UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação dos efeitos do chumbo no proteoma plasmático de
trabalhadores expostos ao metal**

Andréia Ávila Soares de Oliveira

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação dos efeitos do chumbo no proteoma plasmático de
trabalhadores expostos ao metal**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Toxicologia

Orientada: Andréia Ávila Soares de
Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa
Júnior

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 08/03/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

RESUMO

OLIVEIRA, A.A.S. **Avaliação dos efeitos do chumbo no proteoma plasmático de trabalhadores expostos ao metal**. 2017. 91f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O chumbo (Pb) é um metal tóxico e promove diversos efeitos adversos no organismo que incluem distúrbios neurológicos, hematopoiéticos, esqueléticos, renais e cardiovasculares. A análise proteômica tem se tornado cada vez mais uma ferramenta importante na elucidação de mecanismos de toxicidade, bem como na identificação de potenciais biomarcadores. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi comparar diferenças de abundância de proteínas plasmáticas em amostras de sangue coletadas de trabalhadores de uma fábrica de baterias automotivas, e de um grupo sem histórico de exposição ocupacional ao Pb. Pb no sangue total (Pb-S) foi determinado por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Para a análise proteômica, o plasma foi separado do sangue total, seguido de depleção de albumina e imunoglobulina G (IgG) através de cromatografia de imunoafinidade. Em seguida, foi realizada digestão das proteínas com tripsina e os peptídeos foram analisados no sistema nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas em tandem SYNAPT® G2-Si HDMS. A identificação das proteínas foi realizada através do banco de dados SwissProt e as proteínas identificadas com pelo menos 3 peptídeos foram classificadas de acordo com o banco de dados do *Gene Ontology* (GO) e ranqueadas através de algoritmos de classificação utilizando a mineração de dados. A quantificação das proteínas foi realizada por *label-free* e foram consideradas proteínas com diferença de abundância aquelas com *fold-change* $\geq 1,5$ e $p > 0,05$ através do teste *t* de *Student*. A média de Pb-S para os grupos expostos ocupacionalmente e sem histórico de exposição ocupacional foi de 43,7 $\mu\text{g/dL}$ e 0,386 $\mu\text{g/dL}$, respectivamente. No total, 82 proteínas foram identificadas no plasma e apenas 4 proteínas apresentaram *fold change* $\geq 1,5$, sendo elas: Apolipoproteína B-100 (APOB) e α -II-antiplasmina (A2AP2), além de plasminogênio (PLMN) e gelsolina (GELS) cuja diferença de abundância entre os grupos foi significativa ($p=0,036$ e $<0,01$, respectivamente). As proteínas com diferença de abundância também foram classificadas entre as mais importantes para a diferenciação dos grupos através da mineração de dados. Assim, o presente estudo foi capaz de demonstrar diferenças de abundância em proteínas plasmáticas entre indivíduos com elevadas concentrações de Pb-S e com baixas concentrações de Pb-S, evidenciando possíveis novos mecanismos de toxicidade do metal.

Palavras-chave: metais, proteômica, mecanismos de ação, exposição ocupacional.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A.A.S. **Evaluation of plasma proteome in lead-exposed workers.** 2017. 91f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Lead (Pb) is a toxic metal and may cause several adverse effects including neurological, hematopoietic, skeletal, renal and cardiovascular disorders. Proteomic analyses have become an important tool for the discovery of new mechanism of toxicity as well to identify potential new biomarkers of metal exposure, which may help in early detection of toxic effects. This study aimed to evaluate the differences in the plasma proteome of two groups: i) Pb-exposed workers and ii) a group with no occupational lead exposure history. Blood samples were collected for blood lead levels (BLL) determination by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and for proteomic analyses in plasma fraction. Plasma samples were separated from whole blood using centrifugation. Antibody-based affinity columns were used to deplete plasma fractions from albumin and immunoglobulin G (IgG). Thereafter, proteins were digested with trypsin solution and peptide analyses were conducted using a nanoACQUITY UPLC System coupled to a SYNAPT® G2-Si tandem mass spectrometer. Identification of proteins were performed against SwissProt database and proteins identified by at least three peptides were classified according to the Gene Ontology terms (GO). In addition, identified proteins were ranked through classification algorithms by data mining analyses. Proteins quantitation was performed by label-free and only proteins with fold-change ≥ 1.5 were considered differentially expressed. Mean BLL were 43.7 $\mu\text{g/dL}$ and 0.386 $\mu\text{g/dL}$ for occupational and non-occupational lead exposed groups, respectively. Eighty-two proteins were identified in the plasma samples out of which only four – plasminogen (PLMN), gelsolin (GELS), α -II-anti-plasmin (A2AP2) and apolipoprotein B-100 (APOB) showed ≥ 1.5 folds differential abundance. Differential abundances were confirmed for PLMN and GELS proteins ($p=0.036$ and <0.01 , respectively). In conclusion, the present study indicated that the plasma proteome was a function of BLL in the individuals.

Keywords: heavy metals, proteomics, mechanism of action, occupational exposure.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O elemento químico chumbo (Pb): aspectos gerais

O chumbo (Pb) é um metal de número atômico 82, massa atômica 207, coloração acinzentada ou azulado brilhante e se encontra amplamente distribuído na crosta terrestre. O Pb possui ponto de fusão a 327°C entrando em ebulição ao atingir cerca de 1740°C e pode ser encontrado no meio ambiente sob quatro formas isotópicas em ordem de abundância: ^{208}Pb , ^{206}Pb , ^{207}Pb e ^{204}Pb (BUCHWEITZ *et al.* 2015). O Pb pode ser encontrado na natureza em sua forma livre ou ainda, em associação com outros elementos tais como cromo (Cr), arsênio (As), molibdênio (Mo) e oxigênio (O) formando compostos como o cromato de chumbo (PbCrO_4), arseniato de chumbo (PbHAsO_4), molibdato de chumbo (PbMoO_4) e óxidos de chumbo, como o monóxido de chumbo (PbO), dióxido de chumbo (PbO_2) e trióxido de chumbo (PbO_3). Além disso, combinado com o enxofre (S), o Pb ocorre na forma de sulfeto (PbS), também conhecido como galena, sendo sob esta forma um dos mais abundantes minérios de Pb (ATSDR, 2007).

As principais fontes naturais de emissão de Pb incluem a atividade vulcânica e o intemperismo geoquímico. Já as fontes de emissão antropogênica incluem a mineração, a produção, o uso e a disposição final de materiais que contém o metal (CHANEY & RYAN, 1994).

Devido às propriedades físico-químicas características, como baixo ponto de fusão, resistência à corrosão, maleabilidade e ductilidade, o Pb foi um dos primeiros metais manipulados pelo homem e atualmente o metal e seus compostos são amplamente utilizados em diversas atividades humanas. Dentre as principais aplicações, se destacam o uso como componente na manufatura da borracha; na produção de aditivos plásticos, cristais, cerâmicas, esmaltes, tintas, pigmentos e vernizes; na fabricação de lâminas de alta flexibilidade e resistência; em soldas e revestimentos na indústria automotiva; em placas protetoras contra radiações ionizantes; em ligas metálicas, como constituinte de vitrificados e revestimento de cabos, e na produção, reforma e reciclagem de acumuladores elétricos, entre outros (PAOLIELLO & DE CAPITANI, 2003).

1.2. Produção de Pb no Brasil

O Brasil não possui produção primária de Pb metálico refinado, isto é, a partir da extração do minério e posteriores processos de refinamento e por isso atualmente há dependência de importação para suprir a sua demanda. Dessa forma, toda produção de Pb no país é obtida a partir da reciclagem de material usado, especialmente recuperadas do setor de baterias para fins automotivos, industriais e de telecomunicações. Com uma capacidade em torno de 170 mil toneladas por ano, as principais usinas refinadoras responsáveis por este processo estão localizadas nos estados de Pernambuco, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul (DNPM, 2015).

Segundo dados do Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM, 2015), a produção secundária de Pb metálico no Brasil foi estimada em 160 mil toneladas no ano de 2014, um aumento de 5,5% em relação ao ano de 2013, o que correspondeu a venda de 15,5 milhões de baterias para o mercado de reposição em um total de 16,5 milhões de baterias coletadas para a reciclagem de Pb. Os maiores consumidores da produção secundária de Pb metálico no Brasil são os fabricantes de baterias automotivas e industriais, os quais correspondem a 82,1 e 9,3% do consumo nacional de Pb metálico, respectivamente.

O Brasil possui um amplo parque industrial voltado para a fabricação de baterias automotivas do tipo chumbo-ácidas, sendo as atividades concentradas nos estados de São Paulo e Paraná. Com uma produção aproximada em 18,7 milhões de baterias por ano, o setor de baterias chumbo-ácido emprega cerca de 8 mil trabalhadores em todo o país segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Dessa forma, esta atividade constitui uma importante fonte de exposição ao Pb para estes trabalhadores (BNDES, 2013).

1.3. Exposição ocupacional ao Pb: indicadores de exposição e efeito

A exposição ao Pb é considerada ocupacional quando há a utilização do metal em alguma etapa no processo e/ou sua presença no ambiente de trabalho (CAPITANI *et al.* 2009). As baterias chumbo-ácido também conhecidas por acumuladores de Pb, consistem basicamente em um conjunto de placas e dois eletrodos compostos de Pb metálico e PbO₂, ambos mergulhados em uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄)

localizadas no interior de uma malha de liga de Pb e antimônio (Sb), a qual é mais resistente à corrosão quando comparada ao Pb em seu estado natural. Quando o circuito externo é fechado, a bateria entra em funcionamento ocorrendo a semi-reação de oxidação do ânodo de Pb e a redução do cátodo de PbO₂ (MAEDA *et al.* 2014). Dessa forma, ainda que nas fábricas de baterias exista maneiras para evitar a contaminação do ambiente de trabalho e a exposição do trabalhador, tais como sistemas exaustores, filtradores e de resfriamento do ambiente, além do uso de equipamentos de produção individual (EPI's) por parte dos trabalhadores, em várias etapas do processo de produção das baterias podem ocorrer a emissão de vapores ou dispersão de PbO₂ na forma de partículas suspensas no ar, sendo assim, uma forma de exposição crônica para os trabalhadores (GOTTESFELD *et al.* 2011).

