HRD. Correlação entre a exposição ao chumbo e a atividade enzimática ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALA-D), paratormônio (PTH) e fatores nutricionais em crianças [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; 2006.

Mann P, Højrup P, Roepstorff P. Use of MS molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom*. 1993;22(6):338-45.

Meyer D, Bonhoeffer T, Scheuss V. Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron*. 2014;82(2):430-43.

Moreira MFR, Neves EB. Uso de chumbo em urina como indicador de exposição e sua relação com chumbo no sangue. *Cad Saúde Pública*. 2008;24(9):2151-59.

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

Mostowy S, Janel S, Forestier C, Roduit C, Kasas S, Pizarro-Cerdá J, et al. A role for septins in the interaction between the *listeria monocytogenes* invasion protein InlB and the Met receptor. *Biophys J*. 2011;100(8):1949-59.

Moura PR, Vidal FAP. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. *Scientia Medica (Porto Alegre)*. 2011;21(1):31-6.

Murray J, Zhang B, Taylor SW, Oglesbee D, Fahy E, Marusich MF, et al. The subunit composition of the human NADH dehydrogenase obtained by rapid one-step immunopurification. *J Biol Chem*. 2003;278(16):13619-22.

Nakamura MS. Intoxicação por chumbo. *Rev Oxidol*. 2002;jan./fev./mar.:37-42.

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.

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

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

- Paetau A, Elovaara I, Paasivuo R, Virtanen I, Palo J, Haltia M. Glial filaments are a major brain fraction in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Acta Neuropathol.* 1985;65(3-4):190-4.
- Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(7):902-20.
- Park OK. Proteomic studies in plants. *J Biochem Mol Biol.* 2004;37(1):133-8.
- Perrot R, Eyer J. Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders. *Brain Res Bull.* 2009;80(4-5):282-95.
- Pierce WM, Cai J. Applications of mass spectrometry in proteomics. *Contrib Nephrol.* 2004;141:40-58.
- Poon HF, Castegna A, Farr SA, Thongboonkerd V, Lynn BC, Banks WA, et al. Quantitative proteomics analysis of specific protein expression and oxidative modification in age senescence-accelerated-prone 8 mice brain. *Neuroscience.* 2004;126(4):915-26.
- Poon HF, Shepherd HM, Reed TT, Calabrese V, Stella AMG, Pennisi G, et al. Proteomic analysis provides insight into caloric restriction mediated oxidation and expression of brain proteomics associated with age-related impaired cellular processes: mitochondrial dysfunction, glutamate dysregulation and impaired protein synthesis. *Neurobiol Aging.* 2006;27(7):1020-34.
- Press MF. Lead encephalopathy in neonatal Long-Evans rats: morphologic studies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1977;36(1):169-93.
- Qian ZM, Morgan EH. Effect of lead on the transport of transferrin-free and transferrin-bound iron into rabbit reticulocytes. *Biochem Pharmacol.* 1990;40(5):1049-54.
- Reinders J, Sickmann A. *Proteomics: methods and protocols.* New York: Humana Press; 2002. p. 71-2.
- Rison SC, Hodgman TC, Thornton JM. Comparison of functional annotation schemes for genomes. *Funct Integr Genomics.* 2000;1(1):56-69.
- Rondó PHC, Carvalho MFH, Souza MC, Moraes F. Concentrações de chumbo, hemoglobina, zinco protoporfirina e ferritina em crianças. *Rev Saúde Pública.* 2006;40(1):71-6.
- Ruiz-Ederra J, Vecino E. Neurofilaments in neurodegenerative diseases. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2001;76(12):699-710.

Salvato F, Carvalho MCGG, Leite AL. Strategies for protein separation. In: Leung HCE, editor. Integrative proteomics. Croatia: InTech; 2012. p. 3.

Sanín LH, González-Cossío T, Romieu I, Hernández-Avila M. Acumulación de plomo en hueso y sus efectos en la salud. Salud Publica Mex. 1998;40(4):359-68.

Sechi S. Mass spectrometric approaches to quantitative proteomics. Contrib Nephrol. 2004;141:59-78.

Sharifi AM, Mousavi SH, Jorjani, M. Effect of chronic lead exposure on pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 protein expression in rat hippocampus in vivo. Cell Mol Neurobiol. 2010;30(5):769-74.

Shiraishi-Yamaguchi Y, Furuichi T. The Homer family proteins. Genome Biol. 2007;8(2):206.

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.

Silva MAS, Corrêa GC, Reis EM. Proteômica: uma abordagem funcional do estudo do genoma. Saúde & Amb Rev. 2007;2(2):1-10.

Silva RS, Souza CRB. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. Acta Amaz. 2009; 39(2):255-60.

Smith ME, Eng LF. Glial fibrillary acidic protein in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. J Neurosci Res. 1987;18(1):203-8.

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.

Souza AM, Tavares CFF. Chumbo e anemia. Medicina (Ribeirão Preto). 2009;42(3):337-40.

Steinacker P, Aitken A, Otto M. 14-3-3 proteins in neurodegeneration. Semin Cell Dev Biol. 2011;22(7):696-704.

Streijger F, Oerlemans F, Ellenbroek BA, Jost CR, Wieringa B, Van der Zee CE. Structural and behavioural consequences of double deficiency for creatine kinases BCK and UbCKmit. Behav Brain Res. 2005;157(2):219-34.

Tao-Cheng JH, Thein S, Yang Y, Reese TS, Gallant PE. Homer is concentrated at the postsynaptic density and does not redistribute after acute synaptic stimulation. Neuroscience. 2014;266:80-90.

Thiede B, Höhenwater W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, et al. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 2005;35(3):237-47.

Thongboonkerd V, Klein E, Klein JB. Sample preparation for 2-D proteomic analysis. *Contrib Nephrol*. 2004;141:11-24.

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.

Tosk JM, Farag M, Ho JY, Lee CC, Maximos BB, Yung HH. 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.

Verstraeten SV, Aimo L, Oteiza PI. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch Toxicol*. 2008;82(11):789-802.

Villeda-Hernández J, Barroso-Moguel R, Méndez-Armenta M, Nava-Ruíz 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.

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem J*. 1992;281(Pt 1):21-40.

Wang Q, Luo W, Zhang W, Dai Z, Chen Y, Chen J. Iron supplementation protects against lead-induced apoptosis through MAPK pathway in weanling rat cortex. *Neurotoxicology*. 2007a;28(4):850-59.

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. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007b;219(1):33-41.

Westermeier R, Naven T. *Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2002.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphrey-Smith I, Hochstrasser DF, et al. 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.

World Health Organization. *Environmental health criteria 165: inorganic lead*. International Programme on Chemical Safety. Finland (Vammala): WHO; 1995.

Zhao PL, Wang L, Zhu XL, Huang X, Zhan CG, Wu JW, et al. Subnanomolar inhibitor of cytochrome bc1 complex designed by optimizing interaction with conformationally flexible residues. *J Am Chem Soc*. 2010;132(1):185-94.

Zheng W, Aschner M, Gherzi-Egea JF. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003;192(1):1-11.

Zucki F. Potencial evocado auditivo de tronco encefálico e análise proteômica em ratos expostos a chumbo e suplementados com ferro [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.

ANEXO

ANEXO A - Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB/USP

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