

VANIA BRAGHINI DE REZENDE

**“MODULAÇÃO TOXICOGENÉTICA DAS
CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS E PLASMÁTICAS
DE CHUMBO POR HAPLÓTIPOS DO RECEPTOR
DA VITAMINA D”**

CAMPINAS

2007

VANIA BRAGHINI DE REZENDE

**“MODULAÇÃO TOXICOGENÉTICA DAS
CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS E PLASMÁTICAS
DE CHUMBO POR HAPLÓTIPOS DO RECEPTOR
DA VITAMINA D”**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Farmacologia*

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R339m Rezende, Vânia Braghini de
“ Modulação toxicogenética das concentrações sanguíneas e plasmáticas de chumbo por haplótipos do receptor da vitamina D” / Vânia Braghini de Rezende. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : José Eduardo Tanus dos Santos
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Polimorfismo (Genética). 2. Chumbo. 3. Vitamina D. I. Santos, José Eduardo Tanus dos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Haplotypes of vitamin D modulate the circulating levels of lead in exposed subjects

Keywords: • Polymorphism (Genetic)
• Lead
• Vitamin D

Titulação: Mestre em Farmacologia

**Banca examinadora: Prof Dr José Eduardo Tanus dos Santos
Prof Dr Gilberto de Nucci
Profa. Dra. Éster Silveira Ramos**

Data da defesa: 13 - 07 - 2007



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Membros:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Handwritten signatures in blue ink are present next to the names of the members. The signature for Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos is at the top, followed by the signature for Prof. Dr. Gilberto de Nucci, and the signature for Profa. Dra. Ester Silveira Ramos at the bottom, which includes the initials "ES" and a flourish.

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 13/07/2007

DEDICATÓRIA

*Ao meu querido filho Rafael e meu esposo Paulo,
pela força e paciência durante minhas presenças
ausentes como mãe e esposa.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Eduardo Tanus dos Santos, pela paciência e iluminação de mestre e pelas discussões proveitosas sobre ciência e sobre a vida.

Ao professor e amigo Doutor Fernando Barbosa pela orientação e dedicação sem os quais o projeto não seria possível.

Aos meus colegas do laboratório de Farmacologia da USP de Ribeirão Preto, que tão bem me acolheram, em especial, Caroline, Elen, Ingrid, Michele e Sabrina.

Ao professor Doutor Edson Antunes, pela atenção e auxílio junto a coordenação da Pós-Graduação da Farmacologia - UNICAMP.

Ao Wanderlei, do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, pelos inúmeros auxílios durante todo o mestrado.

Aos voluntários que aceitaram participar desse estudo, sem os quais este projeto não existiria.

Aos meus queridos irmãos Flávio, Fernando, Márcio e Gustavo pelo incentivo, apoio e principalmente, pela amizade eterna.

E, aos meus pais Francisco e Luna, tão queridos e sempre presentes em minha caminhada, sem dúvida, meus eternos alicerces.

*Aquele que conhece os outros é sábio
Aquele que conhece a si mesmo é iluminado
Aquele que vence os outros é forte
Aquele que vence a si mesmo é poderoso
Aquele que conhece alegria é rico
Aquele que conserva o seu caminho tem vontade*

*Seja humilde e permanecerás íntegro
curva-te e permanecerás ereto
Esvazia-te e permanecerás repleto
Gasta-te e permanecerás novo*

*O sábio não se exhibe e por isso brilha
Ele não se faz notar e por isso é notado
Ele não se elogia e por isso tem mérito
E, porque não está competindo, ninguém no
mundo pode competir com ele.*

Lao Tsé - Tao Te Ching

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>ix</i>
ABSTRACT	<i>xi</i>
1- INTRODUÇÃO	13
1.1-Toxicocinética do chumbo	15
1.2- Sítio de armazenamento: Ossos	16
1.3- Importância das concentrações de chumbo no plasma sanguíneo (Pb-P) e da fração plasma/sangue total (%Pb-P/Pb-S)	17
1.4- Receptor da Vitamina D (VDR) e o remodelamento ósseo	18
1.5- Importância da análise dos polimorfismos	19
1.6- Polimorfismos VDR e toxicocinética do Pb	21
2- OBJETIVOS	22
3- CAPÍTULO	24
4- DISCUSSÃO	46
5- CONCLUSÃO	51
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
7- ANEXOS	59
Parecer do comitê de ética.....	60
Termo de consentimento livre e esclarecido.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

VDR	Receptor da Vitamina D (proteína)
VDR	Receptor da Vitamina D (gene)
Pb-P	Chumbo no Plasma
Pb-S	Chumbo no Sangue Total
%Pb-P/Pb-S	fração de chumbo no plasma/chumbo no sangue total
BsmI	endonuclease cujo sítio de restrição é 3'-CTTAC'GN-5'
Apal	endonuclease cujo sítio de restrição é 5'-GGGCC'C-3'
FokI	endonuclease cujo sítio de restrição é 3'-CCTAC`N-5'
ICP-MS	Espectometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
EPM	Erro Padrão da Média
n	número. Refere-se ao número amostral de uma população ou ao número de indivíduos retirados de uma determinada população e inclusos em um grupo de estudo para análises estatísticas
NS	Não Significativo
P <0,05	valor de probabilidade < 0,05 estatisticamente significativo
L	Litro
Taq	Polimerase termo-estável, isolada da bactéria <i>Thermophilus aquaticus</i>
C	Citosina
T	Timina
G	Guanina
A	Adenina

RESUMO



O receptor da vitamina D (VDR) possui um importante papel na toxicidade do chumbo (Pb). Poucos trabalhos avaliaram o efeito dos polimorfismos *VDR* sobre as concentrações circulantes do metal em populações expostas ambientalmente. Além disso, nenhum estudo avaliou o efeito da combinação desses polimorfismos (haplótipos) sobre os mesmos parâmetros. A análise de haplótipos (combinação de marcadores genéticos dentro de uma determinada região no cromossomo) tem demonstrado ser uma melhor ferramenta em comparação com a análise de polimorfismos (SNPs) vistos isoladamente. Nesse estudo, avaliamos o efeito dos haplótipos estimados a partir dos polimorfismos *BsmI*, *ApaI* e *FokI* do *VDR* sobre os níveis de Pb-S (chumbo no sangue), Pb-P (chumbo no plasma) e na fração %Pb-P/Pb-S (chumbo no plasma/chumbo no sangue) em 150 voluntários expostos ambientalmente ao chumbo (65 homens e 85 mulheres; idade: 18 a 57 anos). Os genótipos para todos os polimorfismos do *VDR* foram determinados por PCR seguido por digestão com enzimas de restrição (RFLP). 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. Os resultados mostraram que os polimorfismos do *VDR* estão associados às concentrações de Pb circulantes e que o haplótipo H8, formado pelos alelos a, b e f, está associado com menores concentrações de Pb-S, Pb-P e %Pb-P/Pb-S. Estes achados podem apresentar importantes implicações toxicogenéticas, sendo necessários estudos posteriores para elucidar os mecanismos responsáveis por tais efeitos.

ABSTRACT



The Vitamin D Receptor (VDR) plays an important role in the toxicity of lead (Pb). Genetic factors, i.e polymorphisms, influence blood lead (Pb-B) concentrations in lead exposed subjects. However, only a few research studies have evaluated the effect of VDR polymorphism on the lead concentration in environmentally. Also, no studies have evaluated the combinatorial effect of these polymorphisms on the same parameters. The haplotype analysis (combination of genetic indicators in a certain region of the chromosome) has been shown to be a better tool if compared with the analyses of single polymorphisms. This study aimed at examining the combined effects (haplotype analysis) of three polymorphisms (*BsmI*, *ApaI* and *FokI*) in vitamin D receptor (*VDR*) gene on Pb-B and on the concentrations of lead in plasma (Pb-P), which is more relevant to lead toxicity, in 150 environmentally exposed subjects (65 mens and 85 women). Genotypes were determined by RFLP, and Pb-P and Pb-B were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry and by graphite furnace atomic absorption spectrometry, respectively. Subjects with the bb (*BsmI*) or ff (*FokI*) genotypes have lower B-Pb than subjects in the other genotype groups. Subjects with the aa (*ApaI*) or ff genotypes have lower P-Pb than subjects in the other genotype groups. Lower Pb-P, Pb-B, and %Pb-P/Pb-B levels were found in subjects with the haplotype combining the a, b, and f alleles for the *ApaI*, *BsmI*, and *FokI* polymorphisms, respectively, compared with the other haplotype groups. These findings may have important toxicogenetic implications and their molecular basis needs to be addressed in further studies.

1- INTRODUÇÃO

O chumbo (Pb) é um metal pesado, não essencial, encontrado no meio ambiente como contaminante. Os homens foram expostos desde as formas mais primitivas de trabalho, pois a facilidade de extração e sua maleabilidade possibilitavam seu manuseio. Sendo assim, os relatos sobre intoxicações também têm origens remotas (Steinbock 1979). 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, onde se supõe que estes povos aqueciam os minérios de chumbo com fogueiras que queimavam madeira e carvão, para extrair o elemento (Steinbock 1979; Woolley 1984). Desde 3000 a.C., há evidências de que os chineses o extraíam da natureza e o utilizavam na fabricação de armas e utensílios domésticos, e de que, em 2000 a.C os fenícios tinham explorações próximas a depósitos na Espanha. No século V a.C. os romanos fizeram uma exploração extensiva dos depósitos de chumbo em toda a Península Ibérica, e o metal foi amplamente utilizado na época do Império (Gidlow 2004). A presença de Pb, tanto nas soldas dos encanamentos, como nos recipientes onde se fabricavam e armazenavam o vinho, culminava na contaminação da água consumida pela população, e do vinho consumido pelos grande imperadores da época (Woolley 1984).