O monitoramento da exposição ocupacional constitui-se como parte integrante e fundamental dos programas destinados à prevenção do risco à saúde do trabalhador, sendo preconizada e exigida pela Norma Regulamentadora nº 9 (NR-9) do Ministério do Trabalho e Emprego do Governo Federal do Brasil e tem como função estabelecer os princípios básicos para avaliação e monitoramento da exposição ocupacional a agentes químicos, físicos e biológicos, incluindo o Pb. Nesse sentido, a avaliação da exposição ocupacional deve ser realizada tanto por meio de monitoramento ambiental, ou seja, através da determinação dos agentes presentes na atmosfera do ambiente de trabalho; quanto por meio de monitoramento biológico, o qual consiste na determinação do agente e/ou seus metabólitos nos tecidos, secreções ou ar expirado dos trabalhadores expostos para avaliar a exposição e o risco à saúde comparando-se resultados obtidos com referências apropriadas, sendo que os parâmetros avaliados para este fim, são denominados de indicadores biológicos ou biomarcadores (ROSA; SIQUEIRA & COLACIOPPO, 2008).

Dessa forma, a fim de minimizar os efeitos adversos causados pela exposição ao Pb, o Ministério do Trabalho e Emprego do Governo Federal do Brasil estabeleceu através da NR-15 (Portaria MTb nº 3.214, de 08 de junho de 1978) os limites de tolerância (LT) em relação à concentração máxima do metal no ambiente de trabalho o qual foi então fixado em 100 µg/m³ de Pb no ar (Pb-ar) para jornadas de 48 h semanais para o monitoramento ambiental de Pb. Além disso, a NR-15 também estabeleceu que medidas preventivas devem ser adotadas sempre que o valor de Pb-ar atingir a metade daquele recomendado como LT, valor este denominado de nível de ação (NA).

Posteriormente, através da NR-7 (Portaria GM n.º 3.214, de 08 de junho de 1978, modificada pela Portaria SSST n.º 24, de 29 de dezembro de 1994) estabeleceu-se a determinação de Pb no sangue total (Pb-S) como biomarcador de exposição para monitoramento biológico dos trabalhadores expostos, o qual reflete a dose real do xenobiótico e estima portanto, o grau de exposição, desde que correlacionado com a concentração no ambiente de trabalho. A NR-7 também estabeleceu a determinação das concentrações do ácido delta-aminolevulínico urinário (ALA-U) e da zincoprotoporfirina no sangue (ZPP) como biomarcadores de efeito, uma vez que estes revelam uma alteração bioquímica reversível resultante dos efeitos adversos causados pela exposição ao metal.

Além disso, também foram estabelecidos os índices biológicos máximos permitidos (IBMP), definidos como “o valor máximo do indicador biológico para o qual se supõe que a maioria dos indivíduos ocupacionalmente expostos não corre risco de danos à saúde”, sendo estes fixados em 60 µg/dL, 10 mg/g de creatinina e 100 µg/dL, respectivamente: Pb-S, ALA-U e ZPP. Com base em dados obtidos a partir de populações não expostas no Brasil, a NR-7 também apresenta os valores denominados de referência (VR), sendo estes de até 40 µg/dL de Pb-S, até 4,5 mg de ALA-U/g de creatinina e até 40 µg/dL de ZPP. Segundo a NR-7, a periodicidade de avaliação dos biomarcadores deve ser no mínimo, semestral, podendo ser reduzida a critério do médico coordenador, ou por notificação do médico agente da inspeção do trabalho, ou ainda, mediante negociação coletiva de trabalho.

Para efeitos de comparação, os valores permissíveis por legislação americana, de acordo com a Administração de Saúde e Segurança Ocupacional (*Occupational Safety and Health Administration*, OSHA, EUA) não devem exceder a concentração de 30 µg/m³ de Pb-ar e 40 µg/dL de Pb-S como indicador de exposição, não devendo, portanto, ultrapassar estes limites. Como se pode ver, um enorme contraste é observado em relação aos limites das concentrações de Pb-ar: como mencionado, no Brasil a legislação estabelece a concentração de 100 µg de Pb/m³; esta mesma concentração de acordo com o Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos (*National Institutes for Occupational Safety and Health*, NIOSH, EUA), é caracterizada como “concentração imediatamente perigosa à vida ou à saúde”. A discrepância entre estes dados demonstra a necessidade de uma revisão da legislação brasileira, visto que a última atualização a respeito foi publicada em 1994. Ainda, a OSHA não estabelece limites para concentrações de ALA-U e ZPP,

uma vez que a relação entre a exposição ao metal e as concentrações destes biomarcadores não estão muito bem estabelecidas e podem apresentar amplas variações.

Apesar dos poucos dados relacionados à exposição e efeitos adversos decorrentes da exposição ocupacional ao Pb no Brasil, as informações disponíveis apontam para uma prevalência de exposição relativamente alta. Estudos conduzidos com 22 trabalhadores de fábricas de baterias que ocupavam diversas funções na cidade do Rio de Janeiro, demonstraram que 55% dos trabalhadores apresentavam concentração média de Pb-S acima de 25 µg/dL, sendo que as maiores concentrações foram observadas em trabalhadores dos setores de empilhamento e solda (ARAÚJO *et al.* 1999). Também na cidade do Rio de Janeiro, estudos conduzidos por Caldeira e colaboradores (2000) relataram concentração média de Pb-S de 64 µg/dL em 17 trabalhadores de fábricas de baterias pertencentes ao setor de montagem.

Na cidade de Bauru, interior do estado de São Paulo, Demarchi e colaboradores (1999) relataram que 23% dos trabalhadores de uma fábrica de baterias possuíam concentrações de Pb-S entre 41 e 60 µg/dL, enquanto 18% apresentavam concentrações acima de 60 µg/dL. Também no interior do estado de São Paulo, desta vez na região de Campinas, estudos avaliando 19 trabalhadores de diversas indústrias as quais envolviam trabalho com Pb, constataram que a média de Pb-S era de 90 µg/dL, e que 31,5% dos indivíduos apresentavam sintomas de intoxicação aguda e mais da metade (68,5%) dos trabalhadores apresentavam sintomas clínicos de exposição crônica ao metal (DE CAPITANI *et al.* 2004). Casos de exposição mais preocupantes foram relatados em estudo conduzido por Melo Mattos e colaboradores (1994), que observaram que 70% dos trabalhadores (n=1520) de diversas empresas envolvendo Pb na região metropolitana de Belo Horizonte, apresentavam concentrações de Pb-S acima de 40 µg/dL e destes, 35% apresentavam concentrações acima de 60 µg/dL.

Recentemente, estudos conduzidos por Martins e colaboradores (2015) com 257 trabalhadores de fábricas de baterias no estado do Paraná, demonstrou concentração média de Pb-S de 24 µg/dL, variando de 1,5 a 68 µg/dL. A média das concentrações de Pb-S observadas nesse estudo foi relativamente menor quando comparada a estudo anterior onde os autores encontraram concentração média de 45 µg/dL de Pb-S em um estudo conduzido com 62 trabalhadores de fábricas de baterias também expostos ao Pb no interior do estado do Paraná (MENEGOTTO &

PAOLIELLO, 2001). Ainda na região sul, desta vez na região de Porto Alegre, Minozzo e colaboradores (2008) encontraram concentração média de Pb-S de 59 µg/dL em estudo conduzido com 53 trabalhadores de uma usina de reciclagem de Pb.

Como pode ser observado, de uma forma geral, estes estudos demonstram que no Brasil existe uma elevada exposição ao Pb em indivíduos cuja função ocupacional envolve o metal, especialmente trabalhadores de fábricas de baterias automotivas. Apesar da existência de normas e regulamentações federais que preconizam valores máximos permissíveis, as concentrações encontradas por muitas vezes, superam o valor máximo estabelecido.

1.4. Comportamento do Pb no organismo

1.4.1. Toxicocinética

A absorção de Pb no organismo ocorre principalmente através do trato gastrointestinal e respiratório. No caso das exposições ocupacionais a via respiratória é considerada a mais importante (ATSDR, 2007). Aproximadamente 30 – 40% do Pb inalado pode ser absorvido, sendo esta absorção favorecida em indivíduos fumantes e/ou com doenças das vias respiratórias superiores que possuem a atividade ciliar prejudicada, favorecendo assim, uma maior deposição de partículas de Pb no trato respiratório (SARYAN & ZENZ, 1994).

No trato gastrointestinal, a absorção de Pb pode ser influenciada tanto por fatores nutricionais quanto relacionados a idade do indivíduo. Nesse sentido, a deficiência dos íons cálcio (Ca^{2+}), ferro (Fe^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) bem como de vitamina C têm sido relacionados ao aumento da absorção de Pb (AHMED *et al.* 2007), enquanto a baixa ingestão de vitamina D pode estar indiretamente associada ao maior acúmulo de Pb no tecido ósseo (POUNDS *et al.* 1991). Em relação à idade, acredita-se que as crianças podem absorver mais que 50 % do Pb presente nos alimentos, água, poeira e solo contaminados, enquanto que em indivíduos adultos esta absorção varia de 10 – 15 % (MARKOWITZ, 2000).

Uma vez absorvido, o Pb se distribui inicialmente entre sangue e plasma. No sangue, a principal proteína de ligação ao Pb é a ácido δ-aminolevulínico (ALAD), a qual possui grande afinidade pelo metal (BERGDAHL *et al.* 1997). Já no plasma, o metal se encontra ligado principalmente à albumina, α2-globulina ou ainda, como íons

livres (GOYER, 1991). Apesar da fração plasmática ser relativamente menor quando comparada com o Pb presente nos eritrócitos – especialmente em baixas concentrações do metal no sangue – é nesta fração que o Pb está mais biodisponível e pode portanto, ser distribuído para tecidos moles como o fígado, rins, cérebro, pulmões, medula óssea e baço, além de tecidos mineralizados como ossos e dentes causando efeitos tóxicos (O'FLAHERTY, 1998; ATSDR, 2007).

