

VANIA BRAGHINI DE REZENDE DIAS

**“RELEVÂNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS
PARA CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS E
PLASMÁTICAS DE CHUMBO NA GRAVIDEZ”**

CAMPINAS

Unicamp

2009

VANIA BRAGHINI DE REZENDE DIAS

**“RELEVÂNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS
PARA CONCENTRAÇÕES SANGUÍNEAS E
PLASMÁTICAS DE CHUMBO NA GRAVIDEZ”**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do Título de Doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

**CAMPINAS
Unicamp
2009**

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

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

D543r Dias, Vânia Braghini de Rezende
 “Relevância de polimorfismos genéticos para concentrações
 sanguíneas e plasmáticas de chumbo na gravidez” / Vânia
 Braghini de Rezende Dias. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

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

1. Haplótipos. 2. Polimorfismo. 3. Chumbo.
4. Toxicogenética. 5. Sintase do portobilinogênio. 6. Gravidez.
I. Santos, José Eduardo Tanus dos. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: “Prevalence of genetics polymorphisms to plasma and blood lead concentration in pregnant”

Keywords: • Haplotype
 • Polymorphism
 • Lead
 • Toxicogenetics
 • Porphobilinogen Synthase
 • Pregnancy

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Profa. Dra. Maricene Sabha

Prof. Dr. Eduardo de Melo Capitani

Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Profa. Dra. Carolina Araújo Rodrigues Funayama

Data da defesa: 28-07-2009

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Vania Braghini de Rezende

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Jose Eduardo Tanus dos Santos

Membros:

Professor (a) Doutor (a) João Batista Teixeira da Rocha

Professor (a) Doutor (a) Carolina Araujo Rodrigues Funayama

Professor (a) Doutor (a) Ester Silveira Ramos

Professor (a) Doutor (a) Maricene Sabha

Professor (a) Doutor (a) José Eduardo Tanus dos Santos

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/07/2009

DEPOIS DE ALGUM TEMPO

*Você aprende que
heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer,
enfrentando as consequências.*

*Aprende que
paciência requer muita prática.*

*Descobre que algumas vezes,
a pessoa que você espera que o chute, quando você cai,
é uma das poucas pessoas que o ajudam a levantar-se.*

*Aprende que a maturidade
tem mais a ver com tipos de experiências que se teve e o que se aprendeu com
elas, do que com quantos aniversários você já celebrou.*

*Aprende que
há mais de seus pais em você do que você supunha.*

*Aprende que
nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens,
poucas coisas são tão humilhantes, e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso*

*...E você aprende realmente que
pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir mais longe,
depois de pensar que não pode mais.*

E que realmente a vida tem valor diante da vida!”

por William Shakespeare

DEDICATÓRIA

Ao meu
tão amado filho Rafael e
ao meu
esposo Paulo
pelos momentos em que juntos,
retiramos as pedras e
construímos lindos castelos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. José Eduardo, pela amizade e sabedoria de mestre, sempre nos conduzindo para o caminho do bem e do conhecimento. Hoje sei que o crescimento de fato dói e que estamos sempre crescendo, mas é durante esse processo que encontramos os verdadeiros amigos.

Aos meus queridos colegas de laboratório, que se tornaram meus filhos de coração: Valzinha, Stêfany, Alisson e Vanessa. Especialmente a minhas queridas amigas Caroline, Juliana, Joyce, Élen, Tatiane, Ana Carol e Flávia, Vanessa Fontana e Pâmela, pelas conversas e pelo aprendizado.

Ao Jefferson, pelo auxílio nas coletas e análises.

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

A uma amiga especial Dionéia, por ter sido tão pronta em me auxiliar no momento em que muito precisei. Serei eternamente grata!

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

À equipe da MATER, onde plantei amizades que levarei por toda minha vida, especialmente à Clarice do SAME.

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

E, aos meus pais Francisco e Luna, tão queridos e sempre presentes em minha caminhada. Obrigada mãezinha, pela amizade, força e carinho. Paizinho, você é uma luz que brilha em minha vida, obrigada pelo carinho, pela torcida e conselhos que sempre guardo no meu coração. Sem dúvida, vocês sempre serão meus eternos alicerces.

Mulheres grávidas constituem um grupo de indivíduos particularmente mais susceptíveis aos efeitos tóxicos associados ao chumbo (Pb)[1]. O chumbo é um metal pesado que se acumula nos tecidos mineralizados. Possui um comportamento similar ao cálcio, o que explica sua toxicidade. Durante a gravidez, o remodelamento ósseo promove a migração do chumbo para o plasma e como resultado, o metal é transferido para o feto, mesmo se a mãe foi exposta há vários anos [2].

Durante a exposição materna, cerca de 99% do chumbo absorvido, aqui referenciado como Pb-Sangue Total, permanece associado a enzima ácido δ-aminolevulinico desidratase (ALAD) no eritrócito. O restante (cerca de 1%), aqui referenciado como Pb-Plasma (e/ou Soro), permanece livre e eventualmente se deposita nos tecidos mineralizados (ossos e dentes)[2]. O Pb-Sangue Total e Pb-Plasma (ou Soro) são naturalmente correlacionados, mas essa correlação ainda não está bem compreendida, sendo essencial a medida dos dois parâmetros para esclarecer esses processos. Além disso, os fatores genéticos são de crucial importância, com alguns genes como o da ALAD e o do receptor da vitamina D (VDR) tendo sido associados a diferentes concentrações sanguíneas e plasmáticas de chumbo em indivíduos expostos[3].

