

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

MARCELO FREITAS MONTENEGRO

**Influência do polimorfismo G177C da
enzima ácido δ -aminolevulínico
desidratase nos níveis plasmáticos de
chumbo de indivíduos expostos
ambientalmente**

Ribeirão Preto – SP

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARCELO FREITAS MONTENEGRO

**Influência do polimorfismo G177C da
enzima ácido δ -aminolevulínico
desidratase nos níveis plasmáticos de
chumbo de indivíduos expostos
ambientalmente**

Dissertação apresentada a Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Ribeirão Preto – SP

2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Montenegro, Marcelo Freitas

Influência do polimorfismo G177C da enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase nos níveis plasmáticos de chumbo de indivíduos expostos ambientalmente / Marcelo Freitas Montenegro; orientador: José Eduardo Tanus dos Santos.

-Ribeirão Preto, 2006.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacogenética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Palavras-Chave: ALAD, ácido δ -aminolevulínico desidratase, polimorfismo, toxicologia do chumbo, chumbo no plasma, chumbo no sangue, fração chumbo plasma/sangue total.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcelo Freitas Montenegro

Influência do polimorfismo G177C da enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase nos níveis plasmáticos de chumbo de indivíduos expostos ambientalmente

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

A minha mãe Maria de Lourdes, especialmente, por tudo.

A minha esposa e amiga Mary

Aos amigos André, Daniel, Henrique e Johnny que me incentivam
avidamente, como irmãos.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

À funcionária Fátima Helena Ferreira Petean, o início de tudo;

Ao meu orientador Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, não somente pela oportunidade e pelos ensinamentos acadêmicos, mas pelos ensinamentos pessoais, tão essenciais à formação e indisponíveis em qualquer literatura;

Ao meu amigo e co-orientador Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior, pela amizade sincera e orientações diversas;

Aos amigos de laboratório, pela amizade e paciência, em especial ao amigo Carlos, pelas longas discussões sobre ciência.

Aos funcionários Sonia Maria Stefanelli e José Waldik Ramon pelo excelente auxílio técnico, além da amizade e cooperação.

A todos os colegas de departamento, funcionários ou alunos, pela amizade e companheirismo, em especial ao amigo Fernando Spiller.

Obrigado.

Vaidade das vaidades, diz o Eclesiastes, vaidade das vaidades, tudo é vaidade. Que proveito tira o homem de todo o trabalho com que se afadiga debaixo do sol? Uma geração passa, e outra vem. O sol se levanta, o sol se põe; apressa-se a voltar ao seu lugar; em seguida se levanta de novo. O vento vai em direção ao sul, vai em direção ao norte, volteia e gira nos mesmos circuitos. Todos os rios se dirigem para o mar, e o mar não se enche; os rios continuam a correr em direção ao mar e não se cansam; Todas as coisas se afadigam mais do que se pode dizer. A vista não se farta de ver, o ouvido nunca se sacia de ouvir.

Eu apliquei meu espírito a um estudo atencioso e à sábia observação de tudo o que há debaixo dos céus: Foi posto ao homem esta obrigação ingrata. Vi tudo o que se faz debaixo do sol e percebi: tudo era vaidade e correr atrás do vento; Eu disse comigo mesmo: “Eis que amontoei e acumulei mais sabedoria do que todos antes de mim”; porque meu espírito estudou muito a sabedoria e a ciência e apliquei o meu espírito ao discernimento da sabedoria, da loucura e da tolice, mas cheguei a conclusão que isso também era vaidade e correr atrás do vento; Que prazer tem o homem ao ver seu trabalho debaixo do sol, além de olhá-lo e contemplá-lo? Apenas este é o seu proveito. Passei então a pensar na sabedoria na loucura e na tolice. Conclui que a sabedoria leva vantagem sobre a loucura, como a luz leva vantagem sobre as trevas. Mas notei que o mesmo destino espera ambos, sábio e louco; e notei que a minha sorte será a mesma dos demais. Então para que serve a minha sabedoria? Percebi então que tudo isso também era vaidade e correr atrás do vento.

RESUMO

Resumo

A enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD) possui um importante papel na toxicidade do chumbo. Neste estudo foi verificada a influência do polimorfismo G177C do gene ALAD nos níveis de Pb-P (chumbo no plasma) e na fração %Pb-P/Pb-S (chumbo no sangue) em 142 voluntários expostos ambientalmente ao chumbo (55 homens e 87 mulheres; idade: 18 a 60 anos). Os genótipos para o polimorfismo G177C da ALAD foram determinados por PCR seguido por digestão com enzima de restrição (FRLP). Pb-P e Pb-S foram determinados por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, respectivamente. Nós combinamos ambos genótipos ALAD 1-2 e ALAD 2-2 (grupo ALAD 1-2/2-2) e comparamos com grupo de genótipo ALAD 1-1. Enquanto nenhuma diferença significativa foi encontrada no Pb-S entre ambos grupos, voluntários do grupo de genótipos ALAD 1-2/2-2 apresentaram maiores concentrações de Pb-P e maiores frações %Pb-P/Pb-S quando comparados com voluntários do grupo de genótipos ALAD 1-1 ($P < 0,0001$ para ambos). Os mais elevados níveis de Pb-P e de fração %Pb-P/Pb-S em voluntários com alelo variante ALAD2 indicam que indivíduos com genótipo ALAD 1-2/2-2 provavelmente são mais suscetíveis aos riscos de saúde provenientes da exposição ao chumbo.

ABSTRACT

Abstract

Delta aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) plays an important role in lead poisoning. This study was carried out to examine the effects of ALAD gene polymorphism (G177C) on %Pb-P (plasma lead)/Pb-B (whole blood) ratio in 142 subjects environmentally exposed to lead. Genotypes for the ALAD G177C polymorphism were determined by PCR and restriction fragment length digestion. Pb-P and Pb-B were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry and by graphite furnace atomic absorption spectrometry, respectively. The allele frequencies for ALAD1 and ALAD2 alleles were 0.897 and 0.103, respectively. We combined both ALAD 1-2 and ALAD 2-2 genotypes together (ALAD 1-2/2-2 group) and compared with the ALAD 1-1 genotype group. While no significant differences were found in Pb-B, subjects from the ALAD 1-2/2-2 genotype group presented higher Pb-P concentrations and %Pb-P/Pb-B ratios when compared with subjects from the ALAD 1-1 genotype group (both $P < 0.0001$). The higher %Pb-P/Pb-B ratios in carriers of the ALAD-2 allele compared with non-carriers indicates that ALAD 1-2/2-2 subjects are probably at increased health risks associated with lead exposure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho esquemático da biossíntese do heme.

Figura 2 - Estrutura 3D da enzima ALAD.

Figura 3 - Desenho esquemático do gene da ALAD, com sítio de restrição para *MspI*.

Figura 4 – Foto de um gel com os genótipos do polimorfismo G177C da ALAD.

Figura 5 - Níveis de chumbo no sangue total em indivíduos com genótipo ALAD 1-1 e ALAD 1-2/2-2.

Figura 6 - Níveis de chumbo no plasma em indivíduos com genótipo ALAD 1-1 e ALAD 1-2/2-2.

Figura 7 - Fração de Pb-P/Pb-S em indivíduos com genótipo ALAD 1-1 e ALAD 1-2/2-2.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos voluntários participantes do estudo.

Tabela 2 - Resultados do teste de equilíbrio de Hardy - Weinberg.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALAD – ácido δ -Aminolevulínico desidratase

Pb-P – chumbo no plasma

Pb-S – chumbo no sangue total

%Pb-P/Pb-S – fração de chumbo no plasma/chumbo no sangue total

cm – centímetro

δ – letra do alfabeto grego de nome delta; também representado pelo símbolo Δ

EPM – erro padrão da média

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro (10^{-3} L)

n – número. Refere-se ao número amostral de uma população ou ao número de indivíduos retirados de uma determinada população e incluso em um grupo de estudo para análises estatísticas

NS – não significativo

°C – graus celsius

$P < 0,05$ - valor de probabilidade $< 0,05$ estatisticamente significativo

rpm – rotação por minuto

L–litro

MspI – endonuclease cujo sítio de restrição é 5'-C`CGG-3'

ICP-MS – Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

Taq – polimerase termo-estável, isolada da bactéria *Thermophilus aquaticus*

Triton X-100 – p-t-octilfenil polioxietileno.

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

Tris.Cl – tris(hidroximetil)metilamina

nm – nanômetros

µg – micrograma

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

ÍNDICE

Resumo.....	9
Abstract	11
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	14
1 – Introdução	19
O chumbo na História	19
Exposição ao chumbo e a saúde Humana.....	20
A estreita relação entre sangue, ALAD e chumbo.	21
Polimorfismo Humano da ALAD e suscetibilidade a toxicidade pelo chumbo	23
Importância dos níveis de chumbo no plasma sanguíneo e da fração percentual do chumbo no plasma/chumbo no sangue total (fração %Pb - P/Pb-S)	27
2 - Hipótese	32
3 – Objetivo	34
4 - Materiais e Métodos	36
<i>Seleção dos voluntários e coletas sanguíneas</i>	36
<i>Determinação do polimorfismo G177C da ALAD.</i>	36
<i>Extração do DNA genômico</i>	37
<i>Reação de Polimerase em Cadeia - PCR</i>	39
<i>Digestão do produto de PCR amplificado</i>	39
<i>Eletroforese e visualização</i>	40
<i>Determinação das concentrações de chumbo no sangue total</i>	40
<i>Determinação das concentrações de chumbo no plasma</i>	42
<i>Reagentes e soluções</i>	42

<i>Materiais de referência para controle dos resultados de chumbo</i>	43
<i>Análise dos resultados</i>	44
<i>Equilíbrio de Hardy-Weinberg</i>	44
<i>Análise estatística</i>	44
5 – Resultados	46
O polimorfismo G177C da ALAD aumenta os níveis Pb-P e a fração %Pb-P/Pb-S	46
6 – Discussão	51
7 – Conclusão	56
8 – Referências Bibliográficas	58
9 – Apêndice	67
Artigo publicado na revista <i>Archives of Toxicology</i> :.....	68
10 – Anexos	74
1. Termo de consentimento livre e esclarecido	75
2. Documento de aprovação do comitê de ética em pesquisa	77

INTRODUÇÃO

1 – Introdução

O chumbo (Pb) metálico é utilizado em mais de duzentos processos industriais diferentes (1), entre os quais se destacam a produção de acumuladores elétricos, ligas de chumbo, chapas, tubos, revestimentos de cabos e a produção de vários pigmentos utilizados na indústria química (2).

O contato humano com esse metal pode levar a distúrbios de, praticamente, todas as partes do organismo, uma vez que o chumbo ionizado se difunde facilmente por todo o corpo. Embora a toxicidade do chumbo aos seres humanos seja bem conhecida, ainda hoje existem dados discordantes na literatura científica a respeito de seus efeitos tóxicos. O chumbo é amplamente utilizado há milhares de anos. Atualmente, é um dos contaminantes mais comuns do ambiente, devido às inúmeras atividades industriais que favorecem a sua grande distribuição. No entanto, este metal não possui nenhuma função fisiológica conhecida no organismo, e seus efeitos são tóxicos em homens e animais (2).

O chumbo na História

O chumbo é um elemento abundante em toda a crosta terrestre e sua utilização já ocorria em épocas bem remotas. Devido ao seu baixo ponto de fusão, ductibilidade e facilidade em formar ligas metálicas, o chumbo foi um dos primeiros metais a ser manipulado pelo homem, que desde a Antigüidade utilizava-o na fabricação de utensílios, armas e adornos. A partir do século XVIII que sua utilização atingiu grande escala, quando passou a ser incorporado aos processos industriais então nascentes (3).

O chumbo foi um dos primeiros metais a ser trabalhado pelo Homem, sendo conhecido desde 3500 a.C., de acordo com descobertas arqueológicas feitas no Egito. A peça de chumbo mais antiga que se conhece está no Museu Britânico e data de 3800 a.C.. O modo como os povos antigos extraíam o chumbo dos seus minerais não é bem

conhecido. No entanto, existem vestígios de fornalhas muito rudimentares, feitas de pedra, do que se supõe que estes povos aqueciam os minérios de chumbo, com fogueiras que queimavam madeira e carvão para extrair o elemento. Existem evidências de que os Chineses já produziam chumbo metálico por volta de 3000 a.C., e de que os Fenícios tinham explorações em regiões próximas a Espanha em 2000 a.C.. No século V a.C., os Romanos fizeram uma exploração extensa dos depósitos de chumbo em toda a Península Ibérica. No Império Romano era comum a contaminação de bebidas e alimentos, uma vez que os utensílios eram feitos de chumbo, assim como os vasos onde se guardavam os vinhos (3). No período de 700 d.C. a 1000 d.C. as minas alemãs de chumbo e prata, no vale do Reno e das montanhas de Hartz, eram muito importantes, tal como as da Saxônia, Silésia e Boémia no século XIII. No século XVII, as fundições de chumbo se desenvolveram na Grã-Bretanha, particularmente aquelas localizadas em Gales e Derbyshire. A intoxicação ocupacional pelo chumbo foi muito pronunciada no século XIX, principalmente entre pintores, encanadores e trabalhadores de fundição de chumbo, além de outros trabalhadores industriais. As doenças causadas pela exposição ao chumbo eram comuns no Reino Unido e, após uma série de mortes destes trabalhadores, em 1883, foi feita a primeira legislação com relação à proteção de trabalhadores expostos (3).