De forma geral, os mecanismos de detoxificação de metais envolvem processos de transição do estado oxidativo, além de reações de alquilação e dealquilação. Ainda, a complexação dos íons metálicos com grupamentos sulfidrílicos ($-SH$), carboxílicos ($-COOH$) e grupamentos amino ($-NH_2$), dentre outro ligantes, também são considerados mecanismos de detoxificação para tais compostos (O'Flaherty, 1998). No caso do Pb, os únicos estudos avaliando mecanismos de detoxificação do metal foram realizados em plantas, e sugerem que a excreção do metal ocorre por meio da conjugação com glutathione (GUPTA *et al.* 2010).

O tecido ósseo é o principal compartimento de depósito do metal, chegando a armazenar cerca de 80 – 90% de todo o Pb presente no organismo em adultos, enquanto em crianças, a quantidade armazenada pode chegar até 70 %. Além disso, adultos e crianças se diferem em relação ao compartimento ósseo no qual o metal é armazenado, uma vez que em crianças o Pb é armazenado principalmente nos ossos trabeculares, enquanto em adultos, apesar do armazenamento em ossos trabeculares, a maior parte do metal se encontra nos ossos corticais. A meia vida do Pb no tecido ósseo é de cerca de 30 anos, no entanto, o metal contido nos ossos pode contribuir de maneira significativa para o aumento de sua concentração na corrente sanguínea, uma vez que pode ocorrer a difusão e/ou reabsorção devido a diversas condições fisiológicas e patológicas, tais como idade, gravidez, lactação, hipertireoidismo, doenças renais e osteoporose (PATRICK, 2006).

Em relação ao processo de excreção, cerca de 2/3 do Pb absorvido é eliminado pela urina (75 – 85%), sendo que estas concentrações se correlacionam diretamente com o Pb no plasma (O'FLAHERTY, 1993). Alternativamente, o Pb pode ser eliminado pela via biliar, cuja contribuição é de cerca de 15 %. Através de ambas as vias, o metal pode ainda sofrer reabsorção através dos túbulos renais distais, bem como através do sistema entero-hepático. Outras vias de eliminação incluem o suor, cabelo e unhas (<8%), além do leite materno. Embora esta via de eliminação apresente pouca

contribuição em relação à excreção do metal, do ponto de vista toxicológico representa um grande risco para o lactente (MOREIRA & MOREIRA, 2004).

Na Figura 1, pode ser observado o modelo de O'Flaherty para a toxicocinética do Pb no organismo. Dentre outros modelos descritos, este é o único que utiliza parâmetros fisiologicamente consistentes para descrever o volume, a composição e a atividade metabólica do sangue e tecidos que determinam a distribuição do Pb no organismo humano:

Figura 1: Modelo de O'Flaherty para a toxicocinética do Pb no organismo (Modificado de O'Flaherty, 1998).

1.4.2. Toxicodinâmica

1.4.2.1. Mecanismos de ação do Pb

Embora alguns mecanismos de toxicidade do Pb não estejam bem estabelecidos, os principais mecanismos de ação tóxica do metal estão relacionados a interação direta e não-específica com sítios de ligação para íons (LIDSKY & SCHNEIDER, 2003; GARZA *et al.* 2006; QUINTANAR-ESCORZA *et al.* 2007), ligação covalente a proteínas (GOERING, 1993) e indução ao aumento do estresse oxidativo celular (AHMED & SIDDIQUI, 2007).

Dentre os principais interações envolvidas na toxicidade do Pb no organismo, está a sua competição por sítios de ligação de Ca^{2+} e Zn^{2+} no organismo (AHMED *et al.* 2007), os quais representam cerca de 1/3 das interações do Pb com sítios não-específicos. Outros ligantes de Pb incluem átomos de oxigênio presentes em aminoácidos ou moléculas de água, seguido de ligantes contendo enxofre e nitrogênio (grupamentos $-\text{OH}$, $-\text{SH}$ e $-\text{NH}_2$, respectivamente) (KIRBERGER & YANG, 2008). Além disso, os mecanismos iônicos de toxicidade do Pb incluem ainda, a substituição dos íons magnésio (Mg^{2+}), Fe^{2+} e sódio (Na^+), afetando diversos processos dependentes destes íons no organismo (LIDSKY & SCHNEIDER, 2003). Em relação ao Na^+ , estudos têm demonstrado que tal interação resulta em efeitos sobre processos celulares importantes, tais como sinalização e adesão celular, maturação e enovelamento de proteínas, apoptose, transporte iônico e liberação de neurotransmissores, dentre outros (GARZA *et al.* 2006).

No que diz respeito à ação do Pb sobre o íon Ca^{2+} – uma molécula sinalizadora envolvida em diferentes processos celulares que vão desde a atividade sináptica até a comunicação e adesão celular – acredita-se que esta interação ocorra devido ao fato de que Pb e Ca^{2+} possuem raios atômicos semelhantes, o que resulta na capacidade do Pb de competir e substituir o íon em seus sítios específicos, consequentemente, causando a desregulação de homeostase de cálcio no organismo (RABINOWITZ, 1991). Nesse sentido, as interações entre Ca^{2+} e Pb são responsáveis portanto, pela incorporação de Pb no tecido ósseo (PEMMER *et al.* 2013). Estudos demonstraram que a interação entre Pb e Ca^{2+} também pode afetar seriamente o funcionamento de importantes neurotransmissores através da proteína quinase C, responsável pela regulação neuronal a longo prazo. Tal interação pode afetar também as concentrações de Na^+ , o qual é responsável por exemplo, pela geração do potencial de ação em tecidos excitatórios a fim de possibilitar a comunicação celular, além de possuir também papel importante na recaptação de neurotransmissores e regulação da captação e retenção de Ca^{2+} em terminais sinápticos isolados, denominados de sinaptossomas (BRESSLER *et al.* 1999).

As interações do Pb com outras proteínas também são consideradas de grande significado toxicológico pois podem resultar na inibição de enzimas importantes para a síntese do grupamento heme no organismo. Como exemplo, podem ser citadas as enzimas ácido aminolevulínico sintetase (ALA-S), coproporfirina oxidase (CPO) e ferroquelatase, além da ALAD, cuja inibição ocorre de maneira mais pronunciada e

por isso, tem sido utilizada na avaliação clínica para a estimativa do nível de exposição ao Pb (AHMED *et al.* 2005).

Além disso, como mencionado anteriormente, devido à afinidade do Pb com grupamentos tióis (–SH), o metal pode ainda se ligar a diversos componentes do sistema antioxidante endógeno, como por exemplo, o tripeptídeo glutatona (GSH), e as enzimas glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). O estresse oxidativo celular causado pela inibição destas enzimas é caracterizado, primeiramente pelo aumento da produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido (O_2^-), peroxinitrito ($ONOO^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^\bullet$). Posteriormente, ocorre a depleção da atividade da defesa antioxidante, resultando em danos celulares, tais como, danos em proteínas, indução à peroxidação lipídica e ainda, danos ao DNA (FLORA *et al.* 2012).

1.4.2.2. Alvos de toxicidade do Pb

O Pb não desempenha nenhum papel fisiológico no organismo, no entanto, está bem estabelecido que o metal pode interferir em diversos sistemas, tais como o sistema nervoso, hematopoiético, esquelético, renal, cardiovascular, reprodutivo e também o sistema endócrino (FLORA *et al.* 2012; DOUMOCHTSIS *et al.* 2009).

O sistema nervoso parece ser o principal e mais sensível alvo para a toxicidade induzida pela exposição ao Pb quando comparado com outros sistemas, sendo mais pronunciados os efeitos no sistema nervoso periférico em adultos, enquanto que em crianças, o sistema nervoso central é predominantemente o mais afetado (BELLINGER, 2004; BRENT, 2006). O Pb é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE), se acumulando em astrócitos, onde pode afetar tanto a função celular quanto a interação entre neurônios e células da glia (HOLTZMAN *et al.* 1984; BRESSLER *et al.* 1999; QIAN *et al.* 2001).

De forma geral, a exposição ao Pb tem sido associada a ocorrência de doenças neurodegenerativas, as quais se caracterizam por perda progressiva de certas regiões do cérebro, devido a danos na estrutura, função ou até mesmo a morte de neurônios (LEE & FREEMAN, 2014). Nesse sentido, estudos em saúde ocupacional têm demonstrado uma correlação positiva entre o aumento das concentrações de Pb-S e a incidência e/ou risco para o desenvolvimento da doença de Parkinson (KUHN *et al.*

1998; COON *et al.* 2006; GORELL *et al.* 1997). Já estudos publicados pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (*National Institutes of Health*, NIH), observaram um aumento do risco de ocorrência de esclerose lateral amiotrófica (ELA) em indivíduos que relataram exposição ocupacional ao Pb, indicando que talvez o Pb exerça algum papel na etiologia da doença (KAMEL *et al.* 2003; FANG *et al.* 2010). Além disso, apesar de não estar diretamente associado à doença, estudos demonstraram uma relação entre a exposição ao Pb e a diminuição de funções cognitivas relacionadas a doença de Alzheimer (DORSEY *et al.* 2006; SCHWARTZ *et al.* 2005). Estudos com animais também demonstraram uma relação entre a exposição ao Pb e expressão de proteínas e biomarcadores indicativos de doenças neurodegenerativas, dentre elas, a doença de Alzheimer (GU *et al.* 2012; 2011). Por fim, a ocorrência de encefalopatias também tem sido descrita como uma das principais consequências da exposição ao Pb (FLORA *et al.* 2012). Neste grupo de doenças caracterizadas por alterações na estrutura e funções cerebrais, os sinais e sintomas incluem apatia, irritabilidade, dores de cabeça frequentes, falta de atenção, dores musculares, perda de memória, convulsões e demência (DAMIANI *et al.* 2013).