A concentração do metal no meio ambiente cresceu de forma alarmante com o advento da Revolução Industrial (Woolley 1984). A introdução de compostos orgânicos (chumbo tetraetila) como aditivo da gasolina também contribuiu para o aumento da concentração no meio ambiente. Porém, no final da década de 70, o Brasil investiu na tentativa de diminuir a importação de combustíveis, o que deu início à fase de substituição do chumbo da gasolina pelo álcool etílico, com o programa Proálcool (de Freitas, De Capitani et al. 2007). Além de englobar políticas energéticas, industriais e sociais, esse programa também atingiu o âmbito ambiental, por levar a uma redução do Pb emitido pela combustão dos combustíveis. Medidas como esta levaram a uma redução das altas concentrações de Pb no organismo humano. Um dos resultados desses esforços foi a diminuição de até 77% a concentração do metal no sangue de crianças nascidas entre 1976 e 1991 (Patrick 2006). No entanto, a intoxicação pelo Pb ainda é problema de saúde pública. Sua utilização em processos industriais como revestimentos de cabos elétricos, chapas para pias, cisternas e telhados e na indústria de acumuladores é bem atual (Patrick 2006). Nos países desenvolvidos a exposição ambiental é geralmente bem

controlada, o que não ocorre nos países em desenvolvimento como o Brasil, onde alguns casos de intoxicação pelo metal são bem conhecidos. Entre 1960 e 1993 uma fundição de chumbo poluiu a cidade de Santo Amaro da Purificação, no estado da Bahia, contaminando os trabalhadores, seus filhos e moradores de regiões próximas à usina (Carvalho, Tavares et al. 1984; Carvalho, Silvany-Neto et al. 1985). Em 2002, na cidade de Bauru, estado de São Paulo, houve a interdição de uma indústria de acumuladores, em função da emissão de partículas de chumbo para o meio ambiente acima do permitido segundo normas da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (de Freitas, De Capitani et al. 2007). A partir da localização desta fábrica, instalada desde 1958 em área periférica do município, foram detectados dejetos contendo sal de óxido de chumbo e sulfato de chumbo presentes na poeira e a deposição de chumbo metálico no solo. Com isso, centenas de adultos e crianças foram contaminadas (de Freitas, De Capitani et al. 2007).

Sendo completamente estranho ao organismo humano, esse metal possui vários alvos no organismo podendo atingir até mesmo o sistema nervoso central (Murata, Araki et al. 1993). Clinicamente, o Pb em adultos está relacionado à hipertensão (Cheng, Schwartz et al. 2001) (Staessen, Bulpitt et al. 1994) e danos renais (Loghman-Adham 1997). Muitos desses efeitos são atribuídos a alterações enzimáticas e à habilidade de, mesmo em pequenas doses, competir com o cálcio, inibindo sua entrada nas células (Simons 1993). Além disso, há a necessidade de determinar os níveis de exposição aos quais os efeitos adversos ocorrem. Embora diversos estudos tenham sido informativos, seus valores podem ser limitados, pois fatores como sexo, estado nutricional e fatores genéticos podem influenciar na contaminação pelo metal.

1.1- Toxicocinética do chumbo

Estudos sobre a cinética do Pb têm sido realizados com a finalidade de compreender os efeitos tóxicos desse metal, além disso, o uso de técnicas analíticas mais sensíveis auxiliam nessas pesquisas (Schutz, Bergdahl et al. 1996). Sabe-se que as principais vias de absorção do Pb são a gastrointestinal e respiratória. Uma vez absorvido

99% do metal permanece ligado aos eritrócitos por aproximadamente 30-35 dias e num prazo de 4 a 6 semanas estará disperso nos tecidos moles como o fígado, rins, pulmão e sistema nervoso. A fração disponível para atravessar as barreiras biológicas é a fração plasmática do metal, sendo apenas 1% do que foi absorvido (Rabinowitz 1991). O Pb é um cátion bivalente e possui raio atômico semelhante ao do cálcio. Considerando que os ossos são constituídos por uma porcentagem significativa de cálcio, cerca de 70% sob a forma de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, o Pb consegue competir e deslocá-lo dessa estrutura, constituindo a fração de Pb nos ossos (Rabinowitz 1991). Dessa maneira, os ossos e dentes são os principais sítios de armazenamento, chegando a constituir 90% do metal do organismo (Pounds, Long et al. 1991; Rabinowitz 1991).

1.2- Sítio de armazenamento: Ossos

Muitos aspectos da cinética do Pb nos ossos ainda não estão esclarecidos, mas sabe-se que o chumbo no osso é considerado tão importante quanto às influências da exposição exógena para o comportamento toxicocinético deste metal (Rabinowitz 1991). O osso é um tecido dinâmico sob constante remodelamento ao longo da vida. Sendo assim, o Pb presente em sua estrutura pode retornar ao plasma aumentando a fração disponível para atravessar as barreiras biológicas (Hu, Rabinowitz et al. 1998).

Inúmeros estudos têm fornecido evidências de que a mobilização de Pb dos ossos para o sangue é maior durante os períodos de intenso remodelamento ósseo como durante a gravidez, lactação e menopausa (Silbergeld, Schwartz et al. 1988; Roberts and Silbergeld 1995; Rothenberg, Kondrashov et al. 2001) . Além disso, estudos mais recentes têm considerado que fatores genéticos influenciam o processo de remodelamento ósseo (Morrison, Yeoman et al. 1992; Morrison, Qi et al. 1994). Baseado nessa afirmação, sugere-se que esses fatores poderiam influenciar na susceptibilidade individual a intoxicação pelo chumbo por estarem relacionados a cinética do metal (Onalaja and Claudio 2000).

1.3- Importância das concentrações de chumbo no plasma sanguíneo (Pb-P) e da fração plasma/sangue total (%Pb-P/Pb-S)

A recomendação do CDC (Centro para Controle e Prevenção de Doenças) para o diagnóstico de exposição ao Pb é a determinação do metal no sangue total. Concentrações de até 10 µg/dL de Pb no sangue (Pb-S) são consideradas como níveis de intervenção (Patrick 2006). No entanto, concentrações inferiores a essa já vêm sendo associadas a danos no sistema nervoso central, hipertensão e danos renais (Staessen, Bulpitt et al. 1994; Cheng, Schwartz et al. 2001). A avaliação das concentrações de Pb-P, bem como a fração (%Pb-P/Pb-S) recebeu atenção especial nos últimos tempos. As exposições recentes e passadas ao metal são dadas através das medidas de Pb-S como resultado da mobilização do chumbo nos estoques ósseos para a corrente sanguínea (Hu, Rabinowitz et al. 1998). Entretanto, na cinética do chumbo, diferenciar baixos níveis de exposição crônica de um curto prazo de alta exposição não é possível com base apenas nas medidas dos níveis de Pb-S, mas sim, avaliando os níveis de Pb-P e %Pb-P/Pb-S. Pois a composição dessa fração considera o Pb a que o indivíduo está exposto atualmente e o Pb que poderá estar retornando dos estoques ósseos (Pounds, Long et al. 1991; Rabinowitz 1991; Hu, Rabinowitz et al. 1998). Nesse sentido, é aceitável que a toxicidade do chumbo esteja relacionada aos níveis de Pb-P ou à fração (Bergdahl, Gerhardsson et al. 2006). Vale lembrar que os estoques ósseos influenciam a concentração do chumbo no plasma de modo independente da influência do Pb sanguíneo (Rabinowitz 1991; Bergdahl, Gerhardsson et al. 2006). O Pb desses estoques 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 (Rabinowitz 1991), constituindo assim um mecanismo para a toxicidade tardia.

Conjuntamente, estes dados demonstram a importante relação entre os níveis de chumbo no plasma, sangue e ossos e a relevância de se avaliar os fatores que influenciam essa cinética, para o estudo na toxicocinética do chumbo.

1.4- Receptor da vitamina D (VDR) e o remodelamento ósseo

Além do processo de remodelamento ósseo, a susceptibilidade individual também pode ter um significado importante para a composição dessa fração. Alterações em determinados genes (polimorfismos) relacionados à cinética do Pb têm sido identificados. Entre eles, o gene do receptor da vitamina D (*VDR*) (Uitterlinden, Fang et al. 2004).

A vitamina D atua como potente regulador do metabolismo ósseo. As duas principais formas da Vitamina D são: Colecalciferol ou Vitamina D₃, formada na pele após exposição aos raios UV, e Ergocalciferol ou Vitamina D₂, obtida através dos alimentos (Lips 2006). Embora diferenças estruturais existam entre as duas formas de Vitamina D, elas seguem a mesma via metabólica, sendo hidroxiladas no fígado e posteriormente nos rins, onde são finalmente ativadas. A forma ativa da Vitamina D é 1α 25 (OH)₂D₃, que exerce seus efeitos no organismo através da ligação a um receptor nuclear específico presente em diversos tecidos, o Receptor da vitamina D (VDR) (Lips 2006). A clonagem desse receptor mostrou que se trata de um membro da superfamília dos receptores nucleares e, assim como os receptores esteróides, são ativados por ligantes específicos (McDonnell, Mangelsdorf et al. 1987). Dessa forma, o metabólico ativo da Vitamina D, as enzimas responsáveis pela sua ativação e o VDR formam o sistema endócrino da Vitamina D. Esse sistema está diretamente relacionado ao metabolismo ósseo.

Por outro lado, existem diferenças interindividuais diretamente relacionadas ao metabolismo ósseo (Morrison, Qi et al. 1994; Ivanova, Doukova et al. 2006). Variações nas seqüências do DNA de proteínas desse sistema poderão acarretar em doenças como o raquitismo, onde há uma mutação deletéria no gene *VDR*. Entretanto, variações mais sutis no *VDR*, os polimorfismos como por exemplo os SNPs (da sigla: *Single Nucleotide Polymorphism*), são associadas a diversas doenças como por exemplo, diabetes (Malecki, Frey et al. 2003), urolitíase (Gunes, Bilen et al. 2006) e câncer de mama (Lowe, Guy et al. 2005). Como já é bem estabelecido que fatores genéticos podem influenciar o *turnover* e a densidade óssea (Morrison, Yeoman et al. 1992; Morrison, Qi et al. 1994), estes foram estudados como marcadores genéticos para osteoporose (Vandevyver, Wylin et al. 1997; Falchetti, Sferazza et al. 2007). A interpretação desses polimorfismos é

prejudicada pelo fato de que muitos deles são anônimos, ou seja, ainda não se conhece seu efeito funcional.

1.5- Importância da análise dos polimorfismos

Dizemos que um gene é polimórfico quando variações específicas da sequência de bases do gene são encontradas com frequência mínima de 1% em uma população. Por exemplo, polimorfismos genéticos podem ocorrer pela substituição de uma base C-T (citosina por timidina) em regiões do gene que codificam aminoácidos (exons), causando uma correspondente substituição de um aminoácido por outro, potencialmente alterando a estrutura e/ou função da proteína correspondente. Polimorfismos deste tipo são chamados de SNPs e são os mais comuns.

O *VDR* situa-se no cromossomo 12 e possui cerca de 100kb e uma extensa região promotora capaz de gerar múltiplas transcrições tecido-específicas (Uitterlinden, Fang et al. 2004) (Miyamoto, Kesterson et al. 1997) (Crofts, Hancock et al. 1998) . Dessa maneira, cerca de 100 polimorfismos são esperados ao longo desse gene, no entanto, apenas alguns são conhecidos e estudados (figura 1). Dentre eles encontram-se aqueles que são reconhecidos pelas enzimas de restrição: *BsmI*, *ApaI* e *FokI*, recebendo essa denominação.

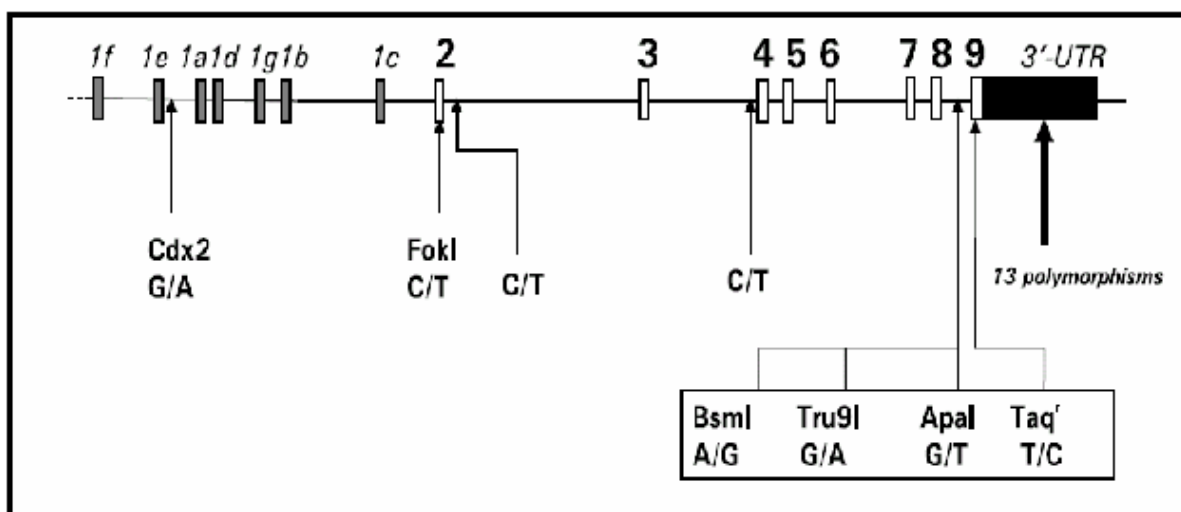


Figura 1- Estrutura genômica do *VDR* e posição de alguns polimorfismos conhecidos (modificado de Uitterlinden A. e col, 2004) (Uitterlinden, Fang et al. 2004)

O polimorfismo *BsmI* (rs1544410) situa-se no intron 8 e é caracterizado pela substituição de um nucleotídeo A por G (adenina por guanina) (Morrison, Yeoman et al. 1992). No mesmo intron 8, localiza-se o outro polimorfismo, *ApaI* (rs7975232) que se caracteriza pela substituição de uma G por T (guanina por timina) (Faraco, Morrison et al. 1989). Já o polimorfismo *FokI* (rs10735810) localiza-se em uma região funcional, o exon 2, onde há a substituição de uma C por T (citosina por timina) (figura 1) (Gross, Krishnan et al. 1998). Estes três polimorfismos foram genotipados e analisados nos indivíduos incluídos nesse estudo através da técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

No caso do polimorfismo da *FokI*, indivíduos com o alelo C (designados por F) iniciam a transcrição no segundo sítio ATG e não possuem os três aminoácidos NH₂ terminal em toda extensão da proteína VDR, ou seja, a proteína é mais curta em três aminoácidos (forma M2, indivíduos FF). A ausência do sítio polimórfico *FokI* indica que a tradução da proteína foi iniciada no primeiro sítio ATG e portanto, os indivíduos portadores desse genótipo (ff) sintetizam uma proteína em toda sua extensão, com 427 aminoácidos (forma M1) (Gross, Krishnan et al. 1998). Essa diferença estrutural pode alterar a função do VDR e conseqüentemente alterar o processo de remodelamento ósseo. Há evidências que o alelo f mais longo pode ser menos ativo que a forma mais curta. Dos três SNPs aqui estudados, apenas este possui uma funcionalidade. No entanto, os polimorfismos *BsmI* e *ApaI*, embora situados em regiões intrônicas, apresentam diversos estudos de associação demonstrando a influencia destes polimorfismos (Cooper and Umbach 1996; Uitterlinden, Burger et al. 1997; Vandevyver, Wylin et al. 1997; Lowe, Guy et al. 2005; Gunes, Bilen et al. 2006; Thijssen 2006). Tais estudos se baseiam na hipótese que esses polimorfismos (*BsmI* e *ApaI*) possam estar em desequilíbrio de ligação com polimorfismos situados na região 3'UTR, região reguladora do gene. O desequilíbrio de ligação é atribuído à ligação física entre o lócus que resulta na redução da frequência de recombinação entre os genes (Crofts, Hancock et al. 1998; Uitterlinden, Fang et al. 2004) .

O estudo individual dos polimorfismos é importante, pois possibilita a indicação da influência desses variantes genéticos sobre o risco de desenvolvimento e/ou na gravidade de uma determinada doença. Entretanto, quando pensamos no indivíduo como

um todo, o que ocorre é a interação entre vários polimorfismos dentro de seu genoma ao mesmo tempo. Esta situação é melhor avaliada através do estudo de haplótipos (Risch 2000; Crawford and Nickerson 2005).

Haplótipos são a combinação de alelos de diferentes marcadores genéticos presentes ao longo de um mesmo cromossomo e conseqüentemente herdados em unidade. Mostra-se de grande importância, pois podem fornecer informações sobre recombinação do DNA em um cromossomo (Crawford and Nickerson 2005), quando os polimorfismos estão presentes no mesmo cromossomo.

1.6- Polimorfismos *VDR* e toxicocinética do Pb

Considerando a similaridade do Pb com o cálcio, e também a participação desse íon no metabolismo ósseo, alguns autores estudaram a associação de diferentes polimorfismos presentes no gene *VDR* com as diferenças interindividuais nas concentrações de Pb no sangue. Entretanto, a maioria desses trabalhos avalia a participação individual que cada polimorfismo exerce sobre as diferentes concentrações de Pb no sangue (Schwartz, Lee et al. 2000; Chuang Hy Fau - Schwartz, Schwartz J Fau - Gonzales-Cossio et al. 2001; Haynes, Kalkwarf et al. 2003). Até o momento nenhum estudo avaliou se polimorfismos genéticos do *VDR* poderiam alterar as concentrações de Pb-P e %Pb-P/Pb-S. Além disso, não há estudos considerando a influência dos haplótipos do *VDR* sobre esses mesmos parâmetros.

2- OBJETIVOS

- 1** - Verificar se polimorfismos do gene *VDR*, (*BsmI*, *ApaI* e *FokI*) influenciam as concentrações plasmáticas de chumbo (Pb-P) e a fração chumbo no plasma/chumbo no sangue (%Pb - P/Pb-S) de voluntários expostos ambientalmente ao chumbo.

- 2** - Verificar se haplótipos estimados a partir dos polimorfismos acima citados influenciam as concentrações plasmáticas de chumbo (Pb-P) e a fração chumbo no plasma/chumbo no sangue (%Pb - P/Pb-S) de voluntários expostos ambientalmente ao chumbo.

3- CAPÍTULO



**Haplotypes of vitamin D receptor modulate the circulating levels of
lead in exposed subjects.**

**Vania B. Rezende^a, Fernando Barbosa Jr^b, Marcelo F. Montenegro^c, Valeria C.
Sandrim^c, Raquel F. Gerlach^d and Jose E. Tanus-Santos^{c,*}**

^a Department of Pharmacology, FCM-UNICAMP, 13081-970, Campinas, SP, Brazil.

^b Department of Clinical, Toxicological and Food Science Analysis, FCFRP-USP, Av. do Cafe s/n, S.P. 14040-903, Ribeirao Preto, Brazil.

^c Department of Pharmacology, FMRP-USP, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, CEP 14049-900, Ribeirao Preto, SP, Brazil

^d Department of Morphology, Estomatology and Physiology, FORP-USP, Av. do Cafe, S/N, 14040-904, Ribeirao Preto, SP, Brazil

* *Corresponding author:* FAX: +551636332301
Phone: +551636023163
E-mail: tanus@fmrp.usp.br

Abstract:

Genetic factors influence blood lead (Pb-B) concentrations in lead exposed subjects. This study aimed at examining the combined effects (haplotype analysis) of three polymorphisms (*BsmI*, *ApaI* and *FokI*) in vitamin D receptor (VDR) gene on Pb-B and on the concentrations of lead in plasma (Pb-P), which is more relevant to lead toxicity, in 150 environmentally exposed subjects. Genotypes were determined by RFLP, and Pb-P and Pb-B were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry and by graphite furnace atomic absorption spectrometry, respectively. Subjects with the bb (*BsmI*) or ff (*FokI*) genotypes have lower B-Pb than subjects in the other genotype groups. Subjects with the aa (*ApaI*) or ff genotypes have lower P-Pb than subjects in the other genotype groups. Lower Pb-P, Pb-B, and %Pb-P/Pb-B levels were found in subjects with the haplotype combining the a, b, and f alleles for the *ApaI*, *BsmI*, and *FokI* polymorphisms, respectively, compared with the other haplotype groups, thus suggesting that VDR haplotypes modulate the circulating levels of lead in exposed subjects.

Key words: haplotype, polymorphism, lead, toxicogenetics, vitamin D receptor

Lead is ubiquitous in the environment and exposure to it is widely recognized as a serious health problem [1]. Several studies have proposed that lead-induced toxicity is partly due to the effects of lead on calcium homeostasis [1,2]. Indeed, lead accumulates in bone tissue during all stages of bone remodeling and growth [3,4], and the deposition of lead in bone closely resembles that of calcium because lead competes with calcium for a common transport mechanism and protein-binding sites [5,6]. Moreover, increased calcium intake reduces bone lead accumulation and its mobilization during pregnancy or lactation [7]. However, lead returns to blood stream as a result of bone resorption process, thus increasing plasma lead levels, which is considered the most toxic fraction because it reflects the diffusible lead portion in the body [8,9].

Vitamin D and its active metabolites are primarily involved in maintaining calcium homeostasis [10]. Many of the biological actions of vitamin D are mediated by vitamin D receptor (VDR) [11]. Several genetic variations (single nucleotide polymorphisms; SNP) have been identified in the VDR gene [12]. These SNPs, which are usually described using different restriction enzymes, have been associated with altered calcium metabolism and bone biology [13].

While other genetic variations have also been implicated in the modulation of lead toxicity [1,14-19], few studies have previously examined the effects of SNPs in VDR gene on the circulating concentrations of lead in exposed populations [20-24]. However, no previous study has examined the combined effects of polymorphisms in VDR gene on the circulating concentrations of lead in exposed subjects. Indeed, the

analysis of haplotypes (combinations of genetic markers within a chromosome cluster location) has been valued as a more powerful approach than the analysis of single polymorphisms [25]. This analysis could eliminate inconsistencies commonly found in studies analyzing SNPs one at a time [13]. In addition, no previous study has examined the effects of SNPs in VDR gene on the concentrations of lead in plasma (Pb-P), which reflects the diffusible lead portion in our body and is probably more relevant to lead toxicity than the concentrations of lead in whole blood (Pb-B) [8,9].

Here, we examined the effects of three SNPs (*BsmI*, *Apal* and *FokI* polymorphisms) in VDR gene on Pb-B and Pb-P in exposed subjects. We then examined whether there is a relationship between VDR gene haplotypes and Pb-B, Pb-P, and the %PbP/PbB ratio.

Materials and Methods

Materials

High purity de-ionized water (resistivity 18.2 m Ω 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 tubes, plastic bottles, autosampler cups, and glassware materials were cleaned by soaking in 10% v/v HNO₃ for 24 h, rinsing five times with Milli-Q water and dried in a class 100 laminar flow hood located inside the class 10,000 clean room.

Subjects

This study was approved by our Institutional Review Board and each subject provided

written informed consent. We studied 150 volunteers (52 men and 98 women), aged from 18 to 60, living in the city of Bauru (SP-Brazil). These subjects were environmentally exposed to lead during the running of a battery plant.

Blood collection

Venous blood samples were collected after overnight fasting into evacuated tubes containing lyophilized heparin (Vacuntainer BD, trace metals free) for metal analysis, or EDTA (Vacuntainer BD), for hematological evaluations and genotyping. Before collection, the skin was cleaned with alcohol and MilliQ water. The first blood fraction was used to determine Pb-B content and the second was used to plasma collection. Blood samples were immediately centrifuged to separate plasma from whole blood, thus avoiding transference of lead from erythrocytes. Each plasma fraction was then pipetted into two ultra-cleaned eppendorffs tubes and frozen at -80°C .

Genomic DNA was extracted from the cellular component of blood by a salting-out method and stored at -20°C until analyzed.

Measurement of blood and plasma lead concentrations

Whole blood samples were analysed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (Varian SpectrAA 220) as previously described [26,27]. To evaluate the accuracy of the results, NIST 955 "lead in bovine blood" Standard Reference Materials produced by the New York State Department of Health were used.

Plasma samples were analyzed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS, Perkin Elmer 6100) as previously described [28,29]. 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. Because there is no commercially available plasma or serum certified Reference Material for plasma lead

measurements, we checked for the accuracy of our results by analyzing serum reference materials produced by the New York State Department of Health.

Genotyping for VDR gene polymorphisms

Genotypes for the VDR gene polymorphisms *BsmI* (rs 1544410), *Apal* (rs 7975232) and *Fok I* (rs 10735810) were determined by restriction fragment length polymorphism (RFLP) techniques as previously described [19,30]. DNA fragments were separated by electrophoresis in polyacrylamide gels and visualized by silver staining (Fig.1).

Haplotype inference

Haplotypes were inferred using the program PHASE v2.1

(<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>) [31] to estimate haplotype frequencies in the population and the two haplotypes for each subject. The haplotypes were: H1(ABF), H2(ABf), H3(AbF), H4(Abf), H5(aBF), H6(aBf), H7(abF), and H8 (abf).

Statistical analysis

The distribution of genotypes was assessed for deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium by using chi-squared tests. To examine potential relationships between each polymorphism or haplotypes and Pb-B, Pb-P, or %Pb-P/Pb-B, we used the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test. To reduce the degrees of freedom and increase the power of our haplotype-based analysis, we excluded *a priori* uncommon haplotypes (haplotype frequency <10%) from the analysis. Data were reported as the mean \pm SEM. A *P*-value less than 0.05 was considered significant.

Results

The distribution of genotypes showed no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. The allele frequencies for *B*, *A*, and *F* alleles for the *BsmI*, *ApaI*, and *FokI* polymorphisms were 0.40, 0.46, and 0.68, respectively. Correspondingly, the allele frequencies for the *b*, *a* and *f* alleles were 0.60, 0.54, and 0.32. Table 1 shows characteristics of the subjects according to genotype for the three VDR gene polymorphisms. No significant differences were found in age, hematological parameters, arterial blood pressure, and smoking status among the genotype groups for the three polymorphisms studied here (Table 1; all $P > 0.05$).

While the *BsmI* polymorphism did not affect Pb-P or %Pb-P/Pb-B ratio (all $P > 0.05$, Table 1), subjects with the *bb* genotype presented significantly lower Pb-B levels than those found in the two other genotype groups for this polymorphism ($P < 0.05$; Table 1). The *ApaI* and the *FokI* polymorphisms affected Pb-P, Pb-B, and %Pb-P/Pb-B, as shown in Table 1. Subjects with the *aa* genotype for the *ApaI* polymorphism presented lower Pb-P, Pb-B, and %Pb-P/Pb-B levels than those found in the two other genotype groups for this polymorphism (all $P < 0.05$; Table 1). Similarly, subjects with the *ff* genotype for the *FokI* polymorphism presented lower Pb-P, Pb-B, and %Pb-P/Pb-B levels than those found in the two other genotype groups for this polymorphism (all $P < 0.05$; Table 1).

The estimated haplotypes frequencies is shown in Table 2. Three haplotypes (H4, H5, and H6) were relatively uncommon (frequency $< 10\%$) and therefore were excluded from the analysis. Figure 2 shows Pb-P, Pb-B, and %Pb-P/Pb-B (panels A,

B, and C, respectively) levels for each haplotype group. Interestingly, the H8 haplotype (which includes the a, b, and f alleles for the *ApaI*, *BsmI*, and *FokI* polymorphisms, respectively) was associated with lower Pb-P, Pb-B, and %Pb-P/Pb-B levels than those found in the other haplotype groups ($P < 0.05$; Fig. 2).

Discussion

In the present study, we confirmed past observations that subjects with the bb genotype for the *BsmI* polymorphism or with the ff genotype for the *FokI* polymorphism have lower B-Pb than subjects in the other genotype groups [20,22]. Importantly, this is the first study reporting that subjects with the aa genotype for the *ApaI* polymorphism, or with the ff genotype for the *FokI* polymorphism have lower P-Pb than subjects in the other genotype groups. Moreover, although not statistically significant, subjects with the bb genotype for the *BsmI* polymorphism tended to have lower Pb-P than subjects with the other genotypes. Giving support to our single SNP findings, this is the first study showing that H8 haplotype (which combines the a, b, and f alleles for the *ApaI*, *BsmI*, and *FokI* polymorphisms, respectively) was associated with lower Pb-P, Pb-B, and %Pb-P/Pb-B levels than those found in the other haplotype groups.

Our findings showing that VDR polymorphisms and haplotypes modulate Pb-P and %Pb-P/Pb-B levels may have major implications for lead toxicity. While whole blood has been the primary fluid to diagnose lead exposure, largely because blood lead sampling is recognized as a relatively easy procedure, other biomarkers of internal dose for lead have been proposed [8]. Importantly, Pb-P may be a more relevant

index of exposure, distribution, and health risks associated with lead because it is highly probable that the toxic effects of lead are primarily associated with Pb-P, which reflects the most rapidly exchangeable fraction of lead in the bloodstream [32]. Taking into account that VDR polymorphisms affect bone mineralization and resorption [13,33], and that Pb-P and %Pb-P/Pb-B ratio depend on the release of lead from bone [8,34,35], which accounts for > 94% of adult body burden of Pb [8], it can be expected that VDR polymorphisms may also affect lead accumulation in bone [1,14,19,21,24,36] and, consequently, Pb-P and %Pb-P/Pb-B, as suggested by the results of the present study. Therefore, although we have not assessed the clinical consequences of lead exposure in the present study, it is possible that subjects with high Pb-P and %Pb-P/Pb-B are exposed to increased health risks associated with lead exposure.

The functionality of most VDR gene polymorphisms, including those studied here, still remains largely unknown [10,12]. However, there is evidence indicating that the f allele for the *FokI* polymorphism is associated with a less active VDR [12,37]. The mechanism possibly involved in the association between the decreased activity of VDR in subjects with the ff genotype for the *FokI* polymorphism and the lower Pb-P and %Pb-P/Pb-B described in the present study are not known. We could speculate that a decreased activity of the VDR in subjects with ff genotype reduces lead accumulation in bone, thus leading to lower Pb-P and %Pb-P/Pb-B. The relationship between bone Pb and plasma Pb, however, remains to be elucidated [8].

Information about the functionality of the two (*BsmI* and *ApaI*) other VDR polymorphisms studied here is still unclear [1,10,12]. However, bone lead content is apparently lower in subjects with the bb genotype for the *BsmI* polymorphism [19,20]. These findings agree with our results showing that subjects with the bb genotype tended to have lower Pb-P than subjects with the other genotypes, although this result did not reach statistical significance.

Maybe more importantly, we found that H8 haplotype was associated with lower Pb-P, Pb-B, and %Pb-P/Pb-B levels than those found in the other haplotype groups. These results are consistent with the notion that certain individuals (those with the H8 haplotype) are less vulnerable to lead poisoning [1]. The haplotype approach used here is probably more powerful to capture the combined effect of cis-acting causal variants and to eliminate inconsistencies among different studies, as previously suggested [13,38]. While important genetic factors influencing lead intoxication are still being defined, our results suggest that the analysis of haplotypes of relevant candidate genes, such as the VDR, is probably more useful [10]. Cellular and molecular functional analysis are needed to define the functionality of the haplotypes associated with variable circulating Pb concentrations.

In conclusion, we found that the *ApaI*, *BsmI*, and *FokI* polymorphisms of VDR gene modulate the circulating Pb concentrations, and that H8 haplotype (which combines the a, b, and f alleles for the *ApaI*, *BsmI*, and *FokI* polymorphisms, respectively) is associated with lower Pb-P, Pb-B, and %Pb-P/Pb-B levels than those found in the

other haplotype groups. These findings may have important toxicogenetic implications and their molecular basis needs to be addressed in further studies.

Acknowledgements: Funded by FAPESP and CNPq.

References

- [1] A.O. Onalaja, and L. Claudio, Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ Health Perspect* 108 (2000) 23-28.
- [2] J.G. Pounds, Effect of lead intoxication on calcium homeostasis and calcium-mediated cell function: a review. *Neurotoxicology*. 5 (1984) 295-331.
- [3] M.B. Rabinowitz, Toxicokinetics of bone lead. *Environ Health Perspect*. 91 (1991) 33-37.
- [4] J.G. Pounds, G.J. Long, and J.F. Rosen, Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ Health Perspect*. 91 (1991) 17-32.
- [5] C.S. Fullmer, Intestinal calcium and lead absorption: effects of dietary lead and calcium. *Environ Res*. 54 (1991) 159-169.
- [6] C.S. Fullmer, Intestinal interactions of lead and calcium. *Neurotoxicology*. 13 (1992) 799-807.
- [7] J.D. Bogden, F.W. Kemp, S. Han, M. Murphy, M. Fraiman, D. Czerniach, C.J. Flynn, M.L. Banua, A. Scimone, L. Castrovilly, and et al., Dietary calcium and lead interact to modify maternal blood pressure, erythropoiesis, and fetal and neonatal growth in rats during pregnancy and lactation. *J Nutr*. 125 (1995) 990-1002.

- [8] F. Barbosa, Jr., J.E. Tanus-Santos, R.F. Gerlach, and P.J. Parsons, A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect* 113 (2005) 1669-1674.
- [9] D. Smith, M. Hernandez-Avila, M.M. Tellez-Rojo, A. Mercado, and H. Hu, The relationship between lead in plasma and whole blood in women. *Environ Health Perspect* 110 (2002) 263-268.
- [10] A.G. Uitterlinden, Y. Fang, J.B. van Meurs, H. van Leeuwen, and H.A. Pols, Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90 (2004) 187-193.
- [11] A.W. Norman, Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147 (2006) 5542-5548.
- [12] A.G. Uitterlinden, Y. Fang, J.B. Van Meurs, H.A. Pols, and J.P. Van Leeuwen, Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 338 (2004) 143-156.
- [13] J.M. Valdivielso, and E. Fernandez, Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta* 371 (2006) 1-12.
- [14] K. Theppeang, B.S. Schwartz, B.K. Lee, M.E. Lustberg, E.K. Silbergeld, K.T. Kelsey, P.J. Parsons, and A.C. Todd, Associations of patella lead with polymorphisms in the vitamin D receptor, delta-aminolevulinic acid dehydratase and endothelial nitric oxide synthase genes. *J Occup Environ Med* 46 (2004) 528-537.
- [15] V.M. Weaver, B.K. Lee, A.C. Todd, K.D. Ahn, W. Shi, B.G. Jaar, K.T. Kelsey, M.E. Lustberg, E.K. Silbergeld, P.J. Parsons, J. Wen, and B.S. Schwartz,

Effect modification by delta-aminolevulinic acid dehydratase, vitamin D receptor, and nitric oxide synthase gene polymorphisms on associations between patella lead and renal function in lead workers. *Environ Res* 102 (2006) 61-69.

- [16] J.G. Wetmur, A.H. Kaya, M. Plewinska, and R.J. Desnick, 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 (1991) 757-763.
- [17] F. Barbosa Jr, V.C. Sandrim, J.A. Uzuelli, R.F. Gerlach, and J.E. Tanus-Santos, eNOS genotype-dependent correlation between whole blood lead and plasma nitric oxide products concentrations. *Nitric Oxide* 14 (2006) 58-64.
- [18] M.F. Montenegro, F. Barbosa, Jr., V.C. Sandrim, R.F. Gerlach, and J.E. Tanus-Santos, A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies plasma/whole blood lead ratio. *Arch Toxicol* 80 (2006) 394-398.
- [19] B.S. Schwartz, W.F. Stewart, K.T. Kelsey, D. Simon, S. Park, J.M. Links, and A.C. Todd, Associations of tibial lead levels with BsmI polymorphisms in the vitamin D receptor in former organolead manufacturing workers. *Environ Health Perspect* 108 (2000) 199-203.
- [20] B.S. Schwartz, B.K. Lee, G.S. Lee, W.F. Stewart, D. Simon, K. Kelsey, and A.C. Todd, Associations of blood lead, dimercaptosuccinic acid-chelatable lead, and tibia lead with polymorphisms in the vitamin D receptor and [delta]-aminolevulinic acid dehydratase genes. *Environ Health Perspect* 108 (2000) 949-954.

- [21] H.Y. Chuang, K.T. Yu, C.K. Ho, M.T. Wu, G.T. Lin, and T.N. Wu, Investigations of vitamin D receptor polymorphism affecting workers' susceptibility to lead. *J Occup Health* 46 (2004) 316-322.
- [22] E.N. Haynes, H.J. Kalkwarf, R. Hornung, R. Wenstrup, K. Dietrich, and B.P. Lanphear, Vitamin D receptor Fok1 polymorphism and blood lead concentration in children. *Environ Health Perspect* 111 (2003) 1665-1669.
- [23] X.B. Ye, C.E. Wu, H. Fu, S.L. Yang, Y.W. Lu, and W.M. Ni, Associations of blood lead levels, kidney function, and blood pressure with delta-aminolevulinic acid dehydratase and vitamin D receptor gene polymorphisms. *Toxicology Mechanisms and Methods* 13 (2003) 139-146.
- [24] V.M. Weaver, B.S. Schwartz, B.G. Jaar, K.D. Ahn, A.C. Todd, S.S. Lee, K.T. Kelsey, E.K. Silbergeld, M.E. Lustberg, P.J. Parsons, J. Wen, and B.K. Lee, Associations of uric acid with polymorphisms in the delta-aminolevulinic acid dehydratase, vitamin D receptor, and nitric oxide synthase genes in Korean lead workers. *Environ Health Perspect* 113 (2005) 1509-1515.
- [25] D.C. Crawford, and D.A. Nickerson, Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med* 56 (2005) 303-320.
- [26] Y. Zhou, R.A. Zanao, F. Barbosa, P.J. Parsons, and F.J. Krug, Investigations on a W-Rh permanent modifier for the detection of Pb in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta part B* 57 (2002) 1291-1300.
- [27] F. Barbosa Jr, R.F. Gerlach, and J.E. Tanus-Santos, Matrix metalloproteinase- 9 activity in plasma correlates with plasma and whole blood lead concentrations. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98 (2006) 559-564.

- [28] F. Barbosa, Jr., J.T.C. Sartorio, R.F. Gerlach, and J.E. Tanus-Santos, Clinical evidence for lead-induced inhibition of nitric oxide formation. *Arch Toxicol* 80 (2006) 811-816.
- [29] F. Barbosa, Jr., I. Ramires, M.H. Rodrigues, T.D. Saint' Pierre, A.J. Curtius, M.R. Buzalaf, R.F. Gerlach, and J.E. Tanus-Santos, Contrasting effects of age on the plasma/whole blood lead ratio in men and women with a history of lead exposure. *Environ Res* 102 (2006) 90-95.
- [30] J.E. Curran, T. Vaughan, R.A. Lea, S.R. Weinstein, N.A. Morrison, and L.R. Griffiths, Association of A vitamin D receptor polymorphism with sporadic breast cancer development. *Int J Cancer* 83 (1999) 723-726.
- [31] M. Stephens, N.J. Smith, and P. Donnelly, A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68 (2001) 978-989.
- [32] A. Schutz, I.A. Bergdahl, A. Ekholm, and S. Skerfving, Measurement by ICP-MS of lead in plasma and whole blood of lead workers and controls. *Occup Environ Med* 53 (1996) 736-740.
- [33] N.A. Morrison, J.C. Qi, A. Tokita, P.J. Kelly, L. Crofts, T.V. Nguyen, P.N. Sambrook, and J.A. Eisman, Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 367 (1994) 284-287.
- [34] K.M. Calk, R.J. Bowins, C. Vaillancourt, C.L. Gordon, R.H. McNutt, R. Laporte, C.E. Webber, and D.R. Chettle, Partition of circulating lead between serum and red cells is different for internal and external sources of lead. *Am J Ind Med* 29 (1996) 440-445.

- [35] M. Hernandez-Avila, D. Smith, F. Meneses, L.H. Sanin, and H. Hu, The influence of bone and blood lead on plasma lead levels in environmentally exposed adults. *Environ Health Perspect* 106 (1998) 473-477.
- [36] V.M. Weaver, B.K. Lee, A.C. Todd, B.G. Jaar, K.D. Ahn, J. Wen, W. Shi, P.J. Parsons, and B.S. Schwartz, Associations of patella lead and other lead biomarkers with renal function in lead workers. *J Occup Environ Med* 47 (2005) 235-243.
- [37] H. Arai, K. Miyamoto, Y. Taketani, H. Yamamoto, Y. Iemori, K. Morita, T. Tonai, T. Nishisho, S. Mori, and E. Takeda, A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res.* 12 (1997) 915-921.
- [38] D.J. Balding, A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 7 (2006) 781-791.

Table 1. Characteristics of subjects grouped by genotype.

Variable	Total (n=150)	<i>BsmI</i> genotypes			<i>P</i> value	
		BB (n=23)	Bb (n=75)	bb (n=52)	<i>P1</i>	<i>P2</i>
Age (years)	36.0 ± 1.0	38.0 ± 2.0	35.0 ± 1.3	37.0 ± 1.5	NS	NS
Hemoglobin(g/dL)	14.1 ± 0.1	14.5 ± 0.2	14.0 ± 0.1	14.0 ± 0.2	NS	NS
Red blood cells (x 10 ⁹ /μL)	4.6 ± 0.0	4.8 ± 0.1	4.7 ± 0.0	4.6 ± 0.0	NS	NS
Hematocrit (%)	42.0 ± 0.3	43.0 ± 0.9	42.0 ± 0.4	41.0 ± 0.5	NS	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	75.0 ± 1.0	77.0 ± 3.6	75.0 ± 1.3	75.0 ± 1.5	NS	NS
Pb-B (μg/L)	73.1 ± 4.3	91.0 ± 16.0	73.6 ± 6.0	55.3 ± 4.2	0.040	0.015
Pb-P (μg/L)	0.53 ± 0.04	0.61 ± 0.15	0.52 ± 0.06	0.50 ± 0.06	NS	NS
Pb-P/Pb-B ratio (%)	0.68 ± 0.04	0.62 ± 0.08	0.64 ± 0.05	0.77 ± 0.10	NS	NS
Never smoker (%)	80	78	79	78	NS	NS
Current smoker (%)	20	22	21	22	NS	NS

Variable	Total (n=150)	<i>Apal</i> genotypes			<i>P</i> value	
		AA (n=36)	Aa (n=68)	aa (n=46)	<i>P1</i>	<i>P2</i>
Age (years)	36.0 ± 1.0	35.0 ± 2.0	36.0 ± 1.0	36.0 ± 1.0	NS	NS
Hemoglobin(g/dL)	14.1 ± 0.1	14.1 ± 0.2	14.0 ± 0.1	14.0 ± 0.1	NS	NS
Red blood cells (x 10 ⁹ /μL)	4.6 ± 0.0	4.8 ± 0.1	4.6 ± 0.0	4.7 ± 0.0	NS	NS
Hematocrit (%)	42.0 ± 0.3	43.0 ± 0.8	42.0 ± 0.4	42.0 ± 0.6	NS	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	75.0 ± 1.0	76.0 ± 2.7	74.0 ± 1.3	75.0 ± 1.8	NS	NS
Pb-B (μg/L)	73.1 ± 4.3	74.5 ± 8.6	74.4 ± 5.1	68.4 ± 9.9	0.030	0.010
Pb-P (μg/L)	0.53 ± 0.04	0.58 ± 0.08	0.56 ± 0.05	0.43 ± 0.09	0.006	0.001
Pb-P/Pb-B ratio (%)	0.68 ± 0.04	0.78 ± 0.09	0.76 ± 0.07	0.50 ± 0.06	0.010	0.003
Never smoker (%)	80	78	76	77	NS	NS
Current smoker (%)	20	22	24	23	NS	NS

Variable	Total (n=150)	<i>FokI</i> genotypes			<i>P</i> value	
		FF (n=68)	Ff (n=68)	ff (n=14)	<i>P1</i>	<i>P2</i>
Age (years)	36.0 ± 1.0	35.0 ± 1.0	37.0 ± 1.4	37.0 ± 2.0	NS	NS
Hemoglobin(g/dL)	14.1 ± 0.1	13.8 ± 0.1	14.0 ± 0.1	14.0 ± 0.2	NS	NS
Red blood cells (x 10 ⁹ /μL)	4.6 ± 0.0	4.6 ± 0.0	4.7 ± 0.0	4.7 ± 0.0	NS	NS
Hematocrit (%)	42.0 ± 0.3	42.0 ± 0.5	42.0 ± 0.5	42.0 ± 0.8	NS	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	75.0 ± 1.0	76.0 ± 1.5	74.0 ± 1.6	75.0 ± 2.6	NS	NS
Pb-B (μg/L)	73.1 ± 4.3	79.0 ± 7.3	71.7 ± 5.6	45.4 ± 7.6	NS	0.040
Pb-P (μg/L)	0.53 ± 0.04	0.61 ± 0.07	0.50 ± 0.05	0.22 ± 0.08	0.005	0.001
Pb-P/Pb-B ratio (%)	0.68 ± 0.04	0.76 ± 0.07	0.67 ± 0.05	0.37 ± 0.09	0.020	0.006
Never smoker (%)	80	78	77	79	NS	NS
Current smoker (%)	20	22	23	21	NS	NS

P1: Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test comparing the three genotype groups. *P2*: Mann Whitney test for XX+Xx subjects versus xx subjects (where X corresponds to the B, A, and F alleles, and x corresponds to the b, a, and f alleles for the *BsmI*, *Apal*, and *FokI* VDR gene polymorphisms)

Table 2. Estimated haplotype frequency in the studied population

	Haplotypes			Frequency (%)
	<i>Apal</i>	<i>Bsml</i>	<i>FokI</i>	
H1 -	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>F</i>	12.3
H2 -	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>f</i>	15.0
H3 -	<i>A</i>	<i>b</i>	<i>F</i>	15.7
H4 -	<i>A</i>	<i>b</i>	<i>f</i>	4.0
H5 -	<i>a</i>	<i>B</i>	<i>F</i>	9.4
H6 -	<i>a</i>	<i>B</i>	<i>f</i>	2.0
H7 -	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>F</i>	30.6
H8 -	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>f</i>	10.0

Legends for figures:

Figure 1. Genotyping for the *BsmI*, *ApaI*, and *FokI* VDR gene polymorphisms. The PCR products were digested with restriction enzymes producing different fragments leading to specific genotypes.

Figure 2. Whole blood lead (Pb-B; panel A), plasma lead (Pb-P; panel B), and %Pb-P/Pb-B ratio (Panel C) in H1, H2, H3, H7, and H8 haplotype groups. The bar shows the median value.

* P < 0.05 for H8 haplotype versus the other haplotype groups.

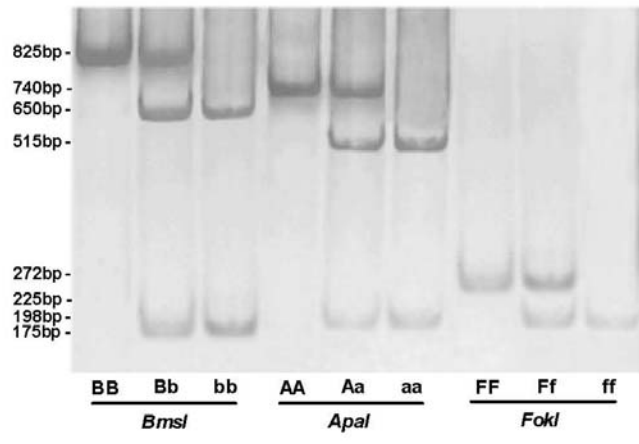


Figure 1

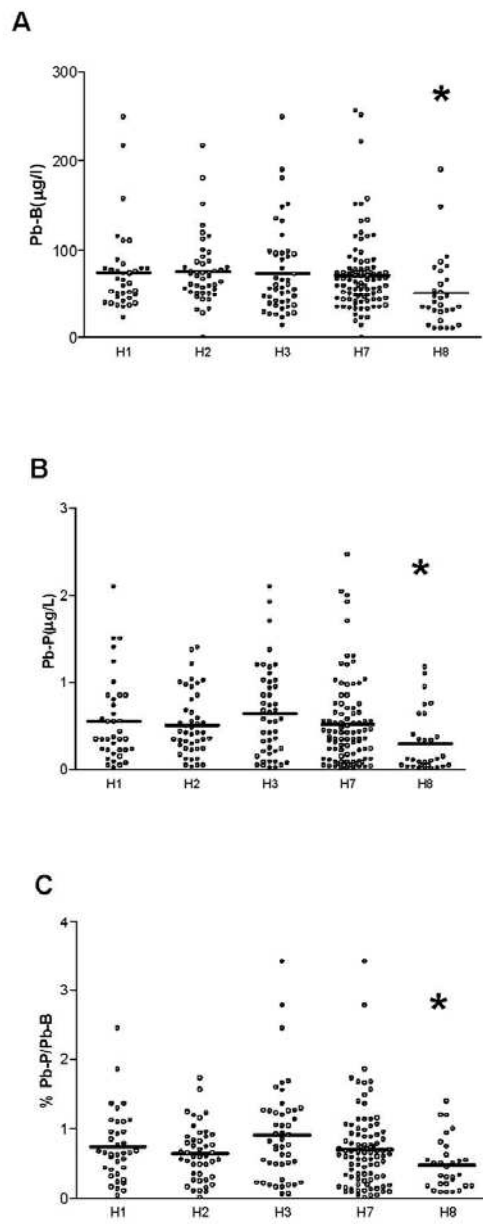


Figure 2

4- DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo demonstrando que haplótipos estimados a partir dos polimorfismos (*BsmI*, *ApaI* e *FokI*) do receptor da vitamina D (*VDR*), modulam de maneira significativa as concentrações de Pb-S, Pb-P e %Pb-P/Pb-S em indivíduos expostos ambientalmente ao chumbo.

A razão pela qual avaliamos as concentrações de Pb-P e %Pb-P/Pb-S é que, durante as últimas cinco décadas, o chumbo no sangue (Pb-S) tem sido o principal biomarcador utilizado para monitorar a exposição ocupacional e ambiental, devido à facilidade de coleta (Barbosa, Tanus-Santos et al. 2005). Entretanto, outros biomarcadores de exposição têm sido propostos para avaliar a fração do metal que está disponível para atravessar as barreiras biológicas e exercer o efeito tóxico. Dessa maneira, concentração de Pb-P pode ser um índice mais relevante para avaliar exposição, distribuição e os riscos à saúde associados ao chumbo. Além disso, os efeitos tóxicos do chumbo são primeiramente associados ao Pb-P, o qual reflete mais rapidamente a fração liberada de chumbo na corrente sanguínea (Barbosa, Tanus-Santos et al. 2005). Uma vez que a mobilização de Pb nos ossos contribui para a fração plasmática do metal de forma considerável, fatores envolvidos no processo de remodelamento ósseo poderiam alterar a composição dessa fração, como por exemplo, os fatores genéticos (Onalaja and Claudio 2000).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o polimorfismo G177C (substituição de uma guanina por citosina na posição 177 do gene) da ALAD, enzima na qual o Pb se liga nos eritrócitos, influencia os níveis Pb-P e a fração %Pb-P/Pb-S de indivíduos ambientalmente expostos ao chumbo, já 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 (Montenegro, Barbosa et al. 2006). Uma vez que a mobilização de Pb nos ossos contribui para a fração plasmática do metal de forma considerável, fatores envolvidos nesse processo poderiam alterar a composição dessa fração.

Considerando a similaridade do Pb com o cálcio, ambos cátions bivalentes e a toxicocinética do metal, entendemos melhor sua afinidade pelos tecidos mineralizados como ossos e dentes (Simons 1993). O osso representa grande parte dos estoques do metal no organismo. Por outro lado, sendo um tecido dinâmico em constante processo de

remodelamento, o Pb armazenado, por competição com o cálcio da estrutura óssea, pode voltar a compor a fração plasmática (Hu, Rabinowitz et al. 1998).

A vitamina D está diretamente relacionada ao balanço de cálcio no organismo e sua função depende da ligação com o receptor nuclear VDR, presente na maioria das células, incluindo osteoblastos. Esse receptor foi estudado em 1988 por Baker e colaboradores (Baker, McDonnell et al. 1988) e o gene *VDR* que o expressa localiza-se no cromossomo 12. Em um estudo pioneiro, Morrison e colaboradores associaram polimorfismos *BsmI* do *VDR* à densidade mineral óssea (DMO) e demonstraram que esse parâmetro foi 12% menor nos portadores do genótipo BB quando comparados aos bb, tanto em gêmeos como em mulheres, sugerindo ser este polimorfismo responsável por 75% do componente genético da DMO e que o genótipo BB seria um indicador para o risco de osteoporose (Morrison, Qi et al. 1994). Outros estudos associam baixa densidade mineral óssea em mulheres com o alelo “B”(Tokita, Matsumoto et al. 1996; Gong, Stern et al. 1999). Mulheres homozigotas para o alelo “B” possuem densidade mineral óssea cerca de 2 a 10% menores que mulheres bb (Vandevyver, Wylin et al. 1997). Embora numerosos outros estudos tentaram reproduzir os achados com resultados divergentes, fica claro que o remodelamento ósseo possui um fator genético determinante.

Baseado nisso, Schwartz e colaboradores (Schwartz, Stewart et al. 2000) associaram polimorfismos *BsmI* a concentrações de Pb na tíbia de trabalhadores expostos de forma ocupacional e encontraram uma associação dos homozigotos bb a uma menor concentração de Pb na tíbia.

No presente estudo, não encontramos influências significativas do polimorfismo SNP *BsmI* do *VDR* nos níveis de Pb-S (tabela1-artigo anexo). Este resultado está de acordo com o trabalho de Schwartz (Schwartz, Lee et al. 2000). Com relação a *ApaI*, este foi o primeiro estudo demonstrando que indivíduos portadores do genótipo *aa* apresentavam concentrações menores de Pb-P assim como a fração plasmática (tabela-1-artigo anexo). Já os resultados dos polimorfismos da *FokI* estão de acordo com o trabalho de Haynes (Haynes, Kalkwarf et al. 2003) que mostrou portadores dos genótipos *ff* com uma menor concentração de Pb-S e adicionalmente em nosso trabalho

demonstramos que os portadores do mesmo genótipo ff apresentam uma diminuição também nas concentrações de Pb-P e %Pb-P/Pb-S (tabela-1-artigo anexo).

O resultado mais importante desse estudo foi a descoberta de uma associação estatisticamente significativa do haplótipo H8 (formados pelos alelos a, b e f) quando comparado com os demais grupos, sendo o H8 associado a uma diminuição da concentração de Pb-S, Pb-P e %Pb-P/Pb-S. O haplótipo tem sido considerado uma ferramenta de maior poder para avaliar os efeitos combinados dos polimorfismos. O estudo de haplótipos dos polimorfismos do *VDR* tem sido muito empregado em pesquisas envolvendo doenças como câncer de próstata (Cicek, Liu et al. 2006) e principalmente osteoporose (Grundberg, Lau et al. 2007) . Contudo, este foi o primeiro trabalho a demonstrar o efeito de haplótipos sobre as concentrações de Pb-S, Pb-P e %Pb-P/Pb-S, no qual encontramos uma menor concentração de Pb-S, Pb-P e %Pb-P/Pb-S dos indivíduos do grupo H8. Vale lembrar que utilizamos somente os haplótipos com frequências $\geq 10\%$ para as análises haplotípicas (tabela 2-artigo anexo).

Analisando as duas colunas dos valores de p na tabela 1 ($p_2 < p_1$ para todos os grupos), verifica-se que quando comparamos os genótipos, verificamos um p com menor valor do que quando comparamos BB+Bb com bb; AA+Aa com aa e FF+Ff com ff. Esperava-se que na combinação dos alelos (A, B e F) nos haplótipos (grupo H1-tabela-2, artigo anexo) houvesse um aumento da concentração do metal no sangue, plasma e fração, mas esse efeito não foi encontrado (figura 2-gráficos artigo anexo). Sugerimos, portanto que a diminuição da concentração do Pb-S, Pb-P e %Pb-P/Pb-S encontrados nesse estudo seria efeito da combinação dos alelos (a, b e f) e não um efeito dos alelos (A, B e F) sobre o aumento da concentração do metal. Além disso, os indivíduos homocigotos para o alelo b do polimorfismo *BsmI* apresentam uma menor concentração de Pb-S, mas não nos demais parâmetros (Pb-P e %Pb-P/Pb-S) (tabela 1). No entanto quando associados aos alelos a e f, surge uma diminuição estatisticamente significativa da concentração de Pb-S, Pb-P e %Pb-P/Pb-S (figura 2-gráficos artigo anexo).

A funcionalidade da maioria dos polimorfismos, incluindo aqueles aqui estudados, ainda permanece desconhecida (Uitterlinden, Fang et al. 2004). Entretanto, dos três polimorfismos estudados nesse trabalho, um tem recebido especial atenção: o

polimorfismo *FokI*. O possível mecanismo envolvido na associação entre a diminuição das concentrações de Pb-P e %Pb-P/Pb-S entre os indivíduos portadores do genótipo ff ainda permanecem sem resposta. Com base nas evidências de que o alelo f (forma longa M1) seria menos ativo, poderíamos sugerir que a diminuição da atividade do VDR nos portadores do genótipo ff reduziria o acúmulo de Pb nos ossos, levando a uma diminuição da concentração do metal no plasma e na fração. Entretanto, outros estudos são necessários para validar essa sugestão. A funcionalidade dos polimorfismos *BsmI* e *ApaI* aqui estudados ainda permanece desconhecida. Mas ao analisarmos os haplótipos, sugerimos que os alelos a b quando associados ao f talvez contribua com uma menor atividade do receptor, o que levaria a um menor acúmulo de Pb nos ossos e conseqüentemente uma menor concentração de Pb-S, Pb-P e %Pb-P/Pb-S. Estudos dos mecanismos moleculares envolvidos nessa associação são necessários para validar tais efeitos.

5- CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que os polimorfismos *BsmI*, *ApaI* e *FokI* estão associados às concentrações de Pb-S, Pb-P e %Pb-P/Pb-S e que o haplótipo H8 (formado pela combinação dos alelos a, b, f para *ApaI*, *BsmI* e *FokI*) está associado a uma diminuição das concentrações de Pb-S, Pb-P e %Pb-P/Pb-S.

Embora sejam necessários estudos sobre o mecanismo responsável por tais efeitos, esses resultados podem ter importantes implicações toxicogenéticas, sendo este haplótipo um possível marcador para a diminuição das concentrações de Pb-S, Pb-P e %Pb-P/Pb-S.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker, A. R., D. P. McDonnell, et al. (1988). "Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor." Proc Natl Acad Sci U S A. **85**(10): 3294-8.
- Barbosa, F., Jr., J. E. Tanus-Santos, et al. (2005). "A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs." Environ Health Perspect. **113**(12): 1669-74.
- Bergdahl, I. A., L. Gerhardsson, et al. (2006). "Plasma-lead concentration: investigations into its usefulness for biological monitoring of occupational lead exposure." Am J Ind Med. **49**(2): 93-101.
- Carvalho, F., T. M. Tavares, et al. (1984). "Lead and cadmium concentrations in the hair of fishermen from the Subae River basin, Brazil." Environ Res. **33**(2): 300-6.
- Carvalho, F. M., A. M. Silvany-Neto, et al. (1985). "Lead poisoning among children from Santo Amaro, Brazil." Bull Pan Am Health Organ. **19**(2): 165-75.
- Cheng, Y., J. Schwartz, et al. (2001). "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. **153**(2): 164-71.
- Chuang Hy Fau - Schwartz, J., T. Schwartz J Fau - Gonzales-Cossio, et al. (2001). "Interrelations of lead levels in bone, venous blood, and umbilical cord." Environ Health Perspect **109**(5): 527-32.
- Cicek, M. S., X. Liu, et al. (2006). "Vitamin D receptor genotypes/haplotypes and prostate cancer risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **15**(12): 2549-52.
- Cooper, G. S. and D. M. Umbach (1996). "Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis." J Bone Miner Res. **11**(12): 1841-9.
- Crawford, D. C. and D. A. Nickerson (2005). "Definition and clinical importance of haplotypes." Annu Rev Med. **56**: 303-20.
- Crofts, L. A., M. S. Hancock, et al. (1998). "Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts." Proc Natl Acad Sci U S A. **95**(18): 10529-34.

- de Freitas, C. U., E. M. De Capitani, et al. (2007). "Lead exposure in an urban community: investigation of risk factors and assessment of the impact of lead abatement measures." Environ Res. **103**(3): 338-44. Epub 2006 Nov 7.
- Falchetti, A., C. Sferrazza, et al. (2007). "FokI polymorphism of the vitamin D receptor gene correlates with parameters of bone mass and turnover in a female population of the Italian island of Lampedusa." Calcif Tissue Int. **80**(1): 15-20. Epub 2006 Dec 8.
- Faraco, J. H., N. A. Morrison, et al. (1989). "ApaI dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus." Nucleic Acids Res. **17**(5): 2150.
- Gidlow, D. A. (2004). "Lead toxicity." Occup Med (Lond). **54**(2): 76-81.
- Gong, G., H. S. Stern, et al. (1999). "The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms." Osteoporos Int. **9**(1): 55-64.
- Gross, C., A. V. Krishnan, et al. (1998). "The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants." J Bone Miner Res. **13**(11): 1691-9.
- Grundberg, E., E. M. Lau, et al. (2007). "Vitamin D Receptor 3' Haplotypes are Unequally Expressed in Primary Human Bone Cells and Associated with Increased Fracture Risk: the MrOS Study in Sweden and Hong Kong." J Bone Miner Res **19**: 19.
- Gunes, S., C. Y. Bilen, et al. (2006). "Vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with urolithiasis." Urol Res. **34**(1): 47-52. Epub 2006 Jan 6.
- Haynes, E. N., H. J. Kalkwarf, et al. (2003). "Vitamin D receptor Fok1 polymorphism and blood lead concentration in children." Environ Health Perspect. **111**(13): 1665-9.
- Hu, H., M. Rabinowitz, et al. (1998). "Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: conceptual paradigms." Environ Health Perspect. **106**(1): 1-8.
- Ivanova, J., P. Doukova, et al. (2006). "FokI and BsmI polymorphisms of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in a random Bulgarian population sample." Endocrine. **29**(3): 413-8.
- Lips, P. (2006). "Vitamin D physiology." Prog Biophys Mol Biol. **92**(1): 4-8. Epub 2006 Feb 28.

- Loghman-Adham, M. (1997). "Renal effects of environmental and occupational lead exposure." Environ Health Perspect. **105**(9): 928-39.
- Lowe, L. C., M. Guy, et al. (2005). "Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population." Eur J Cancer. **41**(8): 1164-9. Epub 2005 Apr 14.
- Malecki, M. T., J. Frey, et al. (2003). "Vitamin D receptor gene polymorphisms and association with type 2 diabetes mellitus in a Polish population." Exp Clin Endocrinol Diabetes. **111**(8): 505-9.
- McDonnell, D. P., D. J. Mangelsdorf, et al. (1987). "Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D." Science. **235**(4793): 1214-7.
- Miyamoto, K., R. A. Kesterson, et al. (1997). "Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter." Mol Endocrinol. **11**(8): 1165-79.
- Montenegro, M. F., F. Barbosa, Jr., et al. (2006). "A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies plasma/whole blood lead ratio." Arch Toxicol. **80**(7): 394-8. Epub 2005 Dec 9.
- Morrison, N. A., J. C. Qi, et al. (1994). "Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles." Nature. **367**(6460): 284-7.
- Morrison, N. A., R. Yeoman, et al. (1992). "Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin." Proc Natl Acad Sci U S A. **89**(15): 6665-9.
- Murata, K., S. Araki, et al. (1993). "Assessment of central, peripheral, and autonomic nervous system functions in lead workers: neuroelectrophysiological studies." Environ Res. **61**(2): 323-36.
- Onalaja, A. O. and L. Claudio (2000). "Genetic susceptibility to lead poisoning." Environ Health Perspect. **108**(Suppl 1): 23-8.
- Patrick, L. (2006). "Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment." Altern Med Rev. **11**(1): 2-22.

- Pounds, J. G., G. J. Long, et al. (1991). "Cellular and molecular toxicity of lead in bone." Environ Health Perspect. **91**: 17-32.
- Rabinowitz, M. B. (1991). "Toxicokinetics of bone lead." Environ Health Perspect. **91**: 33-7.
- Risch, N. J. (2000). "Searching for genetic determinants in the new millennium." Nature. **405**(6788): 847-56.
- Roberts, J. S. and E. K. Silbergeld (1995). "Pregnancy, lactation, and menopause: how physiology and gender affect the toxicity of chemicals." Mt Sinai J Med. **62**(5): 343-55.
- Rothenberg, S. J., V. Kondrashov, et al. (2001). "Seasonal variation in bone lead contribution to blood lead during pregnancy." Environ Res. **85**(3): 191-4.
- Schutz, A., I. A. Bergdahl, et al. (1996). "Measurement by ICP-MS of lead in plasma and whole blood of lead workers and controls." Occup Environ Med. **53**(11): 736-40.
- Schwartz, B. S., B. K. Lee, et al. (2000). "Associations of blood lead, dimercaptosuccinic acid-chelatable lead, and tibia lead with polymorphisms in the vitamin D receptor and [delta]-aminolevulinic acid dehydratase genes." Environ Health Perspect. **108**(10): 949-54.
- Schwartz, B. S., W. F. Stewart, et al. (2000). "Associations of tibial lead levels with BsmI polymorphisms in the vitamin D receptor in former organolead manufacturing workers." Environ Health Perspect. **108**(3): 199-203.
- Silbergeld, E. K., J. Schwartz, et al. (1988). "Lead and osteoporosis: mobilization of lead from bone in postmenopausal women." Environ Res. **47**(1): 79-94.
- Simons, T. J. (1993). "Lead-calcium interactions in cellular lead toxicity." Neurotoxicology. **14**(2-3): 77-85.
- Staessen, J. A., C. J. Bulpitt, et al. (1994). "Hypertension caused by low-level lead exposure: myth or fact?" J Cardiovasc Risk. **1**(1): 87-97.
- Steinbock, R. T. (1979). "Lead ingestion in history." N Engl J Med. **301**(5): 277.
- Thijssen, J. H. (2006). "Gene polymorphisms involved in the regulation of bone quality." Gynecol Endocrinol. **22**(3): 131-9.

Tokita, A., H. Matsumoto, et al. (1996). "Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women." J Bone Miner Res. **11**(7): 1003-9.

Uitterlinden, A. G., H. Burger, et al. (1997). "Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knee." J Clin Invest. **100**(2): 259-63.

Uitterlinden, A. G., Y. Fang, et al. (2004). "Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms." Gene. **338**(2): 143-56.

Uitterlinden, A. G., Y. Fang, et al. (2004). "Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states." J Steroid Biochem Mol Biol. **89-90**(1-5): 187-93.

Vandevyver, C., T. Wylin, et al. (1997). "Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women." J Bone Miner Res. **12**(2): 241-7.

Woolley, D. E. (1984). "A perspective of lead poisoning in antiquity and the present." Neurotoxicology **5**(3): 353-61.

7- ANEXOS



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

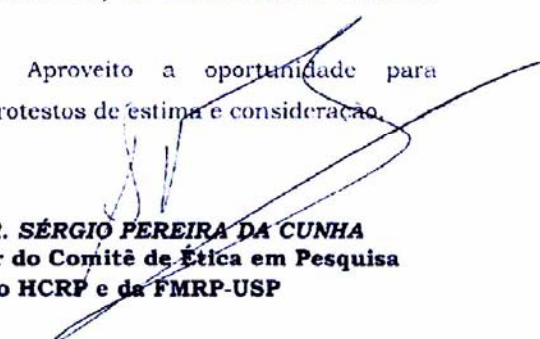
Ribeirão Preto, 24 de novembro de 2004

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

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 acido amino-levulínico), bem como os genes de enzimas que podem ser afetadas pelo chumbo (os nomes destes enzimas são: sintetases do óxido nítrico, as metaloproteinases, superóxido dismutases, glutathione peroxidases, NADPH oxidases, ligase glutamato-cisteína, metilnotetrahidrofolato 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 DESTES 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