Exposição ao chumbo e a saúde Humana

Até os dias de hoje a toxicocinética do chumbo vem sendo exaustivamente estudada em homens e animais devido a sua toxicidade. O desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis tem conduzido a uma série de mudanças no que se refere ao entendimento da toxicidade do chumbo. O chumbo pode afetar diversos processos fisiológicos e estes podem ser influenciados por fatores endógenos, como por exemplo, constituição genética, fatores antropométricos e estado de saúde, ou exógenos, tais como carga de trabalho, e exposição simultânea a várias substâncias, como drogas, álcool e

fumo (4). Entretanto, apesar dos numerosos estudos, muitos aspectos do metabolismo normal do chumbo ainda são pouco entendidos. A maior parte do chumbo entra no organismo humano pelas vias respiratória e gastrintestinal. Após absorção, o chumbo pode ser encontrado principalmente no sangue, tecidos moles e mineralizados (5). O sítio primário de armazenamento de Pb no organismo é o osso, que contém aproximadamente 90% do conteúdo corpóreo total do metal em adultos (6). Atualmente, o chumbo contido nos ossos é reconhecido como sendo tão importante quanto as influências da exposição exógena, com importante papel no comportamento toxicocinético deste metal (7, 8). Inúmeros estudos têm fornecido evidências de que a mobilização de Pb dos ossos para o sangue é intensificada durante os períodos de remodelamento ósseo (7, 8). Uma vez na corrente sangüínea, os processos cinéticos de absorção, trocas com outros compartimentos do organismo e de eliminação determinam o teor de chumbo no sangue e plasma (9). A fisiologia do chumbo em humanos normalmente desperta um interesse considerável, gerado pela toxicidade potencial desse elemento. O chumbo inorgânico pode afetar uma série de sistemas, cuja grandeza das manifestações clínicas dependerá da intensidade, do tempo de exposição e da sensibilidade individual (2). A toxicidade está relacionada principalmente aos sistemas nervoso e hematopoiético. Entretanto, podem ocorrer efeitos renais, cardiovasculares e na reprodução em humanos. Alguns estudos têm correlacionado efeitos adversos à saúde com níveis cada vez mais baixos de chumbo no sangue, até mesmo em concentrações menores do que 10 µg/dL, principalmente em crianças (5).

A estreita relação entre sangue, ALAD e chumbo.

O sistema hematopoiético é um dos alvos do chumbo. Um dos mais importantes mecanismos da toxicidade deste metal é a capacidade de afetar as enzimas da via

biossintética do heme. A ALAD é a segunda enzima desta via e possui como substrato o ácido aminolevulínico (ALA). Devido a capacidade de o chumbo efetivamente inibir a atividade da ALAD, ocorre o acúmulo de ALA no sangue e na urina. Conseqüentemente, os níveis de ALA urinário (ALA-U) também tem sido usado como biomarcador de exposição ao chumbo ou dos efeitos biológicos causados por ele (10). ALA tem atividade neurotóxica e pode contribuir para a indução de efeitos tóxicos do chumbo no cérebro (11). Após o ciclo hematopoético, a enzima ferroquelatase introduz o íon ferro na molécula de protoporfobilinogênio para formar o heme. O chumbo inibe a atividade da ferroquelatase e impede a incorporação do íon ferro a hemoglobina. Esta reação também leva a ligação do zinco, formando zinco protoporfirina (ZPP) (12). A presença de ZPP também tem sido proposta como um indicador de recente intoxicação pelo chumbo e assim também vem sendo utilizado como um biomarcador de exposição ao chumbo (12).

Ácido δ -aminolevulínico desidratase, a segunda enzima da via biossintética do heme (Figura 1), catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido δ -aminolevulínico (ALA) para formar porfobilinogênio, um precursor do heme, clorofila, citocromos e cobalaminas (13). ALAD é uma metaloenzima composta de oito subunidades idênticas e oito átomos de zinco (14-16). Os átomos de zinco são essenciais à atividade enzimática. A atividade da ALAD é inibida pelo chumbo (13), bem como pela oxidação de grupamentos tióis da enzima (13). Os átomos de chumbo substituem os de zinco que são necessários à atividade da ALAD (14). Embora a concentração de chumbo no sangue seja menor do que 2% do seu total no organismo, de 90% a 99,8% do metal estão ligados à membrana dos eritrócitos e a frações de proteínas. Até o início da década de 90, acreditava-se que a hemoglobina era principal proteína à qual o chumbo se ligava, além de outras proteínas de baixo peso molecular dos eritrócitos. Entretanto, Bergdahl e colaboradores (17) concluíram que a principal proteína à qual o chumbo se ligava é a

Ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD), sugerindo que o conceito de que o Pb se ligava primeiramente à hemoglobina deveria ser revisto. A partir de proteínas obtidas de eritrócitos lisados, além da maior afinidade do Pb pela ALAD, estes pesquisadores também observaram ligações do chumbo com uma proteína de massa molecular de 45 kDa e com outra de massa menor do que 10 kDa. No entanto, nenhum chumbo ligado à hemoglobina foi detectado. Resultados semelhantes foram encontrados por Xie e colaboradores (18).

Polimorfismo Humano da ALAD e suscetibilidade a toxicidade pelo chumbo

O gene que codifica a ALAD existe em duas formas polimórficas que pode modificar a toxicocinética e influenciar na suscetibilidade individual à toxicidade do chumbo. A enzima é codificada por um gene localizado no cromossomo 9q34, o qual possui dois alelos dominantes, chamados ALAD1 e ALAD2. A característica polimórfica deste gene foi primeiramente descrita em 1981 por Petrucci e colaboradores (19). Posteriormente, o cDNA do gene da ALAD foi clonado por Wetmur e colaboradores (20). O alelo ALAD2, o qual é menos freqüente, ocorre de entre 5 a 20% de populações caucasianas e mais raramente em populações de descendentes africanos e asiáticos (21-23). A expressão destes alelos resultam em três formas distintas de isoenzimas. Estas são denominadas ALAD 1-1, 1-2, e 2-2, as quais podem ser identificadas por meio de eletroforese. A diferença entre ALAD2 e ALAD1 é a substituição de lisina por asparagina no resíduo 59 da proteína, resultante de uma simples mudança de nucleotídeo (G por C) na posição 177 do gene (21). É possível que esta substituição no alelo ALAD2 resulte em uma enzima com a carga elétrica alterada, levando a uma afinidade maior pelo chumbo do que nos indivíduos ALAD1. Assim, o aminoácido lisina, eletricamente positivo (+) é substituído devido ao polimorfismo (G por C) pelo aminoácido asparagina, o qual é eletricamente neutro.

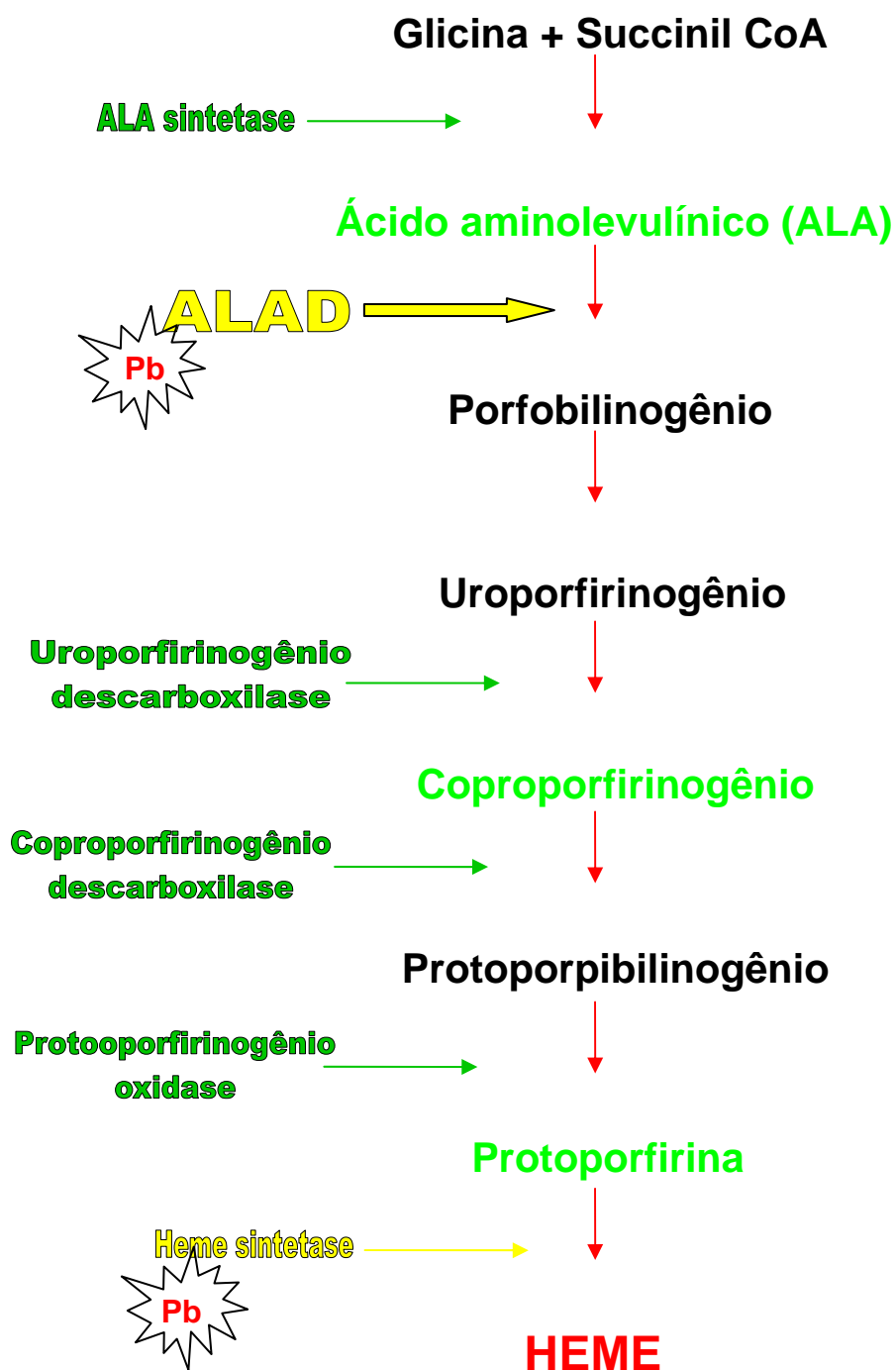


Figura 1 - Desenho esquemático da biossíntese do heme, indicando as enzimas inibidas pelo chumbo.

Sendo assim, a molécula da ALAD ficaria mais eletronegativa, apresentando maior afinidade pelo chumbo (13). Levando-se em consideração o polimorfismo encontrado na população humana e o conhecimento que a enzima ALAD é sensivelmente inibida pelo chumbo, vários estudos consideraram que este polimorfismo poderia influenciar na suscetibilidade humana a intoxicação pelo chumbo.

Existem grandes evidências sugerindo um importante papel da ALAD no acúmulo biológico de chumbo. Ainda não está claramente definido exatamente como o polimorfismo da ALAD influencia a distribuição do chumbo a outros tecidos e órgãos-alvo. Dois diferentes cenários podem ser abertos para a discussão. No primeiro, um aumento do chumbo ligado a ALAD, especialmente ALAD 2-2, poderia resultar em um aumento da distribuição do chumbo para outros órgãos-alvo como rins e cérebro. Por outro lado, é possível que a ALAD 2-2 poderia ser um seqüestrador sanguíneo do chumbo. ALAD 2-2 poderia servir como um substrato de alta finidade, retendo chumbo no sangue e protegendo outros órgãos. Neste caso, pessoas com alelo ALAD2 poderiam experimentar efeitos menos severos com a exposição ao chumbo e um menor acúmulo de chumbo nos ossos, mesmo apresentando níveis de chumbo no sangue mais elevados que indivíduos homocigotos para o alelo ALAD1, expostos aos mesmos níveis de chumbo. Para investigar estas possibilidades, alguns marcadores de efeitos do chumbo foram investigados em humanos e sua relação com os genótipos da ALAD. Outros estudos propõem um papel mais complexo para papel do polimorfismo da ALAD na toxicidade do chumbo e suportam a idéia que o alelo ALAD2 pode exercer um papel benéfico. Por exemplo, em um estudo de 65 trabalhadores expostos ao chumbo com a média de chumbo no sangue de 27,9 µg/dL, a presença de ALA no plasma foi em torno de 30% mais alta em voluntários ALAD 1-1 do que nos indivíduos ALAD 1-2 (11). Este resultado é importante, uma vez que os efeitos neurológicos do chumbo são devidos, ao menos em

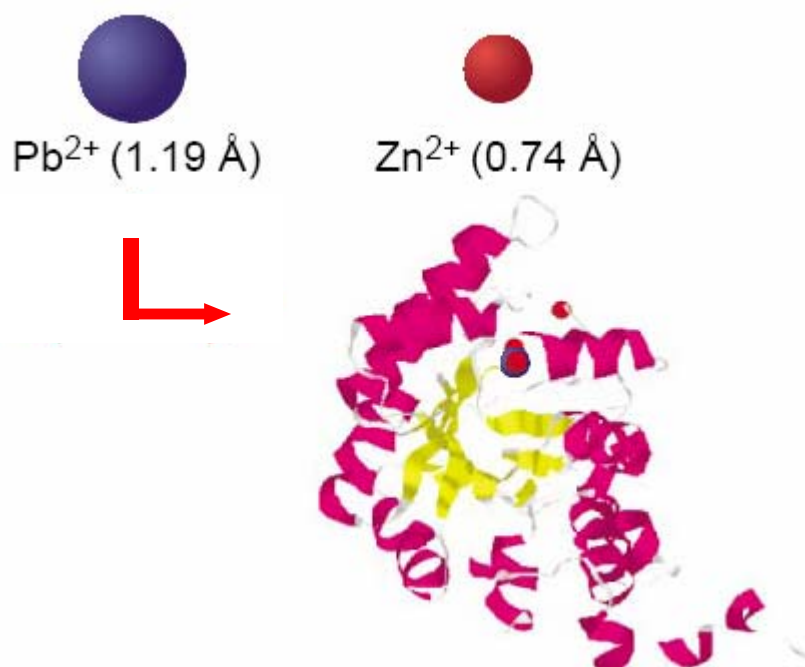


Figura 2 - Estrutura 3D da enzima ALAD. As esferas indicam íon de chumbo e zinco, respectivamente. Embora com raio atômico superior, o íon chumbo é capaz de substituir o zinco iônico da ALAD, inativando-a [*adaptado de Godwin, (65)*].

parte, a toxicidade do ALA (32). Estes resultados estão de acordo com os obtidos em outro estudo realizado com um grupo de adolescentes com genótipo ALAD 1-2, que demonstrou que estes realizaram testes neuropsicológicos de atenção de forma mais eficaz do que aqueles com genótipo ALAD 1-1 expostos aos mesmos níveis de chumbo (33). Estes dados sugerem que o alelo ALAD2 possa apresentar algum papel protetor na indução de neurotoxicidade causada pelo chumbo. Não é conhecido como o polimorfismo da ALAD pode influenciar o transporte do chumbo aos órgãos-alvo, particularmente o

cérebro. É possível que o papel protetor do alelo ALAD2 seja devido a manutenção do chumbo no compartimento sanguíneo. Apoiando esta hipótese, resultados demonstraram que indivíduos ALAD1-1 armazenam mais chumbo nos ossos do que indivíduos ALAD2 com altos níveis de chumbo no sangue (34). Além disso, altos níveis de ZPP podem ser detectados em indivíduos ALAD 1-1 comparados com heterozigotos ALAD 1-2 (35). Conjuntamente, estes dados indicam que o papel do polimorfismo da ALAD na toxicidade do chumbo é multifatorial e complexo, indicando ainda o vasto campo de pesquisa a fim de identificar quais papéis os polimorfismos da ALAD desempenham na suscetibilidade ou não à toxicidade pelo chumbo.

Importância dos níveis de chumbo no plasma sanguíneo e da fração percentual do chumbo no plasma/chumbo no sangue total (fração %Pb - P/Pb-S)

Recentemente, atenção especial tem sido dada aos níveis plasmáticos de chumbo, bem como a fração %Pb-P/Pb-S. Ao longo das últimas cinco décadas, o sangue total tem sido o fluido primário utilizado para a avaliação de exposição ao chumbo (5). Medidas de chumbo no sangue (Pb-S) refletem exposição recente e também representam exposições passadas, como resultado da mobilização do chumbo nos estoques ósseos para a corrente sanguínea (8, 36-40). Entretanto, na cinética do chumbo, a diferenciação entre baixos níveis de exposição crônica e um curto prazo de alta exposição não são possíveis com base nas medidas dos níveis de Pb-S. Conseqüentemente, tem crescido o interesse em outros biomarcadores que possam melhor representar exposições passadas. Por exemplo, os níveis de chumbo no plasma (Pb-P) pode ser um melhor índice de exposição, distribuição e riscos à saúde associados e a este metal. Além disso, alguns autores consideram os efeitos tóxicos do chumbo primariamente associados aos níveis de Pb-P, o qual parece refletir mais rapidamente a fração biodisponível na corrente sanguínea (8, 41-43).

Neste sentido, aceita-se que os efeitos tóxicos do chumbo sejam relacionados com os níveis de Pb-P, ou com a fração livre de chumbo no plasma em relação ao chumbo no sangue total (%Pb-P/Pb-S). Alguns estudos avaliaram a relação entre níveis de Pb-P e Pb-S em crianças ambientalmente expostas (44), mulheres sem história de exposição (45) e em população adulta exposta ambientalmente (46). Estes estudos observaram uma importante relação curvilínea entre Pb-S e Pb-P, e uma maior correlação entre Pb no soro ou plasma com os níveis de chumbo no osso (Pb-O), do que entre Pb-S e Pb-O (9, 47), sugerindo que o chumbo dos estoques ósseos contribuem para esta alta fração de chumbo no plasma.

Os modelos propostos para representar a cinética do Pb normalmente supõem que o seu transporte pelo corpo é comandado pelo componente *plasma* do sangue total (48). Porém, em concentrações elevadas de Pb-S, há uma saturação gradual dos sítios de ligação nos eritrócitos e uma maior quantidade deste elemento se torna biologicamente disponível. Este mecanismo é consistente com os resultados encontrados por Fleming e colaboradores 1997 (49) em que os trabalhadores mais antigos de uma fundição apresentaram concentrações de chumbo no sangue relativamente altas, podendo freqüentemente ter excedido tal ponto de saturação, enquanto que trabalhadores empregados há menos tempo teriam níveis de Pb-S abaixo deste ponto. Resultados de estudos com isótopos sobre a liberação do Pb do osso para a circulação mostraram que 40% a 70% do chumbo presente no sangue de indivíduos expostos ambientalmente (7) e de mulheres adultas (50) são provenientes do chumbo armazenado nos estoques ósseos. Os estoques ósseos influenciam a concentração do chumbo no plasma de modo independente da influência do Pb sanguíneo. Conseqüentemente, a superioridade do metal de origem óssea sobre o sanguíneo em predizer algumas formas crônicas de toxicidade pode ser intermediada pela sua influência sobre o Pb plasmático (46). Assim,

uma hipótese alternativa foi proposta para a cinética do Pb, em que fontes endógenas favorecem mais fortemente o compartimento *plasma* do que as exógenas (9).

A determinação do chumbo no plasma é uma medida mais exata do que no sangue para avaliação da exposição, especialmente em níveis elevados do metal. O plasma é o componente do sangue que contém o Pb livre para cruzar as membranas celulares e causar seus efeitos tóxicos (51). Os ligantes presentes no plasma, e disponíveis para a ligação com o Pb, ainda não estão bem definidos. Sabe-se, entretanto, que o plasma contém uma fração estimada entre 0,2% a 10% do Pb-S, provavelmente ligada à albumina, α 2-globulina ou como íons livres disponíveis para o transporte para os tecidos (2). É possível que esta última fração tenha maior importância toxicológica do que o chumbo no sangue total, pois está mais biodisponível para atingir os sítios-alvo da ação toxicológica. As concentrações plasmáticas de chumbo raramente têm sido medidas devido às dificuldades analíticas e, por isso, sua relação com as manifestações tóxicas não está claramente definida (17, 52). Um estudo realizado com mulheres em idade reprodutiva expostas ambientalmente ao chumbo, encontrou uma variação natural de duas a quatro vezes na partição relativa deste metal entre o sangue total e o plasma, para a faixa de concentração estudada (2,13 a 39,7 $\mu\text{g.dL}^{-1}$) de chumbo em sangue (45). O chumbo atravessa a barreira hematoencefálica, mas sua concentração no cérebro é baixa. Também atravessa a placenta, que pode determinar 57,4% do nível de Pb transferido para o feto, e o sangue fetal contém quase que os mesmos níveis do metal que o sangue materno (53). O chumbo é mobilizado dos ossos numa taxa acelerada e transferido para o feto, mostrando que esta mobilização contribui significativamente para aumentar os níveis de Pb-S durante a segunda metade da gravidez (54, 39). O Pb dos estoques ósseos pode ser mobilizado para a circulação nas situações em que normalmente ocorre uma maior mobilização como nos estados fisiológicos e patológicos,

que promovem aumento do remodelamento ósseo (8), constituindo assim um mecanismo para a toxicidade tardia. Vários estudos foram realizados mostrando que o remodelamento ósseo aumenta os níveis de chumbo, durante a gravidez (55), lactação (38, 47) e menopausa (56, 57). Conjuntamente, estes dados demonstram a importante relação entre os níveis de chumbo no plasma, sangue e ossos, na toxicocinética deste metal.

Entretanto, até o momento, nenhum estudo havia verificado se polimorfismos genéticos da ALAD, os quais parecem exercer uma importante influência na toxicocinética do chumbo, alteram os níveis de Pb-P, e principalmente na fração percentual de Pb-P/ Pb-S.

HIPÓTESE

2 - Hipótese

Com base nas evidências anteriormente citadas, hipotetizamos que o polimorfismo G177C da ALAD poderia influenciar nos níveis de Pb-P e a fração de Pb-P/Pb-S de indivíduos expostos ambientalmente.

OBJETIVO

3 – Objetivo

Baseado nesta hipótese, este estudo teve como objetivo:

Verificar se o polimorfismo G177C da ALAD influencia os níveis plasmáticos de chumbo (Pb-P) e a fração chumbo no plasma/chumbo no sangue (%Pb - P/Pb-S) de voluntários expostos ambientalmente ao chumbo.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 - Materiais e Métodos

Seleção dos voluntários e coletas sanguíneas

O projeto desta pesquisa foi aprovado pela comissão de ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Foram selecionados voluntários adultos residentes na cidade de Bauru (São Paulo), que moravam próximo a uma antiga fábrica de baterias e estavam ambientalmente expostos ao chumbo. Estes voluntários foram devidamente orientados a respeito dos objetivos desta pesquisa e assinaram o termo de consentimento (veja anexo), resultando em um total de 142 voluntários participantes. As amostras de sangue venoso (18mL) foram coletadas pela equipe da Prof. Dra. Marília Buzalaf (Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo/FOB-USP). Todos os voluntários estavam em jejum de 12 horas. O sangue foi coletado pelo sistema a vácuo em três tubos (6 mL cada, Vacuntainer BD), sendo dois tubos com heparina livre de metais (*Metal free Vacuntainer BD*) para análises de chumbo e um tubo com EDTA para as avaliações hematológicas e genotipagens. A primeira coleta foi utilizada para determinar a quantidade de chumbo no sangue e a segunda para determinação dos níveis de chumbo no plasma. As amostras sanguíneas foram imediatamente centrifugadas (800g por 6 min.) para separação do plasma no sangue total. Cada fração de plasma foi pipetada em dois tubos tipo eppendorf (1,5mL) e imediatamente congelada a -80°C até a realização das análises.

Determinação do polimorfismo G177C da ALAD.

Neste estudo, utilizamos a técnica de PCR para amplificar um fragmento de 916pb do gene que codifica a ALAD, localizado no cromossomo humano 9q34. Amplificamos uma região compreendida entre o íntron 3 e o éxon 4 (veja figura 3), onde ocorre o polimorfismo, especificamente na posição 177. Esta posição possui o nucleotídeo “G” (Guanina), o qual é substituído por “C” (citosina) no alelo polimórfico. Esta substituição

altera o códon comum “AAG”, para o códon mais raro “AAC”, o qual substitui o aminoácido lisina (AAG) por asparagina (AAC), na posição 59 da proteína ALAD (K59N). Após a amplificação por PCR, as amostras são digeridas pela endonuclease *MspI*, que cliva especificamente o produto amplificado na região AAG. Portanto, apenas as amostras amplificadas que contém AAG serão clivadas (ou seja, as amostras que possuem o polimorfismo). Esta característica altamente específica da *MspI*, nos permite “cortar” nossas amostras amplificadas que contém o polimorfismo G177C da ALAD. Adicionalmente, após esta digestão, separamos os diferentes produtos resultantes por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, e os visualizamos por coloração com nitrato de prata.

Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído do sangue total utilizando-se o método da *proteinase K* de acordo com o proposto por Miller et al, 1988 (58). Em resumo, 900µL de sangue total foi lisado com 900µL de *Tampão Red Blood Cell Lysis* (Tris.Cl 2%, PH 7,6) e incubado à temperatura ambiente por 10 min em tubos plásticos de 2mL (tipo eppendorf) invertendo-se ocasionalmente.

Em seguida os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 20 seg. Após descarte do sobrenadante, adicionou-se 600 µL de *Tampão Cell Lysis* (Tris.Cl 1%, SDS 0,1%; EDTA 0,5 M - pH 8) gelado, seguido novamente de homogeneização, invertendo os tubos de 30 a 50 vezes (precipitação SDS). Este processo lisa os eritrócitos, remove a hemoglobina e lisa os leucócitos preservando o DNA nuclear. Em seguida adicionamos 3 µL de *proteinase K* (20 mg/mL) e incubamos em banho maria a 55°C por 16 h. Em seguida, adicionamos 200 µL de *Acetato de Potássio* (5M) foi adicionado e incubamos em gelo por 5 min. Neste momento, ocorre a formação de um

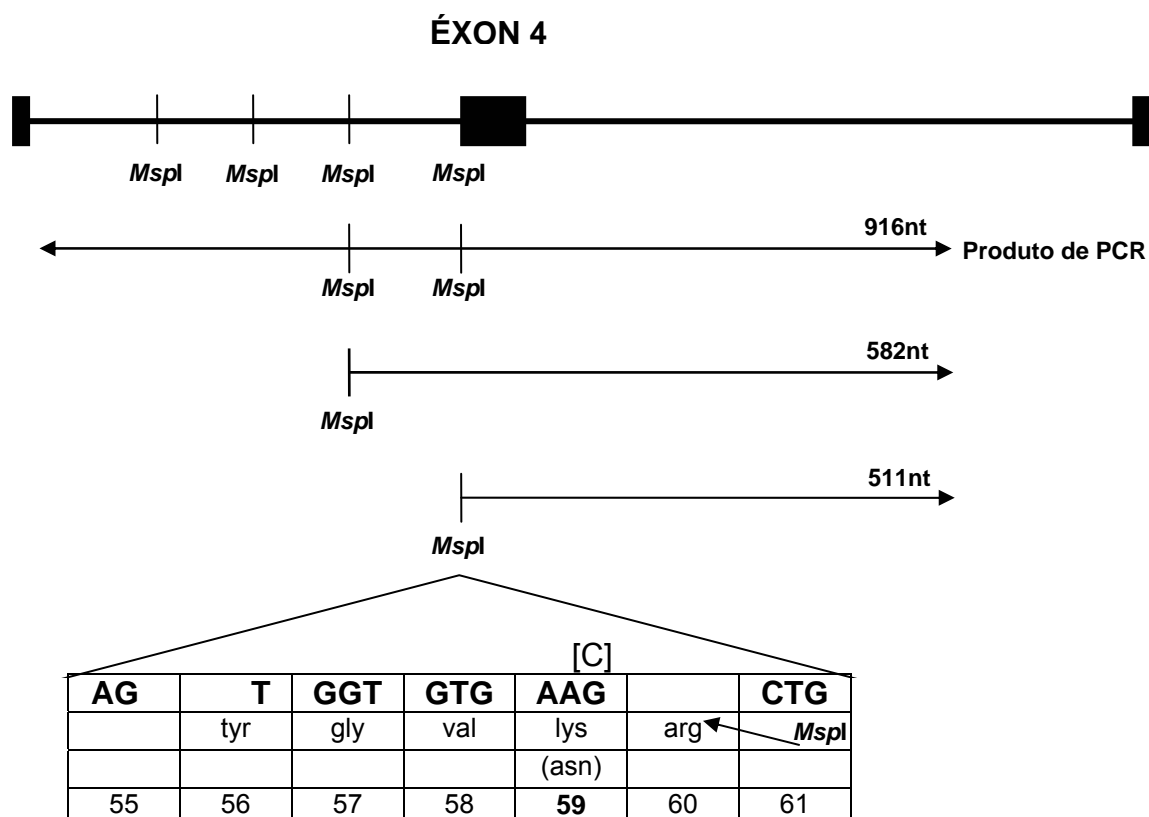


Figura 3 – Análise molecular esquemática dos alelos da ALAD humana (*ALAD1* e *ALAD2*). *Acima*: mapa de restrição *MspI* de um fragmento do gene da ALAD, mostrando seqüências exônicas (caixas sólidas) e intrônicas (linha sólida); *seguintes*: produto de PCR amplificado com 916 nucleotídeos; produto amplificado digerido com *MspI*, resultando em 582 ou 511 nucleotídeos (*ALAD1* e *ALAD2*, respectivamente); *abaixo*: seqüências de nucleotídeos (163-183) com a respectiva seqüência de aminoácidos e número de ordem na proteína. A substituição de “G” por “C” cria o site para *MspI*, e substitui o aminoácido lisina por asparagina [adaptado de Wetmur e colaboradores (21)].

pellet de proteína. Em um novo tubo plástico de 2mL adicionamos o sobrenadante e 600 μ L de *álcool isopropílico*. Centrifugamos novamente a 3000 rpm por 1 min. e descartamos o sobrenadante, verificando a formação de um “*pellet*” de DNA, que é precipitado pela adição de 600 μ L de *etanol a 70%* gelado. Após a evaporação do etanol à temperatura ambiente por aproximadamente 15 min., o *pellet* de DNA foi redissolvido em 50 μ L de *TE* (Tris.Cl 1M; EDTA 0,5M - pH 7,6). A quantificação do DNA foi realizada pela determinação espectrofotométrica da concentração do DNA pela relação das absorvâncias a 260 e 280 nm (Rel 260/280).