Como mencionado anteriormente, o Pb afeta o sistema hematopoiético por interagir negativamente com proteínas envolvidas na biossíntese do grupamento heme nos eritrócitos, cujo processo envolve uma série de etapas e enzimas. De maneira sucinta, inicialmente na matriz mitocondrial ocorre a formação de ALA a partir de glicina e succinil Co-A, sendo esta reação catalisada pela enzima ALA-S. Posteriormente, a ALAD catalisa a formação de porfobilinogênio a partir de duas moléculas de ALA. Após sucessivas reações ocorre a formação do coproporfirinogênio III que é oxidado a protoporfirinogênio IX pela CPO. De volta à matriz mitocondrial, no produto da oxidação do protoporfirinogênio IX – chamado de porfirina – é introduzido Fe^{2+} a partir da ação da ferroquelatase, resultando assim, na formação do grupo heme (LAYER *et al.* 2010).

O Pb possui a capacidade de interagir basicamente com ALAD, ALA-S, CPO e a ferroquelatase. Dentre estas, a interação mais importante parece ser a inibição da ALAD, a qual ocorre devido a afinidade do Pb com grupamentos –SH da enzima. (GONICK *et al.* 2011). Como resultado da inibição da ALAD e ALA-S, ocorre o acúmulo de ALA no plasma e urina, o qual pode ser detectado em níveis de Pb-S menores que 10 $\mu\text{g/dL}$ (MAKINO *et al.* 2000). Em relação à ferroquelatase, sua inibição pelo Pb resulta em acúmulo de protoporfirina nos eritrócitos, além da

formação de ZPP visto que ocorre a incorporação de Zn no lugar do Fe para formar a porfirina. Por esta razão, a quantificação de ZPP no sangue tem sido utilizada como biomarcador de efeito ao metal (MARTIN *et al.* 2004).

Neste contexto, os efeitos do Pb na produção do grupamento heme resultam na ocorrência de diversos tipos de anemia não só por interferir na biosíntese de heme, mas também por causar uma diminuição do tempo de vida dos eritrócitos, embora para este último os mecanismos não estejam muito bem estabelecidos. Em geral, as anemias causadas pela intoxicação por Pb são do tipo hipocrômicas, normo ou microcíticas, com presença de pontilhados basófilos e geralmente se encontram associadas a reticulocitose, isto é, o aumento de precursores de eritrócitos circulantes (ATSDR, 2007).

Em uma revisão publicada por Pounds e colaboradores (1991), os autores relataram que o Pb pode afetar direto ou indiretamente o funcionamento do tecido ósseo através de diversos mecanismos. Dentre estes, é citado a interferência do metal nos níveis de hormônios circulantes, como o paratormônio (PTH), calcitonina e também a vitamina D, prejudicando assim, a habilidade de osteoclastos e osteoblastos em responder à regulação hormonal. A ocorrência de hipocalcemia em decorrência da exposição crônica ao Pb também foi demonstrada em estudo experimental, uma vez que o metal interfere na síntese de calcitrol, resultando na diminuição da absorção intestinal de Ca^{2+} (SZABO *et al.* 1991). Todos estes efeitos do Pb sobre os ossos são responsáveis por diminuir a mineralização do tecido, o que resulta na diminuição da densidade mineral óssea, e conseqüentemente, no aumento do risco de ocorrência de osteoporose (SUN *et al.* 2008).

Dongre e colaboradores (2013) observaram diminuição dos níveis plasmáticos de cálcio, fósforo e vitamina D enquanto as concentrações de PTH se mostraram aumentadas em estudo conduzido com trabalhadores expostos ao Pb. Nesse estudo, os autores acreditam que a diminuição dos minerais ocorra devido a inibição da enzima α -1 hidrolase, uma enzima importante para a síntese de calcitrol, enquanto que o aumento de PTH se deva à ocorrência da hipercalcemia observada nos trabalhadores, uma vez que o hormônio atua aumentando as concentrações de cálcio no sangue.

Os rins também são órgãos críticos em relação à exposição ao Pb. Embora a ocorrência de disfunção renal tenha sido observada somente em elevados níveis de exposição ($>60 \mu\text{g/dL}$ de Pb-S, por exemplo), concentrações menores ou iguais a 10

µg/dL de Pb-S também tem sido descritas por causarem danos nos órgãos (GRANT, 2008). A nefropatia, uma doença caracterizada por danos nos rins, tem sido associada a exposição ao Pb e pode eventualmente causar a insuficiência renal. Na forma aguda da doença são observados danos nos mecanismos de transporte tubular, bem como alterações morfológicas devido ao aparecimento de alterações degenerativas no epitélio tubular juntamente com a ocorrência de corpos de inclusão nuclear contendo complexos formados pela interação Pb – proteínas. Já na nefropatia crônica, na qual a doença ocorre de maneira muito mais severa, são observados danos funcionais e morfológicos irreversíveis, tais como alterações nos glomérulos e túbulos intersticiais, resultando portando, na ocorrência de falência renal, hipertensão e hiperuricemia (RASTOGI, 2008).

Os efeitos da exposição ao Pb parecem implicar também em consequências graves para o sistema cardiovascular, incluindo isquemia coronariana, doenças cardíacas e comprometimento dos vasos sanguíneos periféricos (NAVAS-ACIEN *et al.* 2007). Diversos estudos experimentais e ocupacionais tem demonstrado também a ocorrência de hipertensão arterial após a exposição ao Pb, a qual é considerada uma consequência dos efeitos tóxicos que acometem os rins (ATSDR, 1999).

Estudos realizados com trabalhadores expostos ao Pb nos EUA demonstraram que os índices de mortalidade por doença cardíaca coronária (STEENLAND *et al.* 1992) e acidente vascular cerebral (MICHAELS *et al.* 1991) eram maiores em trabalhadores com mais tempo de trabalho envolvendo o Pb. Já Dongre e colaboradores (2013) observaram que a pressão arterial de trabalhadores expostos ao Pb era significativamente maior quando comparado com indivíduos controle. Nesse estudo os autores relataram que o aumento da pressão arterial nos indivíduos se dá provavelmente devido a nefrotoxicidade causada pela exposição ao Pb. Mais recentemente, estudos conduzidos por Ozturk e colaboradores (2014) com trabalhadores também expostos ao metal, demonstraram uma correlação significativa entre as concentrações de Pb-S e danos relacionados a elasticidade da artéria aorta, o que os autores acreditam que esteja relacionado à hipertensão, visto que o aumento da pressão nos vasos sanguíneos pode levar alterações estruturais na parede dos mesmos.

O Pb é conhecido também por causar efeitos adversos no sistema reprodutivo tanto em homens quanto em mulheres. Em homens, as principais alterações observadas foram diminuição do libido sexual, redução da motilidade e contagem de

espermatozoides, infertilidade, danos na função da próstata e alterações nos níveis de testosterona. Já em mulheres, os efeitos incluem a ocorrência de aborto espontâneo, pré-eclampsia e partos prematuros, além de apresentarem maior suscetibilidade à infertilidade (FLORA *et al.* 2011).

A intoxicação por Pb pode também acarretar em diversos efeitos adversos para o sistema endócrino. Embora exista algumas controvérsias em relação aos efeitos do Pb sobre o funcionamento da glândula tireóide, estudos conduzidos por Dundar e colaboradores (2006) demonstraram uma correlação negativa entre as concentrações de Pb-S e níveis de tiroxina livre (T4) em adolescentes com baixas concentrações do metal no sangue, assim como em estudo anterior conduzido com trabalhadores expostos ao Pb (ROBINS *et al.* 1989). Em ambos os estudos, os níveis de tri-iodotironina (T3) e do hormônio estimulador da tireóide (TSH) permaneceram iguais, o que se mostra contrário a estudos que demonstraram elevadas concentrações de TSH em indivíduos ocupacionalmente expostos ao Pb (SINGH *et al.* 2000; LÓPEZ *et al.* 2000), além de estudos realizados em animais (CHAURASIA *et al.* 1997, 1998). Apesar da discrepância entre esses resultados, esses estudos demonstraram que o Pb pode afetar o eixo hipotálamo – pituitária – tireóide embora exista uma variação no padrão de tais efeitos.

Por fim, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC), os compostos de Pb inorgânicos são classificados como provavelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2A), com evidências limitadas de carcinogenicidade em estudos com humanos, mas suficiente em estudos experimentais conduzidos com animais (IARC, 2006).

Como pode ser observado, o Pb possui diversos alvos e mecanismos de toxicidade e assim como os processos de absorção e distribuição, a toxicidade do metal pode ser influenciada por diversos fatores, tais como idade, estado nutricional e patológico e características genéticas, dentre outros (SCHNEIDER *et al.* 2012; AHMED *et al.* 2006; GUNDACKER *et al.* 2010).

Na Figura 2 pode ser observada a relação entre as concentrações de Pb presentes no sangue e os efeitos adversos esperados decorrentes da exposição ao metal em adultos e crianças:

Figura 2: Concentrações de Pb-S e efeitos adversos esperados decorrentes da exposição ao metal em adultos e crianças (Modificado de ATSDR, 1992).

1.5. Análise proteômica como ferramenta para o estudo da toxicidade de metais

Diversos estudos envolvendo metais tóxicos têm sido desenvolvidos no intuito de avaliar os efeitos da toxicidade de tais elementos no organismo. Apesar disso, um número muito menor de estudos tem sido direcionados à compreensão dos exatos mecanismos pelos quais esses toxicantes exercem seus efeitos em sistemas biológicos, especialmente envolvendo o Pb. Nesse sentido, a análise do conjunto de proteínas de uma célula, tecido ou fluido biológico – definido como proteoma – tem se tornado cada vez mais uma ferramenta importante para a elucidação dos mecanismos de toxicidade, bem como para a descoberta de biomarcadores que possam refletir de maneira precisa a exposição e os efeitos da exposição aguda ou crônica a determinados toxicantes (LUQUE-GARCIA *et al.* 2011).