A dinâmica do chumbo durante a gravidez também tem um papel importante nesse processo e deve ser considerada. Até o momento, nenhum trabalho havia estudado os fatores genéticos acima citados, numa população especialmente exposta e susceptível aos efeitos deletérios do chumbo. Mesmo quando a exposição materna cessa, o chumbo permanece alojado nos ossos por vários anos e será mobilizado através do remodelamento ósseo, contaminando o feto. Haveria um grupo de gestantes, segundo genótipos, predisposto a maiores ou menores aumentos do metal no plasma e fração plasmática? Teriam maior re-exposição ao chumbo durante períodos de acentuado remodelamento ósseo?

Para responder a essas questões, esse estudo concentrou nas medidas do metal no Sangue e Plasma e/ou Soro (sendo o Soro equivalente ao plasma) e na avaliação da susceptibilidade genética das grávidas através do estudo dos

polimorfismos dos genes ALAD e VDR, além da análise de polimorfismos agrupados em haplótipos.

Nós não encontramos diferenças significativas para o grupo de genótipos da ALAD, nem mesmo para os genótipos do VDR. Porém, as principais descobertas foram que o grupo de haplótipos H8 do VDR (*f, a, b*) estão associados às mais baixas concentrações de Pb no Soro e na razão Pb-Soro/Pb-Sangue Total. Esses resultados sugerem que esse grupo de gestantes, mesmo expostas às mesmas concentrações de Pb, acumula e/ou reabsorvem menos Pb que os grupos com outros haplótipos. Além disso, é importante ressaltar que analisando apenas a concentração de Pb no sangue total, não seria possível chegar a essa conclusão.

Pregnant women constitute a group of subjects particularly susceptible to toxic effects due to exposure to lead (Pb). Lead is a heavy metal which accumulates in bone tissues and has a behavior that is similar to calcium, thus explaining its toxicity. In particular, the increase in bone resorption processes that take place during pregnancy cause lead migration into the maternal plasma. As a result, lead transference to the fetus may take place even years after the mother's last exposure.

During maternal exposure, most (99%) of the absorbed lead (here referred to as Pb-Blood) remains associated to δ - aminolevulinic acid dehydratase within erythrocytes. The remaining (2% to 10%, here referred to as Pb-Plasma) lead remains free and is eventually deposited - and accumulated - in the bone tissues (teeth and bones). The Pb-Blood and Pb-Plasma are naturally correlated, but the correlation is not well understood, making it essential to measure both quantities in studies aimed at clarifying these processes. Also of crucial importance are genetic factors, with some genes such as ALAD and VDR been associated with Pb-Blood and Pb-Plasma concentrations. The dynamics of lead migration during pregnancy also plays a major role in the process and therefore must also be considered. Even after the mother's exposure has ceased, lead remains accumulated in the teeth and bones for many years and is mobilized by processes of bone resorption such as those taking place during pregnancy. Is there a group of pregnant women, according to genotypes, that is more prone to higher or lower Pb concentrations in plasma? Is that group more exposed to Pb due to greater Pb absorption or reabsorption through bone remodeling?

To address these questions, this study focused on the measurement of Pb-Blood and Pb-Serum (the same of plasma) and on genetic susceptibility of pregnant women.

We found no significant differences among different ALAD or VDR genotype groups. However, the main findings reported here are that haplotype H8 of VDR (*f, a, b*) is associated with lower Pb-Serum concentration and lower

Pb-Serum/Pb-Blood ratios. Therefore, pregnant women with this haplotype have lower Pb-serum, even when exposed to the same Pb-Blood concentrations. Interestingly, we would not have made this conclusion by assessing only Pb-Blood concentrations.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%Pb-Plasma/Pb-Sangue total	fração de chumbo no plasma/chumbo no sangue total
%Pb-Soro/Pb-Sangue total	fração de chumbo no soro/chumbo no sangue total
A	Adenina
ALAD	ácido δ -Aminolevulínico desidratase (gene)
ALAD	ácido δ -Aminolevulínico desidratase- (proteína)
<i>Apal</i>	endonuclease cujo sítio de restrição é 5'-GGGCC'C-3'
<i>BsmI</i>	endonuclease cujo sítio de restrição é 3'-CTTAC'GN-5'
C	Citosina
CDC	Center for Disease Control and Prevention
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
SEM	Erro Padrão da Média
<i>FokI</i>	endonuclease cujo sítio de restrição é 3'-CCTAC`N-5'
G	Guanina
ICPMS	Espectometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
<i>MspI</i>	endonuclease cujo sítio de restrição é 5'-C`CGG-3'