Reação de Polimerase em Cadeia - PCR

Utilizamos a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) - seguida de digestão com enzima de restrição, como descrito anteriormente (21). Em resumo, DNA genômico (500ng) foi utilizado para reação. O PCR foi realizado em um volume final de reação de 25- μ L, contendo 0,5 μ M de cada primer (5'-AGACAGACATTAGCTCAGTA-3' e 5'GGCAAAGACCACGTCCATTC-3'), 200 μ M de cada dNTP, 1X Tampão de PCR fornecido pela Invitrogen Corp (10mM Tris-HCl, pH 8,8, 50 mM KCl), 2,5mM MgCl₂, e 2.5Unidades *DNA Taq polymerase* (Biosystems, Curitiba, Brasil). As condições de PCR foram as seguintes: pré-desnaturação a 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de primers a 61°C por 30 segundos e síntese a 72°C por 1 min.

Digestão do produto de PCR amplificado

O produto amplificado foi digerido durante 4 horas com a endonuclease *MspI* a 37°C. Utilizamos 5U de *MspI*, 1X o tampão da enzima fornecido pelo fabricante (50mM NaCl, 10mM Tris-Cl, 10mM MgCl₂, 10mM ditiotriol, pH 7,9) (Biolabs, inc New England), para digerir 5 μ L de produto de PCR, em um volume final de 10 μ L.

Eletroforese e visualização

Os fragmentos foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 8%. As condições de corrida foram: 300V, 50W e 20mA, por 2 a 3 horas. Utilizamos TBE como líquido de corrida e tampão de amostra à base de azul de bromofenol, sacarose e glicerol (0,25%, 40%, 40%). A visualização foi realizada com coloração pela prata. Em resumo, o gel foi submetido a uma solução de fixação de DNA (1% de ácido acético em uma solução de etanol a 10%) durante 10 min. Esta solução fixa o DNA ao gel de poliacrilamida; Em seguida o gel foi submetido a uma solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3 0,2%) durante 30 min. O nitrato de prata desta solução fixa-se fortemente ao DNA. Após este período o gel foi lavado duas vezes com água corrente para retirada do excesso da solução de prata. Em seguida o gel foi revelado com solução aquosa de hidróxido de sódio com formaldeído como catalisador (NaOH 3%, CHOH 1%). Esta solução reage com o nitrato de prata precipitando a prata e formando nitrato de sódio e água. Dessa forma podemos visualizar as bandas de DNA com prata, uma vez que esta é rapidamente oxidada pelo oxigênio atmosférico formando uma coloração fortemente escura. Os indivíduos com genótipo ALAD 1-1 apresentam somente uma banda de 582 pb; os com genótipo ALAD 1-2 apresentam fragmentos de 582 e 511 pb; indivíduos com genótipo ALAD 2-2 apresentam apenas uma banda com tamanho de 511bp (veja figura 4).

Determinação das concentrações de chumbo no sangue total

A determinação de chumbo em sangue total foi realizada conforme o método proposto por Zhou e cols (59). Foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica marca Varian modelo SpectrAA 220 com forno de grafite e plataforma integrada com aquecimento transversal (THGA). Tubos de grafite THGA tipo “*standard*” foram utilizados. Todas as medidas foram realizadas em 283.3 nm, usando lâmpada de descarga sem eletrodo de chumbo, sistema EDL II, da Perkin-Elmer como fonte de radiação e monocromador

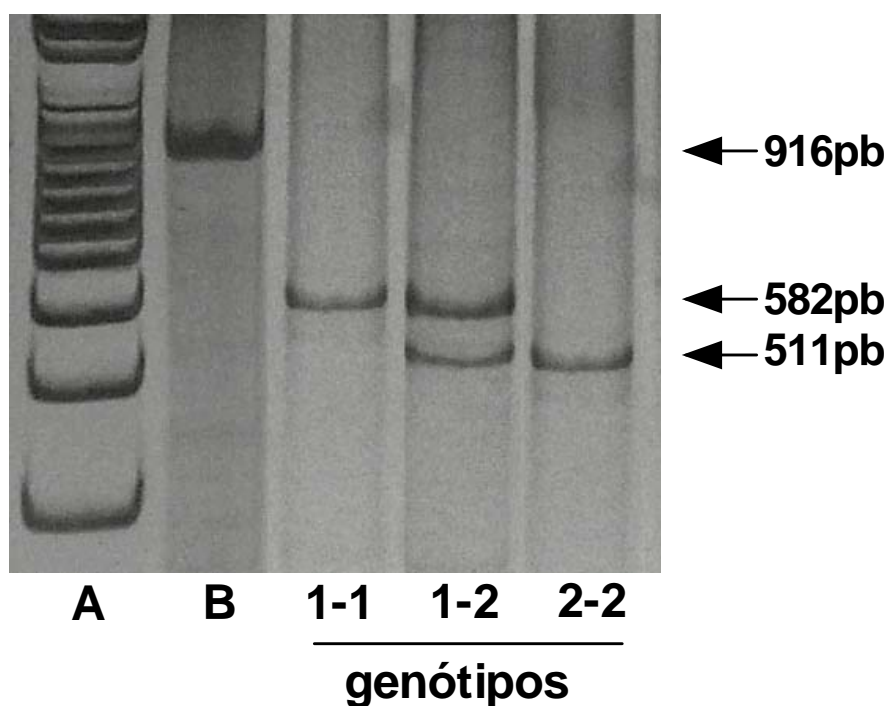


Figura 4. Foto de um gel representativo de genotipagem para o polimorfismo G177C da ALAD, obtido neste estudo. O produto de PCR foi digerido com enzima de restrição (*MspI*), produzindo diferentes fragmentos resultando a genótipos específicos. Coluna A: marcador de peso molecular padrão (100bp DNA leader, Promega, Madison, WI). Coluna B: produto de PCR não digerido, com 916pb. Colunas 1-1, 1-2, e 2-2: genótipos ALAD 1-1, ALAD 1-2, e ALAD 2-2, respectivamente.

com fenda para 0,7 nm. As medidas foram realizadas sempre em área de pico. Resumidamente, 100 μ L de cada amostra de sangue total foi diluída na proporção de 1:10 em uma solução contendo 0,2 % v/v HNO_3 0,5% de Triton X-100. Desta mistura resultante, foram retirados 12 μ L e imediatamente injetados no forno de grafite, com tubo de grafite cuja plataforma havia sido previamente revestida com tungstênio e ródio (W - Rh). A calibração foi realizada utilizando soluções aquosas de chumbo (acetato de chumbo). O limite de detecção do método foi 0,07 μ g/L.

Determinação das concentrações de chumbo no plasma

A determinação de chumbo no plasma sanguíneo foi realizada utilizando o método proposto por Schutz e cols (41). Utilizamos um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) marca Perkin-Elmer modelo 6100. Resumidamente, 300 µL de plasma foram diluídos 1:10 com solução contendo amônia (0,04 mol/L), Na₂EDTA (200 mg/L) e Triton X-100 (100 mg/L). O limite de detecção foi de 0,001 µg/L.

Os níveis de ferro no plasma também foram determinados nas amostras dos voluntários, para verificação de hemólise. As amostras hemolisadas foram excluídas das análises.

Reagentes e soluções

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M Ω.cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®) foi utilizada em todo o trabalho. Utilizamos ácido nítrico destilado em temperatura inferior a de ebulição, empregando destilador de quartzo da Kürner Analysentechnik para eliminação de impurezas. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polietileno. Frascos de plástico, copos do autoamostrador e materiais de vidro foram todos mergulhados em solução contendo 20% v/v HNO₃ por 24 h, lavados 5 vezes com água Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar classe 100. Todas as operações para preparo das soluções de referência de chumbo foram realizadas em sala limpa classe 10000, pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura - USP (CENA- Piracicaba/SP).

Foi utilizada uma solução estoque padrão de Pb contendo 1,0 gL⁻¹ Pb (Perkin-Elmer, Inc.) padronizada pela “National Institutes of Standards and Technology” (NIST).

Para a determinação de chumbo em sangue total, soluções de referência de Pb em concentrações de 0,0; 25,0; 50,0 e 100,0 µg L⁻¹ Pb foram preparadas pela diluição 1+9

com solução contendo 0,2 % v/v HNO₃ + 0,5 % v/v Triton X-100 de soluções estoque intermediárias.

Para a determinação de chumbo em plasma sanguíneo, soluções de referência de Pb em concentrações de 0,0; 25,0; 50,0 µgL⁻¹ Pb foram preparadas em solução contendo amônia, EDTA e Triton X-100. Às amostras foram adicionados 1,0 mgL⁻¹ ²⁰⁶Pb. A quantidade de isótopos adicionada às amostras e o procedimento de medida foram ajustados para prover resultados analíticos precisos, calculados pela razão isotópica ²⁰⁶Pb/ ²⁰⁸Pb.

Materiais de referência para controle dos resultados de chumbo

Para a verificação da precisão de nossos resultados, utilizamos padrões de sangue total provenientes da National Institute of Standards and Technology (NIST) nos Estados Unidos e materiais de referência de sangue provenientes do Departamento de Saúde Pública do Estado de Nova Iorque, nos Estados Unidos, contendo chumbo foram analisados previamente e posteriormente a análise de um grupo de 10 amostras das usadas no estudo, para controle dos resultados obtidos (NIST 955 whole blood Standard Reference Material)

Materiais de referência de soro humano, provenientes da Seronorm (Seronorm Trace Elements Serum, Oslo, Noruega) contendo chumbo foram analisados previamente e posteriormente a análise de um grupo de 10 amostras das usadas no estudo, para controle dos resultados obtidos. *Todas estas análises de chumbo foram realizadas em colaboração com o Prof.º Dr. Fernando Barbosa Júnior, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).*

Análise dos resultados

Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para a frequência de genótipos com teste de qui-quadrado, utilizando o software Bioestat 3.0 (60).

Análise estatística

Devido a baixa frequência do genótipo ALAD 2-2, nós dividimos os voluntários em apenas dois grupos: combinamos os genótipos ALAD 1-2 e ALAD 2-2 (grupo ALAD 1-2/2-2) e o grupo de genótipo ALAD 1-1 (grupo ALAD 1-1) para as comparações estatísticas. Os grupos de genótipos foram avaliados para diferenças entre as características dos indivíduos (Tabela 1), Pb-S, Pb-P e fração %Pb-P/Pb-S com o teste "T" (*student's t test*) utilizando o software GraphPad PRISM (GraphPad Prism, Software Inc., San Diego, CA, USA). Todos os resultados são aqui apresentados como média \pm erro padrão da média (média \pm EPM). Foi considerado estatisticamente significativo o valor mínimo de probabilidade menor que 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5 – Resultados

O polimorfismo G177C da ALAD aumenta os níveis Pb-P e a fração %Pb-P/Pb-S

A tabela 1 apresenta as características básicas dos voluntários incluídos neste estudo. A idade variou entre 18 e 60 anos, sendo 55 homens e 87 mulheres. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na idade, parâmetros hematológicos, pressão arterial e status de fumo, entre os voluntários do grupo de genótipos ALAD 1-1 e ALAD 1-2/2-2 (todos $P > 0,05$).

Os 142 voluntários incluídos na análise dos níveis Pb-P e da fração %Pb-P/Pb-S apresentaram a seguinte distribuição de genótipos: 114 com genótipo ALAD 1-1 (80,29%), 27 com genótipo ALAD 1-2 (19,01%) e somente um (01) indivíduo com genótipo ALAD 2-2 (0,7%). Esta distribuição de genótipos para o polimorfismo G177C da ALAD mostrou-se em acordo com a lei de Hardy - Weinberg ($P = 0,66$) (tabela 2). As frequências alélicas para ALAD1 e ALAD2 foram 0,897 e 0,103, respectivamente. Estes resultados são semelhantes àqueles anteriormente observados em outras populações estudadas para o mesmo polimorfismo (13, 61, 62).

Tabela 1. Resultados do teste de equilíbrio de Hardy - Weinberg.

Genótipo ALAD	<i>n</i> (obs.)	<i>n</i> (exp.)	Teste qui quadrado
1-1	114	114,17	$P = 0,66$
1-2	27	26,64	
2-2	1	1,39	
	142		

Nenhuma diferença estatística também foi encontrada nos níveis de Pb-S entre ambos os grupos ($P>0,05$; Tabela 1; Figura 5). Por outro lado, voluntários do grupo ALAD 1-2/2-2 apresentaram altos níveis de Pb-P e %Pb-P/Pb-S quando comparados com voluntários do grupo ALAD 1-1 (ambos $P<0,0001$; Tabela 1; Figuras 6 e 7).

Tabela 2. Características dos voluntários participantes do estudo.

Parâmetros	Total (n=142)	ALAD 1-1 (n=114)	ALAD 1-2 / 2-2 (n=28)	Valor de P*
Idade	36,2 ± 0,9	35,71 ± 1,0	38,50 ± 2,9	NS
Hemoglobina (g/dL)	14,1 ± 0,1	14,04 ± 1,2	14,28 ± 1,3	NS
Hemácias $10^9/\mu\text{L}$	4,7 ± 0,04	4,6 ± 0,40	4,7 ± 0,50	NS
Hematócrito (%)	42 ± 0,3	42 ± 4,0	42 ± 4,4	NS
Pressão sanguínea diastólica (mm/Hg)	75 ± 1,0	74 ± 1,2	79 ± 1,9	NS
Pb-S ($\mu\text{g/L}$)	76,1 ± 5,1	77,5 ± 6,1	70,2 ± 7,4	NS
Pb-P ($\mu\text{g/L}$)	0,55 ± 0,04	0,44 ± 0,05	0,89 ± 0,07	<0,0001
Fração Pb-P/Pb-S (%)	0,67 ± 0,04	0,48 ± 0,02	1,45 ± 0,10	<0,0001
Fumantes (%)	19,8	19,4	20,5	NS
Não-fumantes (%)	80,2	80,6	79,5	NS

NS= não significante. *teste *t*. Dados são apresentados como médias ± EPM

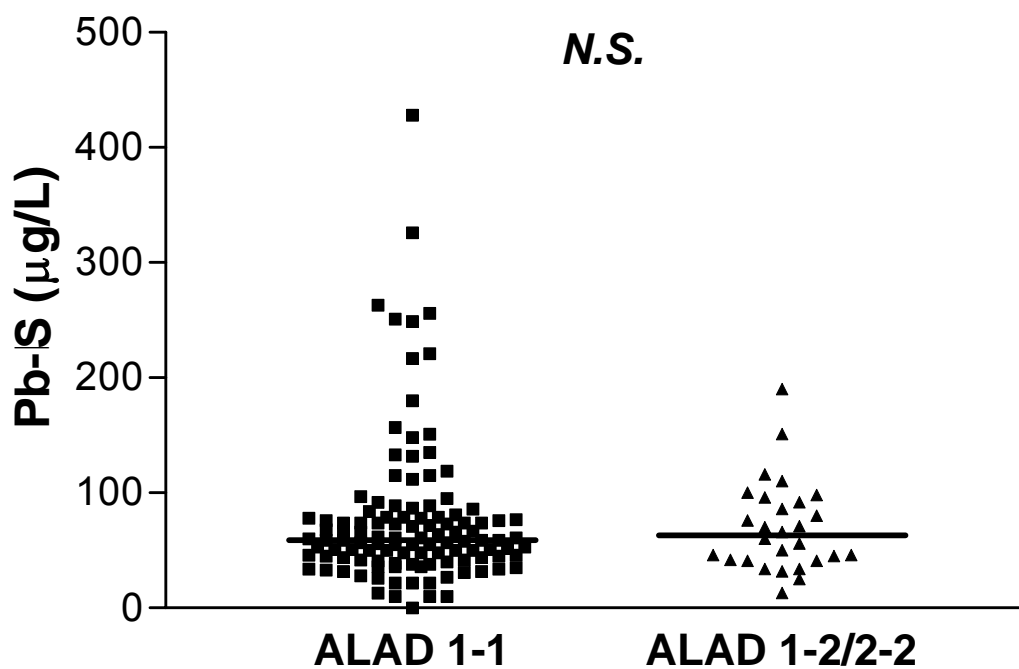


Figura 5 – Níveis de chumbo no sangue total em indivíduos com genótipo ALAD 1-1 e ALAD 1-2/2-2. As barras representam o valor da mediana. *N.S.* “teste *t*” (grupos de genótipos ALAD 1-1 *versus* ALAD 1-2/2-2).

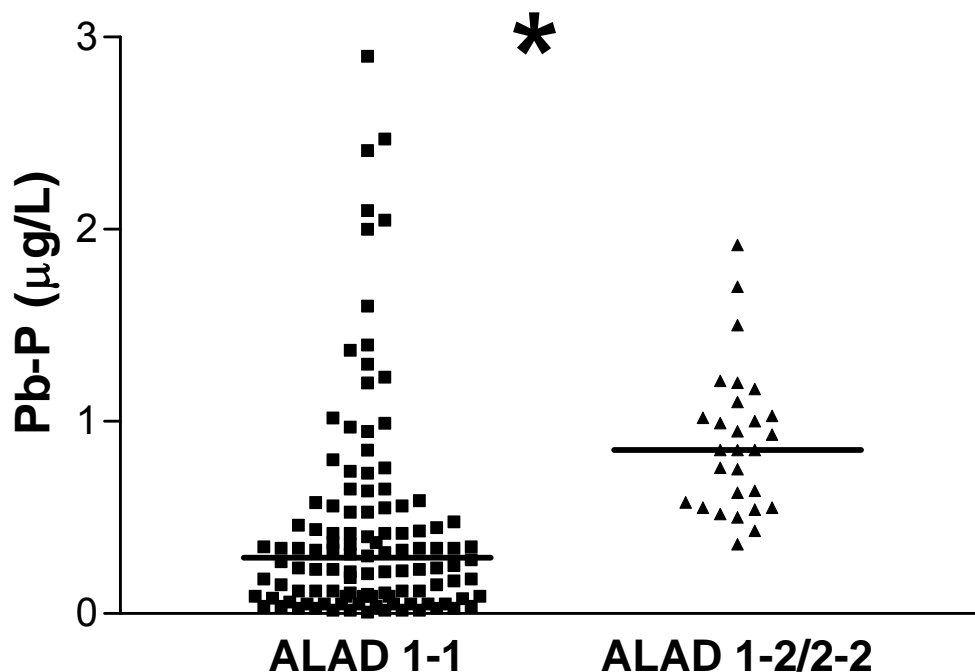


Figura 6 – Níveis de chumbo no plasma em indivíduos com genótipo ALAD 1-1 e ALAD 1-2/2-2. As barras representam o valor da mediana. * $P < 0,0001$ “teste *t*” (grupos de genótipos ALAD 1-1 *versus* ALAD 1-2/2-2).

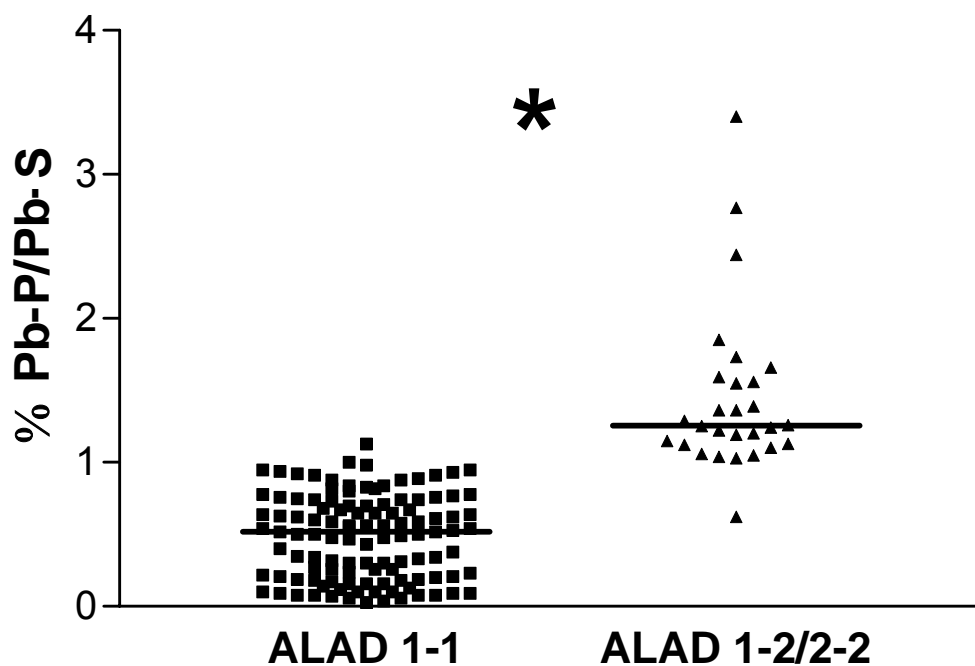


Figura 7 – Fração de Pb-P/Pb-S em indivíduos com genótipo ALAD 1-1 e ALAD 1-2/2-2. As barras representam o valor da mediana. * $P < 0,0001$ “teste t ” (grupos de genótipos ALAD 1-1 *versus* ALAD 1-2/2-2).

DISCUSSÃO

6 – Discussão

Considerando os dados atualmente disponíveis na literatura, este é o primeiro estudo a demonstrar uma influência significativa do polimorfismo G177C da ALAD em indivíduos expostos ambientalmente ao chumbo.

Neste estudo, nós não encontramos influências significantes do polimorfismo G177C da ALAD nos níveis de Pb - S. Este resultado confirma estudos anteriores que não encontraram influências do polimorfismo da G177C da ALAD nos níveis de Pb-S (26, 27, 43). Entretanto, alguns estudos têm sugerido que indivíduos com o alelo variante ALAD2 podem ter níveis de Pb-S mais elevados do que aqueles com alelo ALAD1, resultando em um aumento à suscetibilidade a toxicidade do chumbo (13, 21, 24, 63, 64).

Neste estudo, as concentrações de Pb-S dos participantes do estudo estavam entre 10 e 428 µg/L, e a média foi de $76,1 \pm 5,1$ µg/L, valores estes que estão relativamente abaixo dos níveis de referências atualmente aceito em vários países que é de 100 µg/L, assim refletindo uma baixa exposição ao chumbo. Conseqüentemente, nossos resultados apóiam a idéia que variantes genéticos da ALAD podem influenciar nos níveis de Pb-S apenas em altos níveis de exposição (27), quando os sítios de ligação da ALAD estão saturados.

Embora o sangue total seja o fluido primariamente utilizado para o diagnóstico de exposição ao chumbo, amplamente utilizado pela facilidade de coleta, muitos outros biomarcadores têm sido propostos. Por exemplo, o nível de Pb-P pode ser um índice mais relevante para avaliar exposição, distribuição e os riscos de saúde associados ao chumbo. Além disso, os efeitos tóxicos do chumbo são primariamente associados com Pb-P, o qual reflete mais rapidamente a fração liberada de chumbo na corrente sanguínea (41). Baseando-se nas observações anteriores de que ALAD2 liga-se com maior afinidade

ao chumbo do que ALAD1 (17), nós poderíamos esperar uma alta fração %Pb-P/Pb-S no grupo de genótipos ALAD 1-1 quando comparado com o grupo ALAD 1-1/1-2. Entretanto, nossos resultados não apóiam esta hipótese, pois neste estudo, nós encontramos uma alta fração %Pb-P/Pb-S nos indivíduos ALAD 1-2/2-2. Uma possível explicação para este achado é que o polimorfismo G177C da ALAD pode alterar a troca de chumbo entre o sangue e os ossos (43). Além disso, foi sugerido que o alelo ALAD2 diminui a captação de chumbo pela camada cortical dos ossos e aumenta a mobilização de chumbo nos ossos trabeculares, modificando significativamente a toxicinética do chumbo (43). Como o Pb-P e a fração %Pb-P/Pb-S parecem depender da liberação do chumbo dos estoques ósseos (8, 9, 46), é possível que o aumento da mobilização de chumbo nos ossos dos voluntários com alelo ALAD2 tenha aumentado os níveis de Pb-P bem como a fração %Pb-P/Pb-S nos indivíduos do grupo de genótipo ALAD 1-2/2-2.

Por outro lado, uma série de estudos têm defendido que o alelo ALAD2 aumenta os níveis de Pb-S. Por exemplo, um estudo realizado com 202 trabalhadores ocupacionalmente expostos ao chumbo demonstrou que indivíduos que possuíam duas cópias do alelo variante ALAD2 apresentavam altos níveis de chumbo no sangue (Pb-S) do que aqueles indivíduos com alelo ALAD1 (24). Para investigar esta possibilidade, Astrin e colaboradores (25) determinaram o genótipo de mais de 1000 indivíduos expostos ambientalmente ao chumbo. Estes pesquisadores encontraram níveis aumentados de chumbo no sangue de heterozigotos e homozigoto para o alelo ALAD2. Adicionalmente, a presença do alelo ALAD2 foi associado com 4 vezes maior capacidade de reter chumbo no sangue em níveis acima de 30 µg/dL. Por outro lado, somente 8% dos indivíduos com níveis de chumbo no sangue abaixo 30 µg/dL possuíam o alelo ALAD2. Estas evidências confirmam a hipótese de que indivíduos que possuem o alelo ALAD2 apresentam níveis aumentados de chumbo no sangue. Em um estudo subsequente, 202 trabalhadores e um

grupo de 1278 de crianças ocupacionalmente expostos ao chumbo foram avaliados quanto ao polimorfismo da ALAD e os níveis de chumbo no sangue (21). Indivíduos que possuíam uma ou duas cópias do alelo ALAD2 (ALAD 1-2/2-2) apresentaram níveis de chumbo no sangue entre 9 e 11 $\mu\text{g/dL}$ mais altos que aqueles indivíduos homozigotos para o alelo ALAD1 (ALAD 1-1). Este foi o primeiro grande estudo com uma evidência significativa demonstrando a forte associação entre polimorfismo da ALAD e os níveis de chumbo no sangue. Por outro lado, alguns estudos têm apontado mudanças nestas conclusões. Por exemplo, Smith e colaboradores realizaram um estudo com mais de 600 trabalhadores expostos ocupacionalmente a baixos níveis de chumbo (abaixo de 10 $\mu\text{g/dL}$). Em contraste direto com os estudos anteriormente citados, estes pesquisadores não encontraram diferenças significativas nos níveis de chumbo no sangue e ossos entre indivíduos com alelo ALAD2 quando comparados com indivíduos com alelo ALAD1 (26). Como citado anteriormente, estes pesquisadores acreditam que os efeitos de alelos variantes da ALAD só têm um papel relevante quando outros sítios de ligação do chumbo estão saturados. Conseqüentemente, a contribuição de variantes da ALAD no acúmulo de chumbo poderia ser observada somente com níveis altos de exposição (27). Posteriormente, foi proposto por estes investigadores que a hemoglobina A1 poderia ser um importante sítio de ligação do chumbo e que poderia influenciar no acúmulo biológico de deste (28). Entretanto, um estudo de ligação de chumbo a proteínas revelou que a ALAD apresenta alta afinidade pelo chumbo, enquanto nenhuma ligação de chumbo foi observada com a hemoglobina (17, 29). Estes estudos parecem ignorar fortes evidências demonstrando que a proteína ALAD é a mais importante para ligação do chumbo no sangue. Além disso, um estudo de ligação do chumbo a proteínas mostrou 84% do chumbo ligado a ALAD em voluntários ALAD 2-2, enquanto 81% do chumbo estava ligado a esta enzima em homozigotos ALAD 1-1 (17).

Para determinar se o polimorfismo da ALAD pode influenciar na excreção de chumbo, Schwartz e colaboradores estudou trabalhadores expostos ocupacionalmente com a concentração média de 25 µg/dL (30). Os voluntários receberam doses orais de um quelante oral (DMSA) utilizado no tratamento de intoxicação pelo chumbo. Os resultados mostraram que homozigotos ALAD 2-2 excretaram menos chumbo na urina em resposta ao tratamento com DMSA do que aqueles homozigotos ALAD 1-1 (30). É possível que a presença do alelo ALAD2 aumente a retenção de chumbo no sangue e diminua a quantidade de chumbo quelado excretado. Assim, o tratamento com DMSA não exerceria grandes efeitos em indivíduos com alelo ALAD2. Outro estudo demonstrou que o genótipo da ALAD também pode influenciar na função renal, o qual também pode afetar a excreção do chumbo (31). Em trabalhadores expostos a baixos níveis de chumbo, efeitos subclínicos nos rins foram mais evidentes em indivíduos heterozigotos (ALAD 1-2) do que em homozigotos ALAD 1-1 (26). Estes resultados podem estar diretamente relacionados com os níveis de Pb-P, pois estes estão diretamente disponíveis para se difundir aos órgãos-alvo. Os dados acima citados sugerem que o alelo ALAD2 pode aumentar o efeito deletério promovidos pela exposição ao chumbo.

Em resumo, nós encontramos uma fração %Pb-P/Pb-S aumentada em indivíduos com alelo variante ALAD2 quando comparados com voluntários com alelo ALAD1. Este estudo fornece novas informações a respeito de um fator genético possivelmente envolvido na suscetibilidade a toxicidade pelo chumbo. Embora neste estudo nós não tenhamos avaliado as conseqüências clínicas da exposição ao chumbo, uma implicação clínica importante de nossos resultados é que, provavelmente, voluntários com genótipo ALAD 1-2/2-2 possuam o risco de saúde aumentado associados com a exposição ao chumbo, não devido aos níveis de Pb-S, mas sim pelo aumento de Pb-P e na %Pb-P/Pb-S.

CONCLUSÃO

7 – Conclusão

Os dados apresentados nesta dissertação nos permitem concluir que:

O polimorfismo G177C da ALAD influencia nos níveis Pb-P e a fração %Pb-P/Pb-S de indivíduos ambientalmente expostos ao chumbo, uma vez que os voluntários com genótipo ALAD1-2/ALAD2-2 apresentaram níveis Pb-P e a fração %Pb-P/Pb-S aumentados, quando comparados com voluntários de genótipo ALAD1-1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 – Referências Bibliográficas

1. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Lead. Bull World Health Organ. 1975;Environmental Office of Occupational Health(Geneva).
2. Moreira FR, Moreira JC. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. Rev Panam Salud Publica 2004;15(2):119–29.
3. Tong S, Schirnding YEV, Prapamontol T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. Bull World Health Organ. 2000;78(9):1068-1077.
4. Onalaja AO, Claudio L. Genetic susceptibility to lead poisoning. Environ Health Perspect 2000;108(Suppl 1):23-8.
5. ATSDR. Toxicological Profile for Lead. Atlanta, Ga: US Department of Health and Human Services, Public Health Services. 1999.
6. Cheng Y, Schwartz J, Sparrow D, Aro A, Weiss ST, Hu H. Bone lead and blood lead levels in relation to baseline blood pressure and the prospective development of hypertension: the Normative Aging Study. Am J Epidemiol 2001;153(2):164-71.
7. Smith DR, Osterloh JD, Flegal AR. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton. Environ Health Perspect 1996;104(1):60-6.
8. Barbosa Jr F, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. Current needs and limitations on the use of biomarkers of internal dose to diagnose lead exposure. Environ Health Perspect 2005;113(12):1669-1674.
9. Cake KM, Bowins RJ, Vaillancourt C, Gordon CL, McNutt RH, Laporte R, et al. Partition of circulating lead between serum and red cells is different for internal and external sources of lead. Am J Ind Med 1996;29(5):440-5.

10. Sithisarankul P, Schwartz BS, Lee BK, Strickland PT. Urinary 5-aminolevulinic acid (ALA) adjusted by creatinine: a surrogate for plasma ALA? *J Occup Environ Med* 1998;40(10):901-6.
11. Sithisarankul P, Schwartz BS, Lee BK, Kelsey KT, Strickland PT. Aminolevulinic acid dehydratase genotype mediates plasma levels of the neurotoxin, 5-aminolevulinic acid, in lead-exposed workers. *Am J Ind Med* 1997;32(1):15-20.
12. Blumberg WE, Eisinger J, Lamola AA, Zuckerman DM. Principles and applications of hematofluorometry. *J Clin Lab Automation* 1984;4:29-42.
13. Astrin KH, Bishop DF, Wetmur JG, Kaul B, Davidow B, Desnick RJ. delta-Aminolevulinic acid dehydratase isozymes and lead toxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1987;514:23-9.
14. Tsukamoto I, Yoshinaga T, Sano S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. *Biochim Biophys Acta* 1979;570(1):167-78.
15. Tsukamoto I, Yoshinaga T, Sano S. Zinc and cysteine residues in the active site of bovine liver delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Int J Biochem* 1980;12(5-6):751-6.
16. Jaffe EK, Salowe SP, Chen NT, DeHaven PA. Porphobilinogen synthase modification with methylmethanethiosulfonate. A protocol for the investigation of metalloproteins. *J Biol Chem* 1984;259(8):5032-6.
17. Bergdahl IA, Grubb A, Schutz A, Desnick RJ, Wetmur JG, Sassa S, et al. Lead binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. *Pharmacol Toxicol* 1997;81(4):153-8.
18. Xie Y, Chiba M, Shinohara A, Watanabe H, Inaba Y. Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes. *Ind Health* 1998;36(3):234-9.

19. Petrucci R, Leonardi A, Battistuzzi G. The genetic polymorphism of delta-aminolevulinate dehydrase in Italy. *Hum Genet* 1982;60(3):289-90.
20. Wetmur JG, Bishop DF, Cantelmo C, Desnick RJ. Human delta-aminolevulinate dehydratase: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(20):7703-7.
21. Wetmur JG, Lehnert G, Desnick RJ. The delta-aminolevulinate dehydratase polymorphism: higher blood lead levels in lead workers and environmentally exposed children with the 1-2 and 2-2 isozymes. *Environ Res* 1991;56(2):109-19.
22. Montenegro MF, Barbosa Jr F, Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Ethnicity affects the distribution of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) genetic variants. *Clin Chim Acta* 2006;367(1-2):192-5.
23. Benkmann HG, Bogdanski P, Goedde HW. Polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in various populations. *Hum Hered* 1983;33(1):62-4.
24. Ziemsens B, Angerer J, Lehnert G, Benkmann HG, Goedde HW. Polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in lead-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1986;58(3):245-7.
25. Astrin KH, Kaya AH, Wetmur JG, Desnick RJ. RsaI polymorphism in the human delta-aminolevulinate dehydratase gene at 9q34. *Nucleic Acids Res* 1991;19(15):4307.
26. Smith CM, Wang X, Hu H, Kelsey KT. A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environ Health Perspect* 1995;103(3):248-53.
27. Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Ahn KD, Springer K, Kelsey K. Associations of delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype with plant, exposure duration, and blood lead and zinc protoporphyrin levels in Korean lead workers. *Am J Epidemiol* 1995;142(7):738-45.

28. Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Ahn KD, Kelsey K, Bressler J. Associations of subtypes of hemoglobin with delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and dimercaptosuccinic acid-chelatable lead levels. *Arch Environ Health* 1997;52(2):97-103.
29. Bergdahl IA, Sheveleva M, Schutz A, Artamonova VG, Skerfving S. Plasma and blood lead in humans: capacity-limited binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components. *Toxicol Sci* 1998;46(2):247-53.
30. Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Sithisarankul P, Strickland PT, Ahn KD, et al. delta-Aminolevulinic acid dehydratase genotype modifies four hour urinary lead excretion after oral administration of dimercaptosuccinic acid. *Occup Environ Med* 1997;54(4):241-6.
31. Bergdahl IA, Gerhardsson L, Schutz A, Desnick RJ, Wetmur JG, Skerfving S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: influence on lead levels and kidney function in humans. *Arch Environ Health* 1997;52(2):91-6.
32. Silbergeld EK, Lamon JM. Effects of altered porphyrin synthesis on brain neurochemistry. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1982;4(6):635-42.
33. Bellinger D, Hu H, Titlebaum L, Needleman HL. Attentional correlates of dentin and bone lead levels in adolescents. *Arch Environ Health* 1994;49(2):98-105.
34. Fleming DE, Chettle DR, Wetmur JG, Desnick RJ, Robin JP, Boulay D, et al. Effect of the delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on the accumulation of lead in bone and blood in lead smelter workers. *Environ Res* 1998;77(1):49-61.
35. Alexander BH, Checkoway H, Costa-Mallen P, Faustman EM, Woods JS, Kelsey KT, et al. Interaction of blood lead and delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype on markers of heme synthesis and sperm production in lead smelter workers. *Environ Health Perspect* 1998;106(4):213-6.
36. Silbergeld EK, Schwartz J, Mahaffey K. Lead and osteoporosis: mobilization of lead from bone in postmenopausal women. *Environ Res* 1988;47(1):79-94.

37. Gulson BL, Jameson CW, Mahaffey KR, Mizon KJ, Korsch MJ, Vimpani G. Pregnancy increases mobilization of lead from maternal skeleton. *J Lab Clin Med* 1997;130(1):51-62.
38. Gulson BL, Mahaffey KR, Jameson CW, Mizon KJ, Korsch MJ, Cameron MA, et al. Mobilization of lead from the skeleton during the postnatal period is larger than during pregnancy. *J Lab Clin Med* 1998;131(4):324-9.
39. Gulson BL, Pounds JG, Mushak P, Thomas BJ, Gray B, Korsch MJ. Estimation of cumulative lead releases (lead flux) from the maternal skeleton during pregnancy and lactation. *J Lab Clin Med* 1999;134(6):631-40.
40. Gulson BL, Gray B, Mahaffey KR, Jameson CW, Mizon KJ, Patison N, et al. Comparison of the rates of exchange of lead in the blood of newly born infants and their mothers with lead from their current environment. *J Lab Clin Med* 1999;133(2):171-8.
41. Schutz A, Bergdahl IA, Ekholm A, Skerfving S. Measurement by ICP-MS of lead in plasma and whole blood of lead workers and controls. *Occup Environ Med* 1996;53(11):736-40.
42. Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 1999;43(3):532-41.
43. Hu H, Wu MT, Cheng Y, Sparrow D, Weiss S, Kelsey K. The delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism and bone and blood lead levels in community-exposed men: the Normative Aging Study. *Environ Health Perspect* 2001;109(8):827-32.
44. Bergdahl IA, Vahter M, Counter SA, Schutz A, Buchanan LH, Ortega F, et al. Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children. *Environ Res* 1999;80(1):25-33.
45. Smith D, Hernandez-Avila M, Tellez-Rojo MM, Mercado A, Hu H. The relationship between lead in plasma and whole blood in women. *Environ Health Perspect* 2002;110(3):263-8.

46. Hernandez-Avila M, Smith D, Meneses F, Sanin LH, Hu H. The influence of bone and blood lead on plasma lead levels in environmentally exposed adults. *Environ Health Perspect* 1998;106(8):473-7.
47. Tellez-Rojo MM, Hernandez-Avila M, Gonzalez-Cossio T, Romieu I, Aro A, Palazuelos E, et al. Impact of breastfeeding on the mobilization of lead from bone. *Am J Epidemiol* 2002;155(5):420-8.
48. O'Flaherty EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. V. Lead absorption and disposition in childhood. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;131(2):297-308.
49. Fleming DE, Boulay D, Richard NS, Robin JP, Gordon CL, Webber CE, et al. Accumulated body burden and endogenous release of lead in employees of a lead smelter. *Environ Health Perspect* 1997;105(2):224-33.
50. Gulson BL, Mahaffey KR, Mizon KJ, Korsch MJ, Cameron MA, Vimpani G. Contribution of tissue lead to blood lead in adult female subjects based on stable lead isotope methods. *J Lab Clin Med* 1995;125(6):703-12.
51. Hirata M, Yoshida T, Miyajima K, Kosaka H, Tabuchi T. Correlation between lead in plasma and other indicators of lead exposure among lead-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1995;68(1):58-63.
52. Tsaih SW, Schwartz J, Lee ML, Amarasiriwardena C, Aro A, Sparrow D, et al. The independent contribution of bone and erythrocyte lead to urinary lead among middle-aged and elderly men: the normative aging study. *Environ Health Perspect* 1999;107(5):391-6.
53. Nashashibi N, Cardamakis E, Bolbos G, Tzingounis V. Investigation of kinetic of lead during pregnancy and lactation. *Gynecol Obstet Invest* 1999;48(3):158-62.
54. Hertz-Picciotto I, Schramm M, Watt-Morse M, Chantala K, Anderson J, Osterloh J. Patterns and determinants of blood lead during pregnancy. *Am J Epidemiol* 2000;152(9):829-37.

55. Rothenberg SJ, Kondrashov V, Manalo M, Manton WI, Khan F, Todd AC, et al. Seasonal variation in bone lead contribution to blood lead during pregnancy. *Environ Res* 2001;85(3):191-4.
56. Roberts JS, Silbergeld EK. Pregnancy, lactation, and menopause: how physiology and gender affect the toxicity of chemicals. *Mt Sinai J Med* 1995;62(5):343-55.
57. Hernandez-Avila M, Villalpando CG, Palazuelos E, Hu H, Villalpando ME, Martinez DR. Determinants of blood lead levels across the menopausal transition. *Arch Environ Health* 2000;55(5):355-60.
58. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
59. Zhou Y, Zanao RA, Barbosa F, Parsons PJ, Krug FJ. Investigations on a W-Rh permanent modifier for the detection of Pb in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta part B* 2002;57:1291-1300.
60. Ayres M, Ayres Jr M. *BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; 2003.
61. Kelada SN, Shelton E, Kaufmann RB, Khoury MJ. Delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2001;154(1):1-13.
62. Suzen HS, Duydu Y, Aydin A, Isimer A, Vural N. Influence of the delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism on biomarkers of lead exposure in Turkish storage battery manufacturing workers. *Am J Ind Med* 2003;43(2):165-71.
63. Perez-Bravo F, Ruz M, Moran-Jimenez MJ, Olivares M, Rebolledo A, Codoceo J, et al. Association between aminolevulinic acid dehydratase genotypes and blood lead levels in children from a lead-contaminated area in Antofagasta, Chile. *Arch Environ Contam Toxicol* 2004;47(2):276-80.

64. Shen XM, Wu SH, Yan CH, Zhao W, Ao LM, Zhang YW, et al. Delta-aminolevulinate dehydratase polymorphism and blood lead levels in Chinese children. *Environ Res* 2001;85(3):185-90.
65. Godwin HA. The biological chemistry of lead. *Curr Opin Chem Biol* 2001;5(2):223-7.

APÊNDICE

9 – Apêndice

Artigo publicado na revista *Archives of Toxicology*:

A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies plasma/whole blood lead ratio. (2006) 80:394–398

Marcelo F. Montenegro · Fernando Barbosa Jr
Valeria C. Sandrim · Raquel F. Gerlach
Jose E. Tanus-Santos

A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies plasma/whole blood lead ratio

Received: 1 November 2005 / Accepted: 18 November 2005 / Published online: 9 December 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract Delta aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) plays an important role in lead poisoning. This study was carried out to examine the effects of ALAD gene polymorphism (G177C) on %Pb-P(plasma lead)/Pb-B(whole blood) ratio in 142 subjects environmentally exposed to lead. Genotypes for the ALAD G177C polymorphism were determined by PCR and restriction fragment length digestion. Pb-P and Pb-B were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry and by graphite furnace atomic absorption spectrometry, respectively. The allele frequencies for ALAD1 and ALAD2 alleles were 0.897 and 0.103, respectively. We combined both ALAD 1-2 and ALAD 2-2 genotypes together (ALAD 1-2/2-2 group) and compared with the ALAD 1-1 genotype group. While no significant differences were found in Pb-B, subjects from the ALAD 1-2/2-2 genotype group presented significantly higher Pb-P concentrations and %Pb-P/Pb-B ratios (0.89 ± 0.07 µg/l, and $1.45 \pm 0.10\%$, respectively) when compared with subjects from the ALAD 1-1 genotype group (0.44 ± 0.05 µg/l, and 0.48 ± 0.02 , respectively; both $P < 0.0001$). The higher %Pb-P/Pb-B ratios in carriers of the ALAD-2 allele compared with noncarriers indicate that ALAD 1-2/2-2 subjects are probably at increased health risks associated with lead exposure.

Keywords ALAD polymorphism · Delta aminolevulinic acid dehydratase · Lead toxicology · Plasma lead · Whole blood lead · Plasma/whole blood lead ratio

Introduction

Delta aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) has been widely acknowledged to play an important role in the pathogenesis of lead poisoning (Bergdahl et al. 1997). The effects of lead on ALAD activity have become a subject of much recent interest because ALAD is involved in the synthesis of heme, and this enzyme is strongly inhibited by lead, thus resulting in accumulated aminolevulinic acid (ALA) in urine and plasma (Kelada et al. 2001). Adding biological complexity to the understanding of this interaction between lead and ALAD, Battistuzzi et al. (1981) showed that human ALAD is a polymorphic enzyme. Wetmur et al. (1991a) showed that this polymorphism results from a G-to-C transversion at position 177 (dbSNP ID: rs1800435) in the coding region of ALAD gene, thus leading to two alleles (ALAD1 and ALAD2) and three isozyme phenotypes, designated ALAD 1-1, ALAD 1-2, and ALAD 2-2. While this G-to-C transversion results in the substitution of asparagine for lysine at residue 59, nearly identical phenotypic enzyme activities were described for the three isozyme phenotypes (Battistuzzi et al. 1981). However, several studies have suggested that carriers of the ALAD2 allele, which is less common than the ALAD1 allele, would have higher blood lead concentrations than noncarriers, thereby increasing their susceptibility to lead toxicity (Astrin et al. 1987; Wetmur et al. 1991b; Ziemsen et al. 1986). While these previous findings suggest that this polymorphism may change lead transport, metabolism, and/or distribution in the body, it is not clear how this polymorphism affects lead toxicokinetics. In fact, some authors suggest that ALAD2 binds lead more tightly than ALAD1, thus leading to a stronger inactivation of ALAD, and increased risk of lead toxicity in ALAD2 carriers (Astrin

M. F. Montenegro · F. Barbosa Jr · V. C. Sandrim
J. E. Tanus-Santos (✉)
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil
E-mail: tanus@fmrp.usp.br
Tel.: +55-16-36023163
Fax: +55-16-36332301

F. Barbosa Jr
Department of Clinical, Toxicological and Food Science Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, Av. do Cafe s/n, 14040-903 Ribeirao Preto, SP, Brazil

R. F. Gerlach
Department of Morphology, Estomatology and Physiology, Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. do Cafe, S/N, 14040-904 Ribeirao Preto, SP, Brazil

et al. 1987; Wetmur et al. 1991b). Conversely, other groups suggest that the enhanced capacity of ALAD2 to bind lead may confer resistance to the harmful effects of this metal because subjects with ALAD2 may have less bioavailable lead due to more intense lead sequestration by ALAD2 polypeptide (Schwartz et al. 1995).

Models of lead kinetics typically assume a transport chain running through whole blood, with plasma lead concentration (Pb-P) governing lead distribution to the various tissues of interest, including bone (Barbosa et al. 2005). Because plasma lead concentration reflects the most rapidly exchangeable fraction of lead in the bloodstream, many groups have recently focused on the relationship between Pb-P with whole blood (Pb-B) levels to monitor exposure to lead in different populations (Bergdahl et al. 1999; Hernandez-Avila et al. 1998; Smith et al. 2002). While it is reasonable to assume that toxic effects of lead are better associated with Pb-P or with %Pb-P/Pb-B ratio than with Pb-B, previous studies were usually limited to a small number of subjects, and have not addressed other factors that might influence the %Pb-P/Pb-B ratio, such as ALAD polymorphism.

The aim of the present study was to evaluate the influence of ALAD G177C genetic polymorphism on Pb-P and on %Pb-P/Pb-B ratio in a population environmentally exposed to lead. We hypothesized that ALAD genetic polymorphism could affect %Pb-P/Pb-B ratio, which may provide valuable information on the release of lead storage from the skeleton back to the bloodstream.

Materials and methods

Materials

High purity de-ionized water (resistivity 18.2 mΩ cm) obtained by a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout. All reagents used were high purity analytical grade. All chemical solutions used for Pb determination were stored in high-density polypropylene bottles. Whole blood and plasma samples were stored in 2 ml tubes at -80°C . All tubes, plastic bottles, autosampler cups, and glassware materials were cleaned by soaking in 10% v/v HNO_3 for 24 h, rinsing five times with Milli-Q water, and dried in a class 100 laminar flow hood located inside the class 10000 clean room.

Subjects

This study was approved by our institutional review committee, and each subject provided written informed consent. We studied 142 volunteers (55 men and 87 women), aged from 18 to 60, living in the city of Bauru, State of Sao Paulo, Brazil. Most of them were environmentally exposed to lead, from air and soil, during

the running of a battery plant located near their workplace. Although the battery plant was closed in 2002, there is some evidence that part of this population is still exposed, indoor or outdoor, due to constant deposition of lead on soil and vegetation surrounding their houses.

Blood collection

Venous blood samples were collected from each volunteer after overnight (> 12 h) fasting in three separated fractions of 6 ml: two evacuated tubes containing lyophilized heparin (Vacutainer BD, trace metals free) for metal analysis, and one containing EDTA (Vacutainer BD) for hematological evaluations and genotypes. Before collection, the skin of the volunteer was cleaned with alcohol and Milli-Q water. The first blood fraction was used to determine the B-Pb content and the second was used to plasma collection.

Blood samples were immediately centrifuged (800g 6 min) to separate plasma from whole blood, thus avoiding transfer of lead from erythrocytes. Each plasma fraction was then pipetted into two ultra-cleaned eppendorf tubes (2 ml) and immediately frozen at -80°C until used for analysis.

Measurement of blood and plasma lead concentrations

Whole blood samples were analyzed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (Varian SpectrAA 220) following the method proposed by Zhou et al. (2002). Briefly, 100 μl of blood samples were diluted 1:10 with a solution containing 0.2% v/v HNO_3 0.5 Triton X-100. Then, 12 μl of the resulting samples were delivered into the graphite tube with graphite platforms previously coated with W-Rh permanent modifier. Calibration was performed against lead aqueous solutions. The method detection limit is 0.07 $\mu\text{g/l}$. To evaluate the accuracy of the results, NIST 955 whole blood Standard Reference Material and Blood Reference Materials produced by the New York State Department of Health as part of their Interlaboratory Program of Proficiency Testing were analyzed before and after ten ordinary samples.

Plasma samples were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Perkin Elmer 6100) following the method proposed by Schutz et al. (1996) with modifications (Barbosa et al. 2006). Briefly, 300 μl of plasma were diluted 1:10 with a solution containing ammonia (0.04 mol/l), ethylenediaminetetraacetic acid disodium (Na_2EDTA ; 200 mg/l), and Triton X-100 (100 mg/l). The detection limit for lead was 0.001 $\mu\text{g/l}$. Iron levels in plasma were also obtained by ICP-MS from each sample to check for hemolysis. Hemolyzed plasma samples were excluded from the final data.

To check the accuracy of the results, Serum Reference Materials produced by the New York State Department of Health as part of their Interlaboratory

Program for Proficiency Testing were analyzed before and after ten ordinary samples.

Genotype determination for the ALAD polymorphism

An assay based on polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism was used to determine the genotype of the ALAD gene, as described previously (Wetmur et al. 1991b). Briefly, genomic DNA (500 ng) was used as template. PCR was performed in a 25- μ l reaction volume containing 0.5 μ M of each primer (5'-AGACAGACATTAGCTCAGTA-3' and 5'GGCAAAGACCACGTCCATTC-3'), 200 μ M of each dNTP, 1 \times PCR buffer supplied by Invitrogen Corp (10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 50 mM KCl), 2.5 mM MgCl₂, and 2.5 U DNA Taq polymerase (Biosystems, Curitiba, Brazil). The running conditions were pre-denaturation at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 61°C for 30 s, and synthesis at 72°C for 1 min. Finally, extension was conducted at 72°C for 4 min. The amplified products were digested overnight with *Msp*I at 37°C, and the fragments were separated by electrophoresis in 8% polyacrylamide gel, and visualized by silver staining. Subjects with ALAD 1-1 genotype showed only a 582 bp fragment; subjects with ALAD 1-2 genotype showed fragments of 582 and 511 bp; subjects with ALAD 2-2 genotype showed only a 511 bp fragment.

Statistical analysis

The distribution of genotypes was assessed for deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium by using chi-squared test. Because of the relatively low frequency of the ALAD 2-2 genotype, we combined both ALAD 1-2 and ALAD 2-2 genotypes together (ALAD 1-2/2-2 group) and compared with the ALAD 2-2 genotype group. The genotype groups were evaluated for differ-

ences in demographic data, Pb-B, Pb-P, and %Pb-P/Pb-B ratio by Student's *t* test. Data were reported as the mean \pm SEM, and $P < 0.05$ was considered significant throughout.

Results

Our volunteers showed the following ALAD genotype distribution: 114 subjects with ALAD 1-1 genotype (80.29%), 27 with ALAD 1-2 genotype (19.01%), and only one subject with ALAD 2-2 genotype (0.7%). This distribution of genotypes for the ALAD polymorphism showed no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 0.66$). In addition, the allele frequencies for ALAD1 and ALAD2 alleles were 0.897 and 0.103, respectively. These results are similar to those previously reported in other populations (Astrin et al. 1987; Kelada et al. 2001; Suzen et al. 2003).

Table 1 summarizes the basic characteristics of the study subjects. There were no significant differences in age, hematological parameters, arterial blood pressure, smoking status, and mean Pb-B (Fig. 1a) between the genotype groups (all $P > 0.05$). However, subjects from the ALAD 1-2/2-2 genotype group presented significantly higher Pb-P concentrations and %Pb-P/Pb-B ratios (0.89 ± 0.07 μ g/l, and $1.45 \pm 0.10\%$, respectively) when compared with subjects from the ALAD 1-1 genotype group (0.44 ± 0.05 μ g/l, and 0.48 ± 0.02 , respectively; both $P < 0.0001$; Table 1 and Fig. 1b, c).

Discussion

To our knowledge, this is the first study describing significant effects of the ALAD G177C polymorphism on %Pb-P/Pb-B ratio in a large population environmentally exposed to lead.

In the present study, we found that the ALAD G177C polymorphism did not affect Pb-B concentrations. While

Table 1 Characteristics of study participants

Variable	Total (<i>n</i> = 142)	ALAD 1-1 (<i>n</i> = 114)	ALAD 1-2/2-2 (<i>n</i> = 28)	<i>P</i> value*
Age (years)	36.2 \pm 0.9	35.7 \pm 1.0	38.5 \pm 2.9	NS
Hemoglobin (g/dl)	14.1 \pm 0.1	14.0 \pm 1.2	14.3 \pm 1.3	NS
Red blood cells ($\times 10^9$ per μ l)	4.7 \pm 0.0	4.6 \pm 0.4	4.7 \pm 0.5	NS
Hematocrit (%)	42 \pm 0.3	42 \pm 4.0	42 \pm 4.4	NS
Diastolic blood pressure (mmHg)	75 \pm 1.0	74 \pm 1.2	79 \pm 1.9	NS
Pb-B (μ g/l)	76.1 \pm 5.1	77.5 \pm 6.1	70.1 \pm 7.4	NS
Pb-P (μ g/l)	0.55 \pm 0.04	0.44 \pm 0.05	0.89 \pm 0.07	< 0.0001
Pb-P/Pb-B ratio (%)	0.67 \pm 0.04	0.48 \pm 0.02	1.45 \pm 0.10	< 0.0001
Never smoker (%)	80.2	80.6	79.5	NS
Current smoker (%)	19.3	19.4	20.5	NS

NS nonsignificant

**t* test. Data are reported as the mean \pm SEM

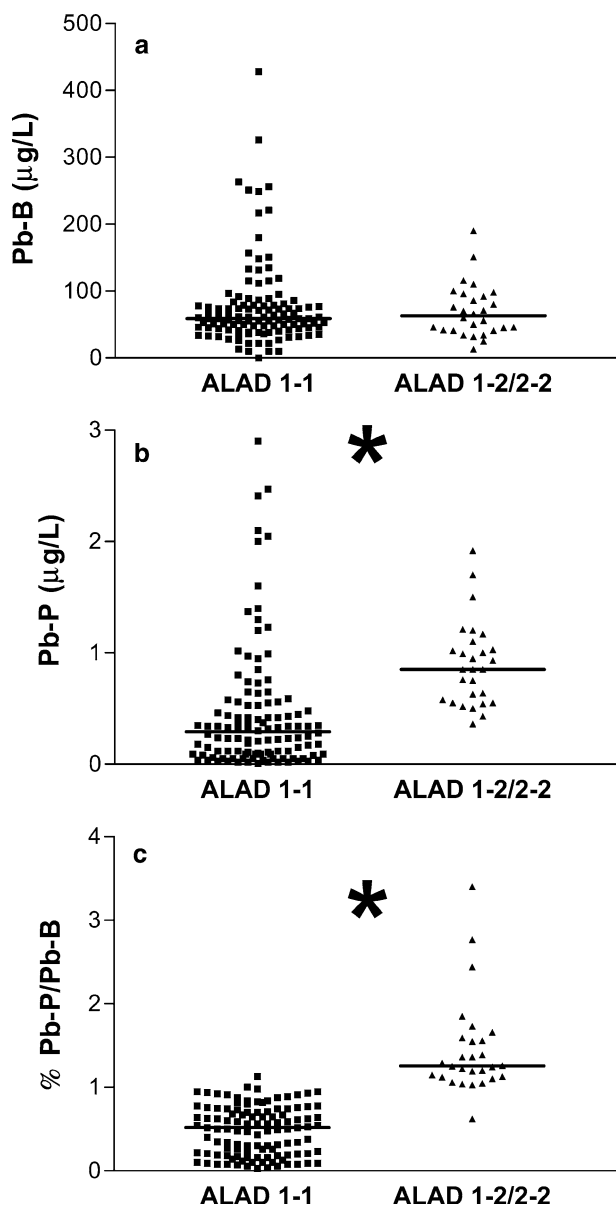


Fig. 1 Whole blood lead (Pb-B; *panel A*), plasma lead (Pb-P; *panel B*), and %Pb-P/Pb-B ratios (*panel C*) in ALAD 1-1 and in ALAD 1-2/2-2 genotype groups. The *bar* shows the median value. * $P < 0.0001$ by *t* test (ALAD 1-1 vs. ALAD 1-2/2-2 genotype groups)

this result confirms previous findings showing no effects of the ALAD G177C polymorphism on Pb-B concentrations (Hu et al. 2001; Schwartz et al. 1995; Smith et al. 1995), other studies have suggested that carriers of the ALAD-2 allele would have higher Pb-B concentrations than noncarriers, thereby increasing their susceptibility to lead toxicity (Astrin et al. 1987; Perez-Bravo et al. 2004; Shen et al. 2001; Wetmur et al. 1991b; Ziemsen et al. 1986). In the present study, Pb-B concentrations varied from 10 to 428 $\mu\text{g/l}$, and the mean Pb-B was $76.1 \pm 5.1 \mu\text{g/l}$, which is barely below the normal

reference level currently set at 100 $\mu\text{g/l}$, thus reflecting a relatively low exposure to lead. Therefore, our results support the notion that ALAD variants would significantly affect Pb-B only at high exposure levels, when other lead binding sites have been saturated (Schwartz et al. 1995).

Importantly, while whole blood has been the primary fluid to diagnose lead exposure, largely because blood lead sampling is recognized as a relatively easy procedure, many other biomarkers of internal dose for lead have been proposed. For example, Pb-P may be a more relevant index of exposure, distribution, and health risks associated with lead. Indeed, the toxic effects of lead are primarily associated with Pb-P, which reflects the most rapidly exchangeable fraction of lead in the bloodstream (Schutz et al. 1996). Based on previous observations that lead binds to ALAD-2 more tightly than to ALAD-1 (Bergdahl et al. 1997), we would expect higher %Pb-P/Pb-B ratios in ALAD 1-1 than in ALAD 1-2/2-2 genotype group. Interestingly, our results do not support this idea because we found higher %Pb-P/Pb-B ratios in ALAD 1-2/2-2 subjects. One possible explanation for this finding is that ALAD G177C polymorphism may alter the exchange of lead between blood and bone (Hu et al. 2001). Indeed, the ALAD-2 allele was suggested to decrease lead uptake into cortical bone and to increase the mobilization of lead from trabecular bone, thereby significantly modifying lead kinetics (Hu et al. 2001). Because Pb-P and %Pb-P/Pb-B ratio have been shown to depend on the release of lead from bone (Barbosa et al. 2005; Cake et al. 1996; Hernandez-Avila et al. 1998), it is possible that an enhanced mobilization of lead from bone in ALAD-2 carriers may have increased Pb-P and %Pb-P/Pb-B ratios in subjects from the ALAD 1-2/2-2 genotype group in the present study. Giving further support to our findings, Fleming et al. (1998) have previously shown that elevated serum lead levels in 70 lead smelter workers expressing the ALAD-2 allele. These findings were associated with decreased transfer of blood lead into bone in carriers of the ALAD-2 allele, and strongly suggest that the ALAD G177C genetic polymorphism affect lead metabolism and lead delivery to target organs (Fleming et al. 1998).

In conclusion, we found higher %Pb-P/Pb-B ratios in carriers of the ALAD-2 allele compared with noncarriers. The present study provides new information regarding a genetic factor possibly involved in the differential susceptibility to lead toxicity. Although we have not assessed the clinical consequences of lead exposure in the present study, a major implication of our findings is that ALAD 1-2/2-2 subjects are probably at increased health risks associated with lead exposure.

Acknowledgments This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento e Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Astrin KH, Bishop DF, Wetmur JG, Kaul B, Davidow B, Desnick RJ (1987) delta-Aminolevulinic acid dehydratase isozymes and lead toxicity. *Ann NY Acad Sci* 514:23–29
- Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ (2005) Current needs and limitations on the use of biomarkers of internal dose to diagnose lead exposure. *Environ Health Perspect* 113:1669–1674
- Barbosa F Jr, Sandrim VC, Uzuelli JA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2006) eNOS genotype-dependent correlation between whole blood lead and plasma nitric oxide products concentrations. *Nitric Oxide* (in press)
- Battistuzzi G, Petrucci R, Silvagni L, Urbani FR, Caiola S (1981) delta-Aminolevulinic acid dehydratase: a new genetic polymorphism in man. *Ann Hum Genet* 45:223–229
- Bergdahl IA, Grubb A, Schutz A, Desnick RJ, Wetmur JG, Sassa S, Skerfving S (1997) Lead binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. *Pharmacol Toxicol* 81:153–158
- Bergdahl IA, Vahter M, Counter SA, Schutz A, Buchanan LH, Ortega F, Laurell G, Skerfving S (1999) Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children. *Environ Res* 80:25–33
- Cake KM, Bowins RJ, Vaillancourt C, Gordon CL, McNutt RH, Laporte R, Webber CE, Chettle DR (1996) Partition of circulating lead between serum and red cells is different for internal and external sources of lead. *Am J Ind Med* 29:440–445
- Fleming DE, Chettle DR, Wetmur JG, Desnick RJ, Robin JP, Boulay D, Richard NS, Gordon CL, Webber CE (1998) Effect of the delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on the accumulation of lead in bone and blood in lead smelter workers. *Environ Res* 77:49–61
- Hernandez-Avila M, Smith D, Meneses F, Sanin LH, Hu H (1998) The influence of bone and blood lead on plasma lead levels in environmentally exposed adults. *Environ Health Perspect* 106:473–477
- Hu H, Wu MT, Cheng Y, Sparrow D, Weiss S, Kelsey K (2001) The delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism and bone and blood lead levels in community-exposed men: the Normative Aging Study. *Environ Health Perspect* 109:827–832
- Kelada SN, Shelton E, Kaufmann RB, Khoury MJ (2001) Delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 154:1–13
- Perez-Bravo F, Ruz M, Moran-Jimenez MJ, Olivares M, Rebolledo A, Codoceo J, Sepulveda V, Jenkin A, Santos JL, Fontanellas A (2004) Association between aminolevulinic acid dehydratase genotypes and blood lead levels in children from a lead-contaminated area in Antofagasta, Chile. *Arch Environ Contam Toxicol* 47:276–280
- Schutz A, Bergdahl IA, Ekholm A, Skerfving S (1996) Measurement by ICP-MS of lead in plasma and whole blood of lead workers and controls. *Occup Environ Med* 53:736–740
- Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Ahn KD, Springer K, Kelsey K (1995) Associations of delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype with plant, exposure duration, and blood lead and zinc protoporphyrin levels in Korean lead workers. *Am J Epidemiol* 142:738–745
- Shen XM, Wu SH, Yan CH, Zhao W, Ao LM, Zhang YW, He JM, Ying JM, Li RQ, Wu SM, Guo D (2001) Delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism and blood lead levels in Chinese children. *Environ Res* 85:185–190
- Smith CM, Wang X, Hu H, Kelsey KT (1995) A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environ Health Perspect* 103:248–253
- Smith D, Hernandez-Avila M, Tellez-Rojo MM, Mercado A, Hu H (2002) The relationship between lead in plasma and whole blood in women. *Environ Health Perspect* 110:263–268
- Suzen HS, Duydu Y, Aydin A, Isimer A, Vural N (2003) Influence of the delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism on biomarkers of lead exposure in Turkish storage battery manufacturing workers. *Am J Ind Med* 43:165–171
- Wetmur JG, Kaya AH, Plewinska M, Desnick RJ (1991a) Molecular characterization of the human delta-aminolevulinic acid dehydratase 2 (ALAD2) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. *Am J Hum Genet* 49:757–763
- Wetmur JG, Lehnert G, Desnick RJ (1991b) The delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: higher blood lead levels in lead workers and environmentally exposed children with the 1–2 and 2–2 isozymes. *Environ Res* 56:109–119
- Zhou Y, Zanao RA, Barbosa F, Parsons PJ, Krug FJ (2002) Investigations on a W-Rh permanent modifier for the detection of Pb in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B* 57:1291–1300
- Ziensen B, Angerer J, Lehnert G, Benkmann HG, Goedde HW (1986) Polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in lead-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 58:245–247

ANEXOS

10 – Anexos

1. Termo de consentimento livre e esclarecido.
2. Documento de aprovação do comitê de ética em pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Importância de fatores genéticos na intoxicação ambiental pelo chumbo”

Responsáveis:

- Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (FMRP-USP) – CREMESP 84.966
- Prof.a Dra. Marília Buzalaf (FOB-USP)
- Dr. Fernando Barbosa Júnior

Eu, _____, abaixo assinado, declaro que em ____/____/____ fui devidamente informado em detalhes pelo pesquisador responsável no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como à indenização quanto por danos decorrentes da pesquisa. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram asseguradas, a seguir relacionados:

1) Este projeto pretende basicamente estudar alguns marcadores genéticos e bioquímicos que possam modificar as concentrações de chumbo no seu sangue, bem como produzir algumas alterações bioquímicas no seu organismo. Isto poderá nos auxiliar no entendimento de como a intoxicação ambiental por chumbo afeta as diversas funções no nosso organismo. Detalhando, pretendemos estudar uma série de tais marcadores bioquímicos no seu plasma (a parte líquida do seu sangue), bem como alguns marcadores genéticos, determinados a partir da extração de DNA dos seus glóbulos brancos (leucócitos) do seu sangue.

Assim, estudaremos marcadores bioquímicos no seu plasma tais como a atividade de enzimas chamadas de metaloproteinases, as concentrações de nitritos e nitratos, homocisteína, radicais livres, além de quantificarmos as concentrações de chumbo no seu sangue total e no seu plasma.

Dentre os genes que pretendemos estudar, incluímos os genes que podem afetar as concentrações de chumbo no seu organismo, tais como o gene para o receptor da vitamina D, o gene da enzima chama delta-ala (desidrogenase do ácido amino-levulínico), bem como os genes de enzimas que podem ser afetadas pelo chumbo (os nomes destas enzimas são: sintetases do óxido nítrico, as metaloproteinases, superóxido dismutases, glutatona peroxidases, NADPH oxidases, ligase glutamato-cisteína, metileno-tetra-hidrofolato redutase). A intoxicação por chumbo pode afetar estas enzimas que são responsáveis pelo controle das substâncias mencionadas acima.

2) Sua participação neste estudo será:

Serão retirados, no máximo, 20 mL do seu sangue, coletados por punção venosa utilizando técnica adequada. Este sangue será utilizado para realizar todas os estudos bioquímicos e genéticos mencionados acima. Com isto, encerra-se a sua participação neste estudo.

3) Você terá direito a ressarcimento financeiro caso haja gastos gerados exclusivamente pela sua participação como voluntário desta pesquisa.

4) Caso haja dano comprovadamente decorrente da pesquisa você terá direito à indenização.

5) NÓS NÃO PODEMOS E NÃO GARANTIREMOS QUE VOCÊ RECEBERÁ QUALQUER BENEFÍCIO DIRETO DESTE ESTUDO.

6) Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente em revistas científicas, não revelará a sua identidade. Entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e identidade dos voluntários nela envolvidos.

7) Você pode retirar o seu consentimento para participar deste estudo a qualquer momento, inclusive sem justificativas e sem qualquer prejuízo para você.

8) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que será submetido. Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida à Dra. Marília Buzalaf (telefone 014-3235-8346) do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB), ou ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (telefone 016-602-3163), do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), ou ao Dr. Fernando Barbosa Junior (telefone 016-602-3163), do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP é 016-602-2228.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade de participar do referido projeto.

Bauru , _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Assinatura do investigador/testemunha



CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 24 de novembro de 2004

Ofício nº 3233/2004
CEP/SPC

Senhor Professor:

O trabalho intitulado
**“IMPORTÂNCIA DE FATORES GENÉTICOS NA INTOXICAÇÃO
AMBIENTAL PELO CHUMBO”** foi analisado pelo Comitê de Ética em
Pesquisa em sua 193ª Reunião Ordinária realizada em 22.11.2004, e
enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo
HCRP nº 10314/2004.

Aproveito a oportunidade para
apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS
Depto. de Farmacologia – FMRP-USP
Em mãos

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)