O termo proteoma foi introduzido no ano de 1994 por Marc Wilkins (WILKINS *et al.* 1996) e se refere não só a soma dos produtos codificados por sequências

genômicas, mas também à proteínas resultantes de processos pós-traducionais além de complexos formados pela interação entre elas. A principal característica do proteoma é o seu perfil dinâmico, o qual é capaz de se alterar de acordo com estímulos internos ou externos, sejam eles fisiológicos ou patológicos. Dessa forma, o conjunto de proteínas, a quantidade e suas possíveis alterações são capazes de fornecer indícios quanto a organização e à dinâmica de processos metabólicos, regulatórios e de sinalização, bem como a ocorrência de estímulos capazes de alterar a homeostase de um determinado tecido (JENSEN *et al.* 2004).

Nos últimos anos, o estudo do proteoma definido como proteômica, tem respondido diversas questões biológicas tanto na pesquisa básica quanto na clínica, embora para esta última, com algumas limitações (BARBOSA *et al.* 2012). Dentre estes estudos, alguns autores vêm desenvolvendo trabalhos relacionados à exposição a metais, sendo que a maioria deles tem sido realizados no intuito de avaliar alterações no proteoma global, enquanto outros tem focado na elucidação dos mecanismos pelos quais os metais exercem seus efeitos, ou ainda, mecanismos de tolerância desenvolvidos na presença desses toxicantes e seus compostos.

Em relação aos efeitos observados, o principal grupo de proteínas que se encontra desregulado em resposta à toxicidade dos metais nesses estudos os quais foram realizados em diversos organismos, são proteínas do sistema antioxidante endógeno, tais como SOD e CAT, além de enzimas envolvidas na biossíntese de GSH. As proteínas de choque-térmico também conhecidas como HSPs (*heat shock proteins*) também constituem uma classe de proteínas comumente alterada após exposição a metais. Dentre suas funções podem ser citadas a manutenção do enovelamento e agregação proteica, além de desempenhar função importante na estabilidade térmica e outras condições de estresse celular.

Outro grupo de proteínas geralmente alterado são as metalotioneínas, proteínas de baixo peso molecular as quais possuem elevada afinidade de ligação por diversos tipos de metais. Neste caso, acredita-se que esta ligação ocorra por meio da interação dos metais com os grupamentos –SH presentes nos resíduos de cisteína das metalotioneínas. Ainda, também são observadas alterações em proteínas envolvidas no transporte e tráfego celular, metabolismo energético e respiração mitocondrial, dentre outras (LUQUE-GARCIA *et al.* 2011).

1.5.1. Estudos proteômicos envolvendo a exposição ao Pb

A maioria dos estudos envolvendo análise proteômica e metais tóxicos, tem dado maior atenção ao elemento cádmio (Cd) (LUQUE-GARCIA *et al.* 2011). Apesar disso, alguns estudos tanto em animais quanto em humanos foram desenvolvidos com o objetivo de compreender os efeitos da exposição ao Pb e também o potencial proteômico na descoberta de novos biomarcadores de exposição e efeito ao metal.

Estudos realizados em bactérias cultivadas em meio contendo Pb demonstraram uma diminuição da expressão de DNA girase A em relação ao controle (BAR *et al.* 2007). Em eucariotos, estudo conduzido por Witzmann e colaboradores (1999) resultou na identificação de 11 proteínas com expressão alterada após a exposição de células renais de ratos ao Pb. Dentre as proteínas alteradas, estavam proteínas relacionadas a ligantes de Ca^{2+} , HSPs e glutathione-S-transferases (GSTs). Mais recentemente, Neal e colaboradores (2005) demonstraram que o Pb induz a catarata *in vitro* em estudo realizado com ratos tratados com o metal. Dentre as proteínas diferencialmente expressas quando comparado grupo tratado *versus* grupo controle, estava a subunidade A da α -cristalina, uma chaperona com atividade anti-agregatória a qual se acredita ser um importante fator na manutenção da transparência do cristalino com o avanço da idade.

Em humanos, Birdsall e colaboradores (2010) avaliaram os efeitos no plasma e soro de crianças expostas ambientalmente ao mercúrio (Hg) e ao Pb, e encontraram 16 proteínas associadas às baixas concentrações desses metais no sangue das crianças. Das proteínas identificadas, 13 estavam associadas com doenças cardiovasculares e 7 delas apresentavam sua regulação aumentada ou diminuída na presença dos metais. Dentre as proteínas associadas às concentrações de Pb-S, estavam a apoliproteína E (ApoE), apolipoproteína J, o componente C3c do sistema complemento, vitronectina, haptoglobina, fator de coagulação XII e também o componente C9 do sistema complemento. Nesse estudo, a ApoE foi identificada como a única proteína que demonstrou uma diminuição significativa em seus níveis conforme o aumento das concentrações de Pb-S das crianças entre diferentes tertis.

Em populações ocupacionalmente expostas ao Pb, estudos realizados com trabalhadores de uma fundição de metal na China co-expostos ao As e Pb, demonstraram uma regulação aumentada ou diminuída de proteínas entre indivíduos expostos e não expostos aos metais. No entanto, essas proteínas não foram

identificadas (ZHAI *et al.* 2005). Mais recentemente, estudo conduzido por Kossowska e colaboradores (2010) avaliou o potencial proteômico na descoberta de novos biomarcadores em trabalhadores co-expostos ao As, Pb e Cd na Polônia, e encontraram 6 proteínas diferencialmente expressas no soro entre indivíduos expostos e grupo controle. No entanto, nesse estudo os autores também não conseguiram identificar as proteínas consideradas por eles como possíveis biomarcadores para esses metais.

Como pode ser observado, há uma carência de estudos envolvendo a exposição ao Pb e sua influência sobre o proteoma em tecidos e fluidos biológicos como o plasma, o qual constitui uma das fontes mais importantes de biomarcadores, podendo oferecer portanto, ricas informações a respeito de processos fisiológicos e patológicos. Ainda estes estudos são mais escassos em populações expostas a elevadas concentrações de Pb, como trabalhadores de fábricas de baterias automotivas, os quais estão expostos de maneira crônica ao metal.

Neste contexto, considerando a exposição ocupacional ao Pb como um importante fator na geração de agravos à saúde dos trabalhadores, fica clara a necessidade de mais estudos a fim de comprovar mecanismos já propostos ou elucidar novos mecanismos de toxicidade do metal. Assim, a identificação de alterações em proteínas individuais ou em grupos de proteínas pode fornecer informações não só a respeito dos seus mecanismos de toxicidade no organismo, mas também contribuir para a possível identificação de novos biomarcadores de exposição e efeito, fornecendo portanto, a possibilidade de uma maior prevenção de seus efeitos tóxicos e controle nos casos de intoxicação.

2. CONCLUSÕES

Com a realização deste estudo, inicialmente pudemos observar que apesar das normas e regulamentações estabelecidas para segurança e saúde do trabalhador em relação à exposição ao Pb, na fábrica de baterias aqui estudada, existem trabalhadores que apresentam concentrações elevadas de Pb-S, muitas das vezes acima do VR recomendado, o que deve ser considerado um grande problema de saúde pública, visto que diversos estudos demonstram efeitos adversos mesmo em concentrações consideradas seguras de acordo com tais legislações.

Além disso, o presente trabalho também foi capaz de confirmar a hipótese do estudo ao demonstrar que a exposição ao Pb causa alterações no proteoma plasmático. Assim, a identificação de tais proteína alteradas, permitiu ainda a confirmação de alvos e mecanismos de toxicidade do Pb já conhecidos, bem como possibilitou a descoberta de novos alvos e mecanismos de ação tóxica, os quais, foram pela primeira vez elucidados a partir da realização deste estudo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMED, M. & SIDDIQUI, M.K.J. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. **Clinica Chimica Acta, International Journal of Clinical Chemistry**, 383(1:2): 57–64, 2007.

AHAMED, M.; SIDDIQUI, M.K. Environmental lead toxicity and nutritional factors. **Clinical Nutrition**, 26(4): 400–408, 2007.

AHAMED, M.; VERMA, S.; KUMAR, A.; SIDDIQUI, M.K. Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. **The Science of the Total Environment**, 346(1-3): 48–55, 2005.

APOSTOLOVA, M.D.; CHRISTOVA, T.; TEMPLETON, D.M. Involvement of gelsolin in cadmium-induced disruption of the mesangial cell cytoskeleton. **Toxicological Sciences, an Official Journal of the Society of Toxicology**, 89(2): 465–74, 2006.

ARAÚJO, U.C.; PIVETTA, F.R.; MOREIRA, J.C. Occupational lead exposure assessment: a proposal for a strategy to monitor prevention of clinical and subclinical effects. **Caderno de Saúde Pública**, 15(1): 123–131, 1999.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Lead. 2007. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>. Acesso em: fevereiro 2015.

BAR, C.; PATIL, R.; DOSHI, J.; KULKARNI, M.J.; GADE, W.N. Characterization of the proteins of bacterial strain isolated from contaminated site involved in heavy metal resistance - a proteomic approach. **Journal of Biotechnology**, 128(3): 444–451, 2007.

BARBOSA, E.B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G.M.; HENRIQUE, T.; DE MARQUI, A.B.T.; TAJARA, E.H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 58(3), 2012.

BARRIOS-LLERENA, M.E.; CHONG, P.K.; GAN, C.S.; SNIJDERS, A.P.; REARDON, K.F.; WRIGHT, P.C. Shotgun proteomics of cyanobacteria--applications of experimental and data-mining techniques. **Briefings in Functional Genomics & Proteomics**, 5(2): 121–132, 2006.

BATISTA, B.L.; RODRIGUES, J.L.; NUNES, J.A.; SOUZA, V.C.; BARBOSA, F. JR. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. **Analytical Chimica Acta**, 639(1-2):13–18, 2009

BELLINGER, D.C. Lead. **Pediatrics**, 113(4 Suppl): 1016–1022, 2004.

BERGDAHL, A.; GRUBB, A.; SCHUTZ A, DESNICK, R.J.; WETMUR, J.G.; SASSA, S.; SKERFVING, S. Lead binding to δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. **Pharmacology and Toxicology**, 81(4): 153–158, 1997.