<i>n</i>	número. Refere-se ao número amostral de uma população ou ao número de indivíduos retirados de uma determinada população e incluídos em um grupo de estudo para análises estatísticas
<i>NS</i>	Não Significativo
<i>P < 0,05</i>	valor de probabilidade < 0,05 estatisticamente significativo
Pb-P	Chumbo no Plasma
Pb-S	Chumbo no Soro
Pb-Sangue Total	Chumbo no Sangue Total
PCR-RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain Reaction
T	Timina
Taq	Polimerase termo-estável, isolada da bactéria <i>Thermophilus aquaticus</i>
VDR	Receptor da Vitamina D (gene)
VDR	Receptor da Vitamina D (proteína)
δ	letra do alfabeto grego de nome delta; também representado pelo símbolo Δ

	Pág.
Tabela 1 Frequência dos genótipos e haplótipos (%) nos 2 grupos étnicos e na população do Projeto HapMap (http://www.HapMap.org ; The International Haplotype Map Project).....	88
Tabela 2 Frequência de haplótipos estimada(%) nos 2 grupos étnicos na população do Projeto HapMap (http://www.HapMap.org).....	89
Tabela 3 Características dos participantes do estudo.....	97
Tabela 4 Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas, séricas e fração livre de Pb nas amostras das gestantes genotipadas para o polimorfismo G177 C (ALAD) $P>0,05$.Teste t Student.....	98
Tabela 5 Características dos participantes do estudo. Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas (Pb-Sangue Total), séricas (Pb-Soro) e fração livre de Pb (Pb-Soro/Pb-Sangue Total) nas amostras das gestantes genotipadas para os polimorfismos FokI, Apal e BsmI (VDR) $P>0,05$.Teste One Way anova.....	100
Tabela 6 Frequência haplotípica (%) estimada para os polimorfismos VDR.....	105

	Pág.
Figura 1 Retirada do chumbo da gasolina e consequente queda na concentração sanguínea do metal em crianças, no decorrer das décadas de 70 e 80[12].....	40
Figura 2 Modelo da toxicocinética do chumbo proposto por Rabinowitz e col.[2].....	42
Figura 3 Desenho esquemático da biossíntese do heme, indicando as enzimas inibidas pelo chumbo.....	43
Figura 4 Exemplo hipotético ilustrando a importância de se avaliar a fração plasmática de chumbo na gravidez. Nessa fase, a fração plasmática pode triplicar sem aumentar de forma significativa a concentração do chumbo nos eritrócitos[24].....	48
Figura 5 Análise molecular esquemática dos alelos da ALAD humana (ALAD1 e ALAD2). Mapa de restrição MspI de um fragmento do gene da ALAD, mostrando eqüências 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)[52].....	52
Figura 6 Ativação da Vitamina D e sua importância no processo de absorção de cálcio no intestino e reabsorção nos ossos[55].....	53
Figura 7 Estrutura genômica do VDR e posição de alguns polimorfismos conhecidos (modificado de Uitterlinden A. e col[56]).....	54

- Figura 8** 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 molecular padrão (100bp DNA ladder, 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..... 81
- Figura 9** Foto de um gel representativo de genotipagem para os polimorfismos VDR: *BsmI*, *Apal* e *FokI*, obtidos neste estudo. O produto de PCR foi digerido com enzimas de restrição (*BsmI*, *Apal* e *FokI* respectivamente), produzindo diferentes fragmentos resultando a genótipos específicos. Genótipos *BsmI*: *BB* (825pb), *Bb* (825, 650 175pb) e *bb* (650 e 175pb). Genótipos *Apal*: *AA*(740pb) *Aa* (740, 515 e 225pb) e *aa* (515 e 225pb). Genótipos *FokI* : *FF* (272pb), *Ff* (272 e 198) e *ff* (198 e 74pb)..... 82
- Figura 10** Valores de média ($\pm$ SEM) das concentrações de Pb (A) e Ferro (Fe) (B) em soro (Soro) e/ou plasma (Heparina), coletadas com sistemas a vácuo (vacutainer) e catheter. Média Pb-SangueTotal: 20,01 $\pm$ 2,28 μ g/L. N=12 P>0,05. One Way Anova..... 91
- Figura 11** Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações plasmáticas de Pb (A), Ferro (Fe) (B) e hemoglobina livre (Hb) (C) em soro (Soro) e/ou plasma (Heparina), coletados com sistemas vacutainer, nos intervalos de 0, 5 e 30 minutos entre a coleta e o processamento da amostra. Média Pb-SangueTotal: 18,34 $\pm$ 3,12 μ g/L. N=12..... 93