BERGDAHL, I.A., SHEVELEVA, M., SCHUTZ, A., ARTAMONOVA, V.G., SKERFVING, S. Plasma and blood lead in humans: capacity-limited binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components. **Toxicological Sciences, an Official Journal of the Society of Toxicology** 46(2): 247–253, 1998.

BIRDSALL, R.E.; KILEY, M.P.; SEGU, Z.M.; PALMER, C.D.; MADERA, M.; GUMP, B.B.; MACKENZIE, J.A.; PARSONS, P.J.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M.V.; BENDINSKAS, K.G. Effects of lead and mercury on the blood proteome of children. **Journal of Proteome Research**, 9(9): 4443–4453, 2010.

BNDES. Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social. Baterias automotivas: panorama da indústria no Brasil, as novas tecnologias e como os veículos elétricos podem transformar o mercado global. 2013. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/1511/1/A%20mar37_11_Baterias%20automotivas-panorama%20da%20ind%C3%BAstria%20no.pdf>. Acesso em julho 2016.

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

BRENT, J.A. Review of: “Medical Toxicology”. **Clinical Toxicology**, 44: 355, 2006.

BRESSLER, J.; KIM, K.A.; CHAKRABORTI, T.; GOLDSTEIN, G. Molecular mechanism of lead neurotoxicity. **Neurochemical Research**, 24(4): 595–600, 1999.

BUCHWEITZ, J.; MCCLURE-BRINTON, K.; ZYSKOWSKI, J.; STENSEN, L.; LEHNER, A. Lead isotope profiling in dairy calves. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 71(2): 174–177, 2015.

BURTNICK, L.D.; ROBINSON, R.C.; CHOE, S. Structure and function of gelsolin. **Results and Problems in Cell Differentiation**. 32: 201–211, 2001.

CALDEIRA, C.; MATTOS, R.D.; MEYER, A.; MOREIRA, J.C. Limits in the applicability of urine delta aminolevulinic acid determination as a screening test in the evaluation of occupational lead poisoning. **Caderno de Saúde Pública**, 16(1): 225–230, 2000.

CASTELLINO, F.J.; PLOPLIS, V.A. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. **Thrombosis and Haemostasis**, 93(4): 647–654, 2005.

CDC. Centre for Disease Control and Prevention. Preventing lead poisoning in young children. 2005. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nceh/lead/publications/PrevLeadPoisoning.pdf>>. Acesso em: maio de 2015.

CHAN. L. In: Structure-Function Relationships of Apolipoprotein B-100. Drugs Affecting Lipid Metabolism. 1993. Medical Science Symposia Series, 2: 45-47.

CHANEY R.L.; RYAN J.A. In: Risk based standards for arsenic lead and cadmium in urban soils. 1994. Dechema, Frankfurt, Germany.

CHAURASIA, S.S.; KAR, A. Influence of lead on type-I iodothyronine 5' monodeiodinase activity in male mouse. **Hormone and Metabolic Research**, 29(10): 532–533, 1997.

CHAURASIA, S.S.; KAR, A. Lead induced oxidative damage to the membrane associated type-I iodothyronine-monodeiodinase activity in chicken liver homogenate. **Fresenius Environmental Bulletin**, 7:(3), 209–215, 1998.

CHOE, H.; BURTNICK, L.D.; MEJILLANO, M.; YIN, H.L.; ROBINSON, R.C.; CHOE, S. The calcium activation of gelsolin: insights from the 3A structure of the G4-G6/actin complex. **Journal of Molecular Biology**, 324(4): 691–702, 2002.

CHOI, H.; FERMIN, D.; NESVIZHSHKII, A.I. Significance analysis of spectral count data in label-free shotgun proteomics. **Molecular & Cell Proteomics**, 7(12): 2373–2385, 2008.

COON, S.; STARK, A.; PETERSON, E.; GLOI, A.; KORTSHA, G.; POUNDS, J.; CHETTLE, D.; GORELL, J. Whole-body lifetime occupational lead exposure and

risk of Parkinson's disease. **Environmental and Health Perspectives**, 114(12):1872–1876, 2006.

CORDEIRO, R.; LIMA-FILHO, E. C. The Inadequacy of Threshold Values for Preventing Lead Poisoning in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, 11 (2): 177–186, 1995.

DA CUNHA MARTINS, A. JR.; BARCELOS, G.R.M.; FERREIRA, A.L.J.; DE SOUZA, M.F.; CÓLUS, I.M.S.; ANTUNES, L.M.; PAOLIELLO, M.M.B.; ADEYEMI, J.A.; BARBOSA JR, F. Effects of Lead Exposure and Genetic Polymorphisms on ALAD and GPx Activities in Brazilian Battery Workers. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, 78(16):1073–1081, 2015.

DAMIANI, D.; LAUDANNA, N.; BARRIL, C.; SANCHES, R.; BORELLI, N. S.; DAMIANI, D. Encephalopathies: etiology, pathophysiology, and clinical management of some major forms of disease presentation. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, 11(1):67–74, 2013.

DE CAPITANI E.M.; MADUREIRA, P.R.; MOREIRA FILHO, D.C.; VIEIRA, R.J.; SALGADO, P.E.T.; PECCININ, R.G.; MORISHITA, R. Comparative study of chelation therapy for lead poisoned patients using RDTACaNa₂ by two administration routes. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho** 2(3): 185–190, 2004.

DE CAPITANI, E.M.; PAOLIELLO, M.M.B.; ALMEIDA, G.R.C. Fontes de exposição humana a chumbo no Brasil. **Medicina**, 42(3): 311–318, 2009.

DEMARCHI, A.C.C.O.; SOUZA, L.C.D.; SANTOS, L.S.; MENEZES, M.L. Evaluation of lead exposure in workers at industry in Bauru. **Salusvita** 18: 27–36, 1999.

DITTRICH, J.; BECKER, S.; HECHT, M.; CEGLAREK U. Sample preparation strategies for targeted proteomics via proteotypic peptides in human blood using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Proteomics Clinical Applications**, 9(1-2): 5–16, 2015.

DNPM. Departamento Nacional de Produção Mineral. Sumário Mineral 2014. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/dnpm/sumarios/sumario-mineral-2015>. Acesso em: agosto de 2016.

DONGRE, N.N.; SURYAKAR, A.N.; PATIL, A.J.; HUNDEKARI, I.A.; DEVARNAVADAGI, B.B. Biochemical effects of lead exposure on battery manufacture workers with reference to blood pressure, calcium metabolism and bone mineral density. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 28(1): 65–70, 2013.

DORSEY, C.D.; LEE, B.K.; BOLLA, K.I.; WEAVER, V.M.; LEE, S.S.; LEE, G.S.; TODD, A.C.; SHI, W.; SCHWARTZ, B.S. Comparison of patella lead with blood lead and tibia lead and their associations with neurobehavioral test scores. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, 48(5): 489–496, 2006.

DOUMOUCTSIS, K.K.; DOUMOUCTSIS, S.K.; DOUMOUCTSIS, E.K.; PERREA, D.N. The effect of lead intoxication on endocrine functions. **Journal of Endocrinological Investigation**, 32(2): 175–183, 2009.

DOWEIKO, JP.; NOMPLEGGI, D.J. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. **JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. 15(2): 207–211, 1991.

DUNDAR B.; OKTEM, F.; ARSLAN, M.K.; DELIBAS, N.; BAYKAL, B.; ARSLAN, C.; GULTEPE, M.; ILHAN, I.E. The effect of long-term lowdose lead exposure on thyroid function in adolescents. **Environmental Research**, 101(1): 140–145, 2006.

FAGERBERG, B.; BORNÉ, Y.; BARREGARD, L.; SALLSTEN, G.; FORSGARD, N.; HEDBLAD, B.; PERSSON, M.; ENGSTRÖM, G.; Cadmium exposure is associated with soluble urokinase plasminogen activator receptor, a circulating marker of inflammation and future cardiovascular disease. **Environmental Research**, 52:185–191, 2017.

FANG, F.; KWEE, L.C.; ALLEN, K.D.; UMBACH, D.M.; YE, W.; WATSON, M.; KELLER, J.; ODDONE, E.Z.; SANDLER, D.P.; SCHMIDT, S.; KAMEL, F. Association between blood lead and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. **American Journal of Epidemiology**, 171(10):1126–1133, 2010.

FLORA, G.; GUPTA, D.; TIWARI, A. Toxicity of lead: A review with recent updates. **Interdisciplinary Toxicology**, 5(2): 47–58, 2012.

FLORA, S.J.S.; PACHAURI, V.; SAXENA, G. Arsenic, cadmium and lead. **Reproductive and Developmental Toxicology**, 415–438, 2011.

FU, Q.; BOVENKAMP, D.E.; VAN EYK, J.E. A rapid, economical, and reproducible method for human serum delipidation and albumin and IgG removal for proteomic analysis. **Methods in Molecular Biology**, 357: 365–371, 2007.

GARZA, A.; VEGA, R.; SOTO, E. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, 12(3): RA57–65, 2006.

GHANWAT, G.H.; PATIL, A.J.; PATIL, J.A.; KSHIRSAGAR, M.S.; SONTAKKE, A.; AYACHIT R.K. Biochemical effects of lead exposure on oxidative stress and antioxidant status of battery manufacturing workers of Western Maharashtra, India. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, 27(2): 141–146, 2016.

GOERING, P.L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, 14(2-3): 45–60, 1993.

GONICK, H.C. Lead-binding proteins: a review. **Journal of Toxicology**, 2011.

GORELL, J.M.; JOHNSON, C.C.; RYBICKI, B.A.; PETERSON, E.L.; KORTSHA, G.X.; BROWN, G.G.; RICHARDSON, R.J. Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease. **Neurology**, 48(3): 650–658, 1997.

GOTTESFELD, P.; POKHREL, A.K. Review: Lead exposure in battery manufacturing and recycling in developing countries and among children in nearby communities. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, 8(9): 520–532, 2011.

GOYER, R.A. Toxic effects of metals – Lead. *In* : MARY, O.; AMDUR, J.D.; KLAASSEN, C.D. (eds.). Casareh and Doull's toxicology – The Basic Science of Poisons. EUA: Pergamon Press, 1991. pp. 639–646.

GRANT, L.D. Environmental Toxicants. John Wiley & Sons, In: 2008. Lead and compounds; pp. 757–809.

GU, H.; ROBISON, G.; HONG, L.; BARREA, R.; WEI, X.; FARLOW, M.R.; PUSHKAR, Y.N.; DU, Y.; ZHENG, W. Increased β -amyloid deposition in Tg-SWDI transgenic mouse brain following in vivo lead exposure. **Toxicology Letters**, 213(2):211–219, 2012.

GU, H.; WEI, X.; MONNOT, A.D.; FONTANILLA, C.V.; BEHL, M.; FARLOW, M.R.; ZHENG, W.; DU, Y. Lead exposure increases levels of β -amyloid in the brain and CSF and inhibits LRP1 expression in APP transgenic mice. **Neuroscience Letters**, 490(1):16–20, 2011.

GUNDACKER, C.; GENCIK, M.; HENGSTSCHLÄGER, M. The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: mercury and lead. **Mutation Research**, 705(2):130–140, 2010.

GUPTA, D.K.; HUANG, H.G.; YANG, X.E.; RAZAFINDRABE, B.H.; INOUE, M. The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatins but the glutathione. **Journal of Hazardous Materials**, 177(1-3): 437–444, 2010.

HELLMAN, N.E.; GITLIN, J.D. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual Review of Nutrition*, 22:439-458, 2002.

HOLTZMAN, D.; DEVRIES, C.; NGUYEN, H.; OLSON, J.; BENSCH, K. Maturation of resistance to lead encephalopathy: cellular and subcellular mechanisms. **Neurotoxicology**, 5(3): 97–124, 1984.

IARC MONOGRAPHS. Vol. 87, Suppl. 7: Lead and Lead Compounds. Lead and Inorganic Lead Compounds (Group 2B). Organic Lead Compounds (Group 3). 2006. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol87/mono87.pdf>. Acesso em: outubro de 2016.

INSTITUTO DE PATOLOGIA CLÍNICA HERMES PARDINI. Manual de Exames. 2002. Disponível em: <http://www.hermespardini.com.br/pardini/imagens/2002.pdf>. Acesso em: novembro de 2016.

ISHIHAMA Y¹, ODA Y, TABATA T, SATO T, NAGASU T, RAPPSILBER J, MANN M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. **Molecular & Cell Proteomics**. 4(9): 1265–1272, 2005.

IZMIRLIAN, G. Application of the random forest classification algorithm to a SELDI-TOF proteomics study in the setting of a cancer prevention trial. **Annals of New York Academic Sciences**, 1020: 154–174, 2004.

JENSEN, O.N. Modification-specific proteomics: characterization of posttranslational modifications by mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, 8(1): 33–41, 2004.

KAMEL, F.; UMBACH, D.M.; STALLONE, L.; RICHARDS, M.; HU, H.; SANDLER, D.P. Association of lead exposure with survival in amyotrophic lateral sclerosis. **Environmental Health Perspectives**, 116(7): 943–937, 2008.

KARPIEVITCH, Y.V.; POLPITIYA, A.D.; ANDERSON, G.A.; SMITH, R.D.; DABNEY, A.R. Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects. **The Annals of Applied Statistics**, 4(4): 1797–1823, 2010.

KHAITLINA, S.; WALLOSCHECK, M.; HINSEN, H. Calcium-induced conformational changes in the C-terminal half of gelsolin stabilize its interaction with the actin monomer. **Biochemistry**, 43(40): 12838–12845, 2004.

KIRBERGER, M.; YANG, J.J. Structural differences between Pb²⁺- and Ca²⁺-binding sites in proteins: implications with respect to toxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 102(10): 1901–1909, 2008.

KÖNINGER, A.; EDIMIRIS, P.; KOCH, L.; ENKWE, A.; LAMINA, C.; KASIMIR-BAUER, S.; KIMMIG, R.; DIEPLINGER, H. Serum concentrations of afamin are elevated in patients with polycystic ovary syndrome. **Endocrine Connectors**, 3(3): 120–126, 2014.

KOSSOWSKA, B.; DUDKA, I.; BUGLA-PŁOSKOŃSKA, G.; SZYMAŃSKA-CHABOWSKA, A.; DOROSZKIEWICZ, W.; GANCARZ, R.; ANDRZEJAK, R.; ANTONOWICZ-JUCHNIEWICZ, J. Proteomic analysis of serum of workers occupationally exposed to arsenic, cadmium, and lead for biomarker research: a preliminary study. **The Science of the Total Environment**, 408(22): 5317–5324, 2010.

KUHN, W.; WINKEL, R.; WOITALLA, D.; MEVES, S.; PRZUNTEK, H.; MÜLLER, T. High prevalence of parkinsonism after occupational exposure to lead-sulfate batteries. **Neurology**, 50(6):1885–1886, 1998.

LAW, R.H.; ABU-SSAYDEH, D.; WHISSTOCK, J.C. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. **Current Opinion in Structural Biology**, 23(6): 836–841, 2013.

LAW, R.H.; SOFIAN, T.; KAN, W.T.; HORVATH, A.J.; HITCHEN, C.R.; LANGENDORF, C.G.; BUCKLE, A.M.; WHISSTOCK, J.C.; COUGHLIN, P.B. X-ray crystal structure of the fibrinolysis inhibitor alpha2-antiplasmin. **Blood**, 111(4): 2049–2052, 2008.

LAYER, G.; REICHELT, J.; JAHN, D.; HEINZ, D.W. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. **Protein Science: a Publication of Protein Society**, 19(6): 1137–1161, 2010.

LEE, J.; FREEMAN, J.L. Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: a mini-review. **Neurotoxicology**, 43: 57–64, 2014.

LEELAKUNAKORN, W.; SRIWORAWIT, R.; SOONTAROS, S. Ceruloplasmin oxidase activity as a biomarker of lead exposure. **Journal of Occupational Health**, 47(1): 56–60, 2005.

LICHENSTEIN, H.S.; LYONS, D.E.; WURFEL, M.M.; JOHNSON, D.A.; MCGINLEY, M.D.; LEIDLI, J.C.; TROLLINGER, D.B.; MAYER, J.P.; WRIGHT, S.D.; ZUKOWSKI, M.M. Afamin is a new member of the albumin, α -fetoprotein, and vitamin D-binding protein gene family. **Journal of Biological Chemistry**, 269(27): 18149–18154, 1994.

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

LINKE, T.; DORAISWAMY, S.; HARRISON, E.H. Rat plasma proteomics: effects of abundant protein depletion on proteomic analysis **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 849(1-2): 273–281, 2007.

LIU, H.; SADYGOV, R.G.; YATES, J.R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. **Analytical Chemistry**, 76(14): 4193–4201, 2004.

LIU, Y.; TEMPLETON, D.M. Involvement of CaMK-II δ and gelsolin in Cd(2+) - dependent cytoskeletal effects in mesangial cells. **Journal of Cellular Physiology**, 228(1): 78–86, 2013.

LÓPEZ, C.M.; PIÑEIRO, A.E.; NÚÑEZ, N.; AVAGNINA, A.M.; VILLAAMIL, E.C.; ROSES, O.E. Thyroid hormone changes in males exposed to lead in the Buenos Aires area (Argentina). **Pharmacological Research**, 42(6): 599–602, 2000.

LUQUE-GARCIA, J.L.; CABEZAS-SANCHEZ, P.; CAMARA, C. Proteomics as a tool for examining the toxicity of heavy metals. **Trends in Analytical Chemistry**, 30(5): 703–716, 2011.

MAEDA, K.; ARAKAWA, N.; FUKUI, K.; KURAMOCHI, H. Fast charging of lead-acid batteries enabled by high-pressure crystallization. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 14;16(10): 4911–4916, 2014.

MAKINO S, TSURUTA H, TAKATA T. Relationship between blood lead level and urinary ALA level in workers exposed to very low levels of lead. **Industrial Health**, 38 (1): 95–98, 2000.

MARAMBAUD, P.; DRESES-WERRINGLOER; V. Calcium signaling in neurodegeneration. **Molecular Neurodegeneration**, 4(20): 2009.

MARCANTONIO, M.; TROST, M.; COURCELLES, M.; DESJARDINS, M.; THIBAUT, P. Combined enzymatic and data mining approaches for comprehensive phosphoproteome analyses: application to cell signaling events of interferon-gamma-stimulated macrophages. **Molecular & Cellular Proteomics**, 7(4): 64560, 2008.

MARKOWITZ M. Lead poisoning. **Pediatrics in Review**, 21(10):327–335, 2000.

MARTIN, C.J.; WERNTZ C.L.; DUCATMAN, A.M. The interpretation of zinc protoporphyrin changes in lead intoxication: a case report and review of the literature. **Occupational Medicine (Oxford, London)**, 54(8): 587–591, 2004.

MELMER, A.; FINEDER, L.; LAMINA, C.; KOLLERITS, B.; DIEPLINGER, B.; BRAICU, I.; SEHOULI, J.; CADRON, I.; VERGOTE, I.; MAHNER, S.; ZEIMET, A.G.; CASTILLO-TONG, D.C.; EBENBICHLER, C.F.; ZEILLINGER, R.; DIEPLINGER, H. Plasma concentrations of the vitamin E-binding protein afamin are associated with overall and

progression-free survival and platinum sensitivity in serous ovarian cancer--a study by the OVCAD consortium. **Gynecologic Oncology**, 128(1): 38–43, 2013.

MELO MATTOS, S.V.; NICÁCIO, M.A.; PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S. Evaluation of exposure to lead inorganic compounds in workers of metropolitan Belo Horizonte — 1998 to 1993. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, 2: 7–16, 1994.

MENDES, R., 1980. Medicina do Trabalho – Doenças Profissionais. São Paulo, Sarvier.

MENEGOTTO R.M.; PAOLIELLO, M.M.B. Occupational lead exposure and effects on hematological variables. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 14: 31–34, 2001.

MICHAELS, D.; ZOLOTH, S.R.; STERN, F.B. Does low-level lead exposure increase risk of death? A mortality study of newspaper printers. **International Journal of Epidemiology**, 20(4): 978–983, 1991.

Ministério do Trabalho e Emprego, Portaria nº 3.214 de 08 de junho de 1978. Norma Reguladora 15 (NR-15): Atividades e Operações Insalubres.

Ministério do Trabalho e Emprego, Portaria nº 3.214 de 08 de junho de 1978. Norma Reguladora 7 (NR-7): Programa de Controle Médico em Saúde Ocupacional. Modificada pela Portaria SSST n.º 24, de 29 de dezembro de 1994.

MINOZZO, R.; MINOZZO, E.L.; DEIMLING, L.I.; SANTOS-MELLO, R. Blood lead levels in the battery recycling industry of the metropolitan region of Porto Alegre, RS. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 44 (6), 2008.

MOREIRA, F.R. & MOREIRA, J.C.A. Cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, 1; 167–181, 2004.

MORITZ, R.L.; CLIPPINGDALE, A.B.; KAPP, E.A.; EDDER, J.S.; JI, H.; GILBERT, S.; CONNOLLY, L.M.; SIMPSON, R.J. Application of 2-D free-flow electrophoresis/RP-HPLC for proteomic analysis of human plasma depleted of multi-high abundance proteins. **Proteomics**, 5(13): 3402–3413, 2005.

MORITZ, R.L.; JI, H.; SCHÜTZ, F.; CONNOLLY, L.M.; KAPP, E.A.; SPEED, T.P.; SIMPSON, R.J. A proteome strategy for fractionating proteins and peptides using continuous free-flow electrophoresis coupled to rapid reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, 76(16): 811–824, 2004.

NAVAS-ACIEN, A.; GUALLAR, E.; SILBERGELD, E.K.; ROTHENBERG, S.J. Lead exposure and cardiovascular disease--a systematic review. **Environmental Health Perspectives**, 115(3): 472–82, 2007.

NEAL, R.; AYKIN-BURNS, N.; ERCAL, N.; ZIGLER, J.S.JR. Pb²⁺ exposure alters the lens alpha A-Crystallin protein profile in vivo and induces cataract formation in lens organ culture. **Toxicology**, 212 (1): 1–9, 2005

O'FLAHERTY EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. IV. Kinetics of lead disposition in humans. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 118(1): 16–29, 1993.

O'FLAHERTY, E. J. Physiologically Based Models of Metal Kinetics. **Critical Reviews in Toxicology**, 28(3): 271–317, 1998.

OZTURK, M.T.; YAVUZ, B.; OZKAN, S.; AYTURK, M.; AKKAN, T.; OZKAN, E.; TUTKUN, E.; YILMAZ, Ö.H. Lead exposure is related to impairment of aortic elasticity parameters. **Journal of Clinical Hypertension** (Greenwich, Conn.), 16(11): 790–793, 2014.

PAOLIELLO, M.M.B.; DE CAPITANI E.M. Chumbo. In: Metais: gerenciamento da toxicidade. São Paulo, Atheneu: 353–398, 2003.

PATRICK, L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. **Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic**, 11(1): 2–22, 2006.

PEMMER, B.; ROSCHGER, A.; WASTL, A.; HOFSTAETTER, J.G.; WOBRAUSCHEK P.; SIMON, R.; THALER, H.W.; ROSCHGER, P.; KLAUSHOFER, K.; STRELI, C. Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue. **Bone**, 57(1): 184–193, 2013.

PITT, J.J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. **The Clinical Biochemist Reviews**, 30(1): 19–34, 2009.

POUNDS, J.G.; LONG, G.J.; ROSEN, J.F. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. **Environmental Health Perspectives**, 91: 17–32, 1991.

QUINTANAR-ESCORZA, M.A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M.T.; NAVARRO, L.; MALDONADO, M.; ARÉVALO, B.; CALDERÓN-SALINAS, J.V. Intracellular free calcium concentration and calcium transport in human erythrocytes of lead-exposed workers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 220(1): 1–8, 2007.

RABINOWITZ, M.B. Toxicokinetics of bone lead. **Environmental Health Perspectives**, 91: 33–37, 1991.

RASTOGI SK. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. **Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine**, 12(3): 103–106, 2008.

ROBINS J.M.; CULLEN, M.R.; CONNORS, B.B.; KAYNE, R.D. Depressed thyroid indexes associated with occupational exposure to inorganic lead. **Archives of Internal Medicine**, 143(2): 220–224, 1983.

ROSA, H.V.D.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; COLACIOPPO, S. In: Toxicologia Ocupacional: Monitoramento Ambiental e Biológico. OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: ATHENEU, 2008. Parte 3, p. 244.

ROUSTAN, C.; FERJANI, I.; MACIVER, S.K.; FATTOUM, A.; REBIÈRE, B.; BENYAMIN, Y. Calcium-induced conformational changes in the amino-terminal half of gelsolin. **FEBS Letters**, 581(4): 681–686, 2007.

SARYAN, L.A.; ZENZ, C. Lead and its compounds. In: ZENZ, C.; DICKERSON, O.B.; & HORVATH, E.P. Occupational Medicine. EUA: Mosby-Year Book, 1994. p. 506–541.

SCHWARTZ, B.S.; LEE, B.K.; BANDEEN-ROCHE, K.; STEWART, W.; BOLLA, K.; LINKS, J.; WEAVER, V.; TODD, A. Occupational lead exposure and longitudinal decline in neurobehavioral test scores. **Epidemiology**, 16(1): 106–113, 2005

SEEBER, B.; MORANDELL, E.; LUNGER, F.; WILDT, L.; DIEPLINGER, H. Afamin serum concentrations are associated with insulin resistance and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 12: 88, 2014.

SEGREST J.P.; GARBER, D.W.; BROUILLETTE, C.G.; HARVEY, S.C.; ANANTHARAMAIAH, G.M. The amphipathic alpha helix: a multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins. **Advances in Protein Chemistry**, 45: 303–369, 1994.

SINGH, B.; CHANDRAN, V.; BANDHU, H.K.; MITTAL, B.R.; BHATTACHARYA, A.; JINDAL, S.K.; VARMA, S. Impact of lead exposure on pituitary-thyroid axis in humans.

Biometals: an International Journal on Role of the Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine, 13(2): 187–192, 2003.

SMOKOVITIS, A.; KOKOLIS, N.; ALEXAKI, E.; TSAFARIS, F. Transplacental effect of lead compounds on tissue plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibition and plasmin inhibition. **Biology of the Neonate**, 58(1): 41–49, 1990.

STEWART, W.F.; SCHWARTZ, B.S.; SIMON, D.; KELSEY, K.; TODD, A.C. ApoE genotype, past adult lead exposure, and neurobehavioral function. **Environmental Health Perspectives**, 110(5): 501–505, 2002.

SUN, Y.; SUN, D.; ZHOU, Z.; ZHU, G.; ZHANG, H.; CHANG, X.; LEI, L.; JIN, T. Osteoporosis in a Chinese population due to occupational exposure to lead. **American Journal of Industrial Medicine**, 51(6): 436–442, 2008.

SZABO, A.; MERKE, J.; HUGEL, U.; MALL, G.; STOEPLER, M.; RITZ, E. Hyperparathyroidism and abnormal 1,25(OH)₂vitamin D₃ metabolism in experimental lead intoxication. **European Journal of Clinical Investigation**, 21(5): 512–520, 1991.

TAN, P.N.; STEINBACH, M.; KUMAR, V. Introduction to Data Mining, (First Edition). Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc., Boston, MA, USA, 2005.

TRIPET, B.; RENUKA JAYADEV, M.; BLOW, D.; NGUYEN, C.; HODGES, R.; CIOS, K. Proteomic data mining using predicted peptide chromatographic retention times. **International Journal of Bioinformatics Research and Applications**, 3(4): 431–445, 2007.

TRUDGIAN, D.C.; RIDLOVA, G.; FISCHER, R.; MACKEEN, M.M.; TERNETTE, N.; ACUTO, O.; KESSLER, B.M.; THOMAS, B. Comparative evaluation of label-free SING normalized spectral index quantitation in the central proteomics facilities pipeline. **Proteomics**, 11(14): 2790–2797, 2011.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. **Frontiers in Immunology**, 5: 520, 2014.

VOEGELE, A.F.1.; JERKOVIĆ, L.; WELLENZOHN, B.; ELLER, P.; KRONENBERG, F.; LIEDL, K.R.; DIEPLINGER, H. Characterization of the vitamin E-binding properties of human plasma afamin. **Biochemistry**, 41(49):14532–14538, 2002.

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

WITZMANN, F.; FULTZ, C.D.; GRANT, R.A.; WRIGHT, L.S.; KORNGUTH, S.E.; SIEGEL, F.L. Regional protein alterations in rat kidneys induced by lead exposure. **Electrophoresis**, 20 (4-5): 943–951, 1999.

YEN, C.Y.; RUSSELL, S.; MENDOZA, A.M.; MEYER-ARENDT, K.; SUN, S.; CIOS, K.J.; AHN, N.G.; RESING, K.A. Improving sensitivity in shotgun proteomics using a peptide-centric database with reduced complexity: protease cleavage and SCX elution rules from data mining of MS/MS spectra. **Analytical Chemistry**, 78(4): 1071–1084, 2006.

YOCUM, A.K.; YU, K.; OE, T.; BLAIR, I.A. Effect of immunoaffinity depletion of human serum during proteomic investigations. **Journal of Proteome Research**, 4(5): 1722 – 31, 2005.

ZHAI, R.; SU, S.; LU, X.; LIAO, R.; GE, X.; HE, M.; HUANG, Y.; MAI, S.; LU, X.; CHRISTIANI, D. Proteomic profiling in the sera of workers occupationally exposed to arsenic and lead: identification of potential biomarkers. **Biometals, an International**

Journal on Role of the Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine, 18(6): 603–613, 2005.