Figura 12	Valores de média ($\pm$ SEM) das concentrações plasmáticas de Pb coletados em tubos contendo concentrações crescentes de anticoagulante EDTA *P<0,05 para as concentrações 1,5X e 3,0X Média($\pm$ SEM) Pb-SangueTotal: 22,29 $\pm$ 2,47 μ g/L. N=12 One Way Anova.....	95
Figura 13	Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas (A), séricas (B) e fração livre (C) de Pb nas amostras de sangue dos respectivos cordões umbilicais.*P<0,001. Teste t Student.....	96
Figura 14	Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas (A), séricas (B) e fração livre (C) de Pb em grávidas genotipadas para ALAD P>0,05. Teste t Student.....	99
Figura 15	Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas (A), séricas (B) e fração livre (C) de Pb em grávidas genotipadas VDR-FokI (FF, Ff, ff). P>0,05 One way Anova.....	101
Figura 16	Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas (A), séricas (B) e fração livre (C) de Pb em grávidas genotipadas VDR-ApaI (AA, Aa, aa). P>0,05 One way Anova.....	103
Figura 17	Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas (A), séricas (B) e fração livre (C) de Pb em grávidas genotipadas VDR-BsmI (BB, Bb, bb). P>0,05 One way Anova.....	104
Figura 18	Variação nas concentrações sanguíneas (A), séricas (B) e fração livre (C) de Pb entre os diferentes haplótipos de grávidas P>0,05 One way Anova.....	106

	Pág.
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1- INTRODUÇÃO.....	35
1.1- O Chumbo na história e sua mais recente história no Brasil.....	37
1.2- Toxicocinética do Chumbo.....	40
1.3- O chumbo nos estoques ósseos.....	43
1.4- Toxicidade do chumbo.....	44
1.4.1-Toxicidade do Pb na gravidez: os efeitos para a criança na primeira infância.....	46
1.5- A importância do estudo do chumbo no plasma e/ou soro e fração plasmática (Pb-Plasma ou soro/Pb-Sangue Total).....	47
1.6- Toxicogenética: uma nova abordagem para o estudo de elementos tóxicos como o chumbo.....	49
1.7- Polimorfismos ALAD e contaminação por chumbo.....	50
1.8- Polimorfismos VDR e contaminação por chumbo.....	53
1.9- Estudo de haplótipos.....	56
2- HIPÓTESE.....	59

3- OBJETIVOS.....	63
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
4.1- Seleção dos voluntários e análise das amostras.....	69
4.1.1- Extração do DNA genômico.....	70
4.1.2- Determinação dos genótipos para VDR.....	70
4.1.3- Análise dos haplótipos.....	72
4.1.4- Análise estatística.....	73
4.2- Seleção dos voluntários e análise das amostras.....	73
4.2.1- Determinação de chumbo e ferro em sangue e plasma (ou soro).....	75
4.2.2- Dosagem de Hemoglobina livre (Hb).....	76
4.2.3- Análise estatística.....	77
4.3- Casuística.....	77
4.3.1- Seleção dos voluntários e análise das amostras.....	78
4.3.2- Coleta e processamento das amostras.....	78
4.3.3- Determinação de chumbo em sangue e soro.....	79
4.3.4- Extração do DNA genômico.....	79
4.3.5- Determinação dos genótipos para ALAD.....	79
4.3.6- Determinação dos genótipos para VDR.....	82

4.3.7- Análise dos Haplótipos.....	83
4.3.8- Análise estatística.....	83
5- RESULTADOS.....	85
6- DISCUSSÃO.....	109
6.1- Distribuição da frequência genotípica e haplotípica do VDR entre brancos e negros da população brasileira.....	112
6.2- Dosagem do Pb no soro e/ou plasma necessita de cuidados metodológicos.....	113
6.3- Haplótipos VDR modificam as concentrações de Pb-Soro e Fração plasmática (Pb-Soro/Pb-Sangue Total).....	114
7- CONCLUSÃO.....	121
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
9- ANEXOS.....	137
Anexo 1- Parecer do Comitê de Ética.....	139
Anexo 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	141
Anexo 3- Trabalho Publicado.....	145
Anexo 4- Trabalho Submetido.....	151

1- INTRODUÇÃO

1.1- O Chumbo na história e sua mais recente história no Brasil

O chumbo (Pb) é um metal pesado que existia em concentrações muito pequenas na natureza até que o homem deu início a extração dos metais (5000 a.C. a 1500 a.C, aproximadamente)[4]. O chumbo é altamente maleável e possui ponto de fusão relativamente baixo (em torno de 327°C), o que o transformou no metal mais utilizado na fabricação de armas e ferramentas da época. Há relatos que a corrida pela extração do metal começou em 3000 a.C pelos chineses e em 2000 a.C os fenícios já o exploravam próximo da 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[5].

Durante o Império Romano, houve um aumento da concentração do metal na crosta terrestre. Nessa época, o chumbo era tão fundamental para a sociedade romana, que descrições sobre a invasão do norte da Europa pelos romanos teria também o objetivo de conseguir mais fontes de minério de chumbo (a galena), muito comum na Grã-Bretanha[5-7]. A presença de chumbo, 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 imperadores da época[8].

O período seguinte de aumento das concentrações de chumbo na natureza foi durante a Revolução Industrial Européia nos séculos XVIII e XIX, devido à sua aplicação em vários processos industriais. Por volta de 1919, houve uma médica patologista que levantou a questão sobre a intoxicação de trabalhadores que inalavam poeiras contendo chumbo. Doutora Alice Hamilton foi a pioneira a focar os problemas de saúde do trabalhador sob um ângulo médico-epidemiológico[6]. No entanto, em 1923, com o advento da indústria automobilística e contra as recomendações de Hamilton, compostos orgânicos de chumbo (chumbo tetraetila) foram introduzidos como aditivo da gasolina, o que contribuiu de forma considerável para mais um pico da concentração no ambiente[9].

Nos países desenvolvidos, como os Estados Unidos, a retirada do chumbo da gasolina começou no final da década de 70[10, 11]. A fase de substituição do chumbo da gasolina pelo álcool etílico englobou políticas energéticas, industriais e sociais. Essas modificações atingiram também o meio ambiente por levar a uma redução do chumbo emitido pela combustão dos combustíveis. Houve uma redução de cerca de 77% as altas concentrações de chumbo em crianças nascidas entre 1976 e 1991[9, 12] (figura 1).

Além da gasolina, outras fontes também contribuíram para o aumento da exposição ao chumbo, como o uso do metal em tintas, soldas, fabricação de acumuladores, pigmentos e em alguns processos na indústria civil[13]. Vários desses processos ainda representam fonte de exposição. Um exemplo é o uso do chumbo nas tintas. Embora tenha sido proibido, ainda existem casas que foram pintadas com tintas contaminadas e quando são demolidas ou reformadas, representam mais uma fonte de exposição especialmente para as crianças.

A contribuição do Brasil na produção e emissão do metal para o meio ambiente é pequena, somos produtores de cerca de 0,003% da produção mundial com fabricantes de baterias, óxidos e pigmentos e setores elétricos e eletrônicos[10]. Porém, entre 1960 e 1993 houve um fato de grande impacto para o meio ambiente e para a saúde humana. 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[14, 15]. A indústria produzia ligas de chumbo a partir do minério das minas, utilizando um processo metalúrgico que resultou no lançamento para atmosfera de subprodutos indesejáveis, além de gerar e dispor no solo, ao longo de três décadas, cerca de 500.000 toneladas de escória, onde predominava metais pesados, como chumbo. A população ainda trouxe essas escórias para as casas, dispondo-as nas ruas como forma de aterro. Essa tem sido uma das principais formas de exposição à contaminação, em razão do contato direto das crianças. Atualmente, mesmo com a retirada da indústria, a população ainda apresenta altos índices de chumbo no sangue. A população vem sofrendo há mais de 30 anos com as consequências da

poluição e contaminação por chumbo em nível endêmico. Os sintomas associados à contaminação são diversos como, problemas auditivos, indisposições, sonolência, cansaço, dores articulares, problemas respiratórios, complicações pulmonares, renais, cardiovasculares, músculo-esquelético, do sistema nervoso, perda de memória e dificuldade de aprendizagem por perda do desenvolvimento neurocognitivo[15].

Um outro relato ocorreu em Bauru, estado de São Paulo. Em 2002, uma indústria de acumuladores foi interditada devido à emissão de partículas de chumbo para o meio ambiente acima do permitido, segundo normas da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Foram detectados dejetos contendo sal de óxido de chumbo e sulfato de chumbo na poeira e no solo. Havia contaminação no sangue de 50 crianças, em um total de 79 amostras analisadas[10]. A contaminação foi constatada na região vizinha à metalúrgica. Nesses exames, a quantidade de chumbo no sangue foi superior a 10µg/dL, o máximo permitido pela Organização Mundial de Saúde (OMS)[10]. A população de Bauru foi estudada por nosso grupo, onde encontramos concentrações médias de chumbo no sangue em torno de 7,3ug/dL e concentrações médias de chumbo no plasma em torno de 0,53ug/L[16, 17]. Esses valores indicam contaminação recente e tardia.

Outra evidência de contaminação no Brasil, também demonstrada por nosso grupo de trabalho, foi a detecção de concentrações relativamente altas de chumbo acumulado nos dentes na região de Ribeirão Preto. Esses dados demonstram que no Brasil as crianças podem estar expostas a concentrações altas de chumbo em alguns ambientes, particularmente em regiões industrializadas de cidades[18].

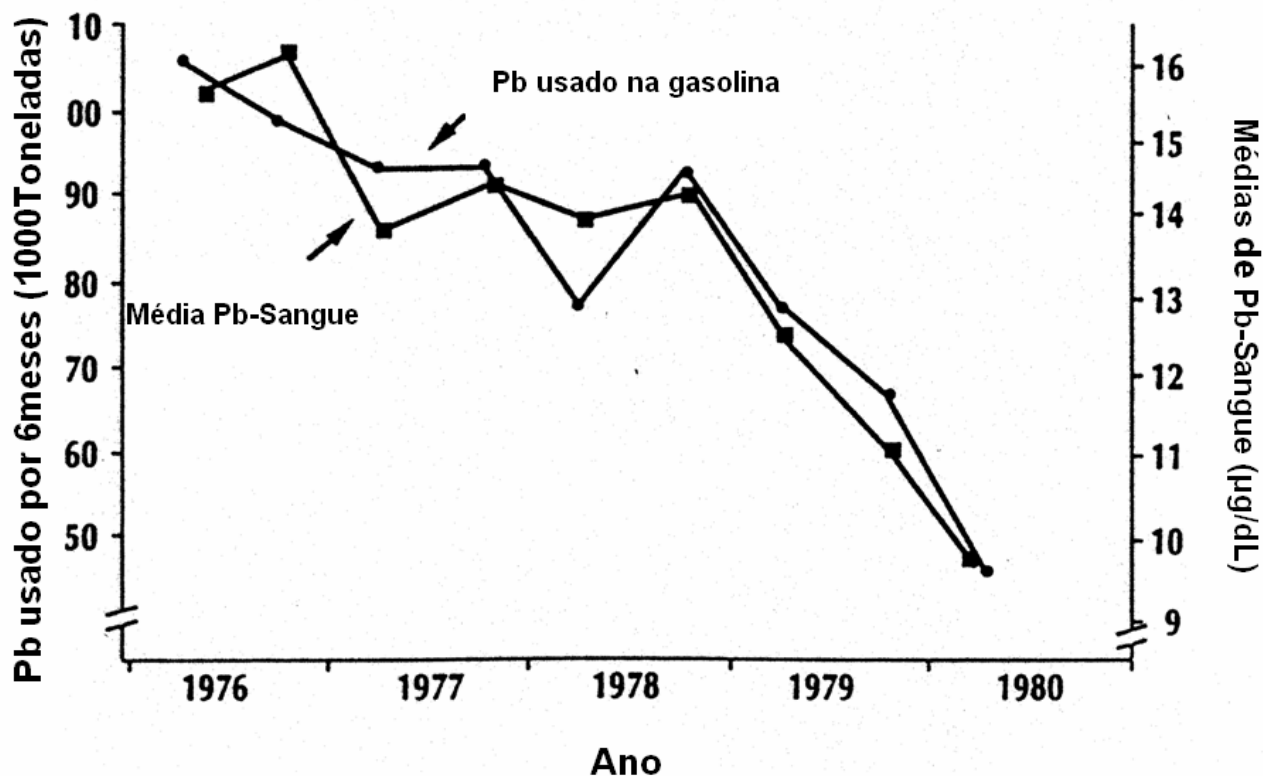


Figura 1- Retirada do chumbo da gasolina e consequente queda na concentração sanguínea do metal em crianças, no decorrer das décadas de 70 e 80[12].

1.2- Toxicocinética do chumbo

A cinética do chumbo ainda não foi completamente esclarecida, mas o que se conhece até o momento esclarece alguns aspectos da toxicidade do metal.

A figura 2 mostra um modelo proposto por Rabinowitz e colaboradores[2]. O contato com o metal se dá principalmente através das vias respiratória e gastrointestinal. Uma vez absorvido, cerca de 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[2, 9]. O chumbo possui alta afinidade pelo ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD), uma enzima eritrocitária dependente de

zinco (Zn), que está envolvida no processo de síntese do grupamento heme. O ácido aminolevulínico (ALA) é um dos indicadores de exposição ao metal, pois o chumbo com a capacidade de deslocar o Zn de sua estrutura leva a inibição enzimática. Além da ALAD, o chumbo também inibe outras duas enzimas envolvidas nesse processo: a coproporfirinogênio oxidase e a ferroquelatase. Desta forma, um dos efeitos da intoxicação pelo chumbo é a anemia[19] (figura 3).

Enquanto o chumbo está ligado a ALAD no eritrócito, uma pequena fração do metal (cerca de 1% do sangue total) fica livre no plasma e disponível para atravessar as membranas biológicas[20]. As concentrações plasmáticas de chumbo são muito pequenas, comparadas às concentrações de chumbo no sangue total, porém, é o melhor parâmetro para se avaliar concentrações do metal no organismo.

Por se tratar de um metal estranho ao organismo, o chumbo é complexado por macromoléculas sendo absorvido, distribuído e pouco excretado. Vários fatores podem alterar a absorção, a distribuição e o depósito do metal no organismo. A absorção pelo trato gastrointestinal pode ser alterada por baixas ingestões de cálcio ou ferro na dieta, o que leva a um aumento na absorção do chumbo. O mesmo é verdadeiro para uma alimentação deficiente em fósforo e proteínas[21].

A excreção do chumbo é pequena pelo fato de se acumular no organismo. O pouco que é excretado se dá principalmente através da excreção renal e a gastrointestinal[21].

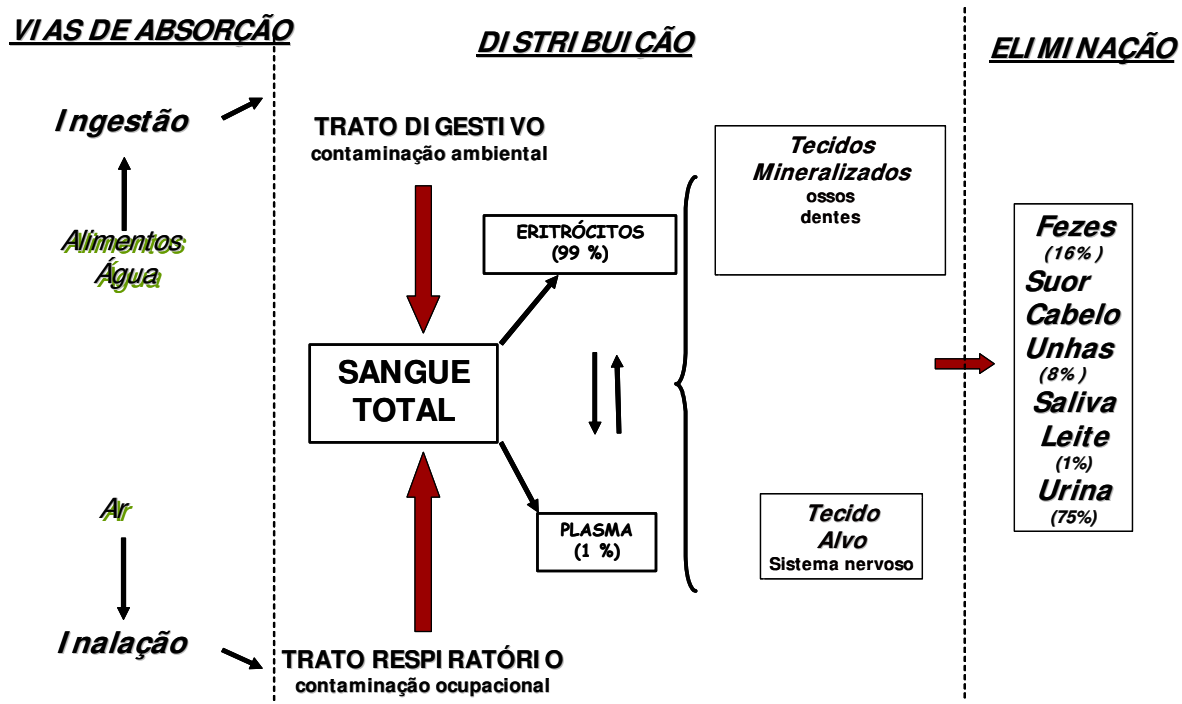


Figura 2- Modelo da toxicocinética do chumbo proposto por Rabinowitz e col.[2].

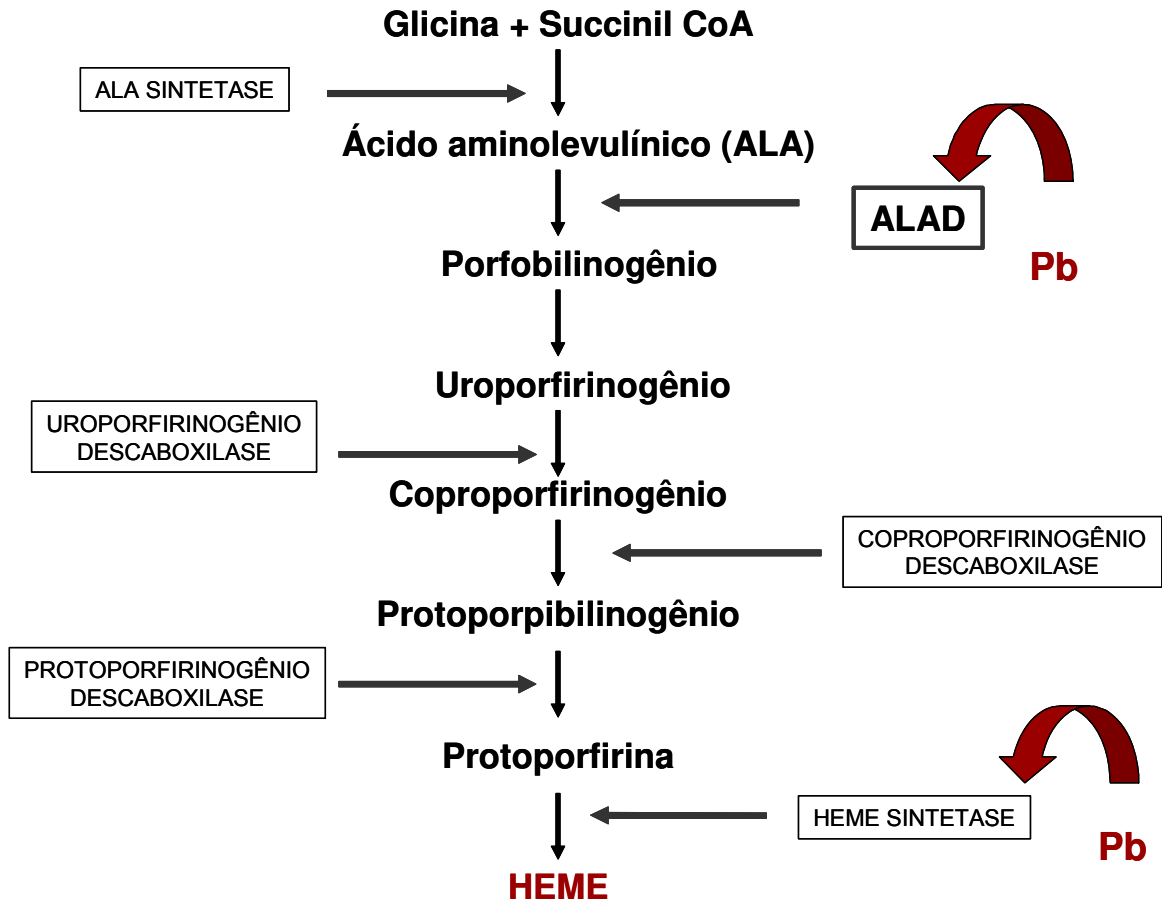


Figura 3- Desenho esquemático da biossíntese do heme, indicando as enzimas inibidas pelo chumbo.

1.3- O chumbo nos estoques ósseos

O chumbo e o cálcio possuem similaridades químicas. Essa é a razão pela qual o metal se acumula nos tecidos que são mais ricos em cálcio[22].

A fração livre do chumbo representa a fração disponível para atravessar as membranas biológicas. É essa fração que distribui o metal para os tecidos, promovendo os efeitos deletérios, mas grande parte se desloca especialmente para os ossos onde poderá ficar alojado por diversos anos, segundo Rabinowitz[2]. O termo “estoque” pode não ser adequado para se referir

às concentrações do metal nos ossos. O termo correto seria “tempo de residência”. Isso porque, o tecido ósseo pode remodelar durante a vida, especialmente durante fases como infância, gravidez, lactação e menopausa[23].

É importante ressaltar que concentrações do metal no sangue refletem exposições recentes, uma vez que a meia vida do metal é de apenas 30-35 dias. O chumbo residente nos ossos, quando remodelados, retorna à circulação, indo preferencialmente para o plasma. Existe uma associação das variações do metal nos ossos com variações das concentrações plasmáticas de chumbo, sem variar de forma significativa as concentrações do chumbo no sangue[24]. Desta forma sugere-se que a fração plasmática reflete o metal que está sendo remodelado dos ossos referindo-se a exposições passadas. Este é um parâmetro mais adequado para avaliação das concentrações de chumbo no organismo. Atualmente, a toxicidade do chumbo é medida através das concentrações do metal no sangue total. O CDC (Center for Disease Control and Prevention), em 1991 determinou a concentração de 10µg/dL como sendo a concentração de intervenção para crianças e grávidas. Porém, ainda não existe um valor de referência para concentrações plasmáticas de chumbo. O que se sabe até o momento é que concentrações cada vez menores do metal no sangue total vêm sendo associadas a diversos danos a saúde[25][26].

1.4- Toxicidade do chumbo

A toxicidade do chumbo se deve principalmente aos seus efeitos sobre a ALAD e seus efeitos sobre os mecanismos que envolvem o cálcio[9].

Conforme mencionado anteriormente, o chumbo pode causar anemia por inibir a síntese do grupamento heme da hemoglobina (figura 3).

Os efeitos sobre a ALAD levam ao aumento da concentração do substrato ALA (ácido aminolevulínico) que é altamente neurotóxico. ALA é o precursor do heme que se acumula no organismo, resultado de algumas

doenças como a Porfíria Aguda Intermitente e intoxicação por chumbo. Essa molécula atravessa as barreiras das membranas celulares. O mecanismo através do qual a toxicidade ocorre ainda não está claro, mas a ALA tem mostrado afetar os sistemas glutamaérgico (um dos mais abundantes do sistema nervoso central, onde o agonista é o glutamato) e GABAérgico, inibindo as atividades da Na/K AtPase e adenilato ciclases[27]. O resultado envolve manifestações clínicas em nível de sistema nervoso periférico e central[28]. O acúmulo de ALA também leva a danos na membrana celular através da formação de EROs (espécies reativas de oxigênio) como hidroperóxidos, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio. Além disso, ainda promove a depleção do sistema antioxidante, que é o sistema de defesa contra essas EROs[9, 29].

O chumbo possui uma forte afinidade pelo grupo sulfidrílico (SH) do aminoácido cisteína. A ligação com os grupos sulfidrílicos resulta na depleção da glutathione. A glutathione é constituída de glutamato, cisteína e glicina e possui atividade química através do grupo SH. Apresenta-se normalmente na forma reduzida, porém, pode oxidar-se formando pontes dissulfeto entre duas moléculas. Possui um papel muito importante como antioxidante, pois sequestra radicais livres além de ser um dos substratos responsáveis pelo metabolismo de conjugação de drogas e toxinas específicas no fígado[9, 30]. O chumbo pode interagir com o grupo SH dessa molécula, prejudicando sua função[31].

Durante a gravidez, além dos efeitos da ALA sobre o sistema nervoso do feto (fase esta altamente vulnerável), a toxicidade do chumbo também está ligada ao metabolismo do cálcio. Como há uma extensa variabilidade de processos que são dependentes de cálcio nessa fase, tem-se uma idéia dos prejuízos gerados pelo metal.

1.4.1- Toxicidade do Pb na gravidez: os efeitos para a criança na primeira infância

Um dos nutrientes mais essenciais para o crescimento do feto é o cálcio. Como o chumbo consegue ocupar suas rotas, fica claro que a placenta não restringe sua entrada para o feto e este, por sua vez, o incorpora como se estivesse incorporando o cálcio. Assim, os níveis de Pb no cordão umbilical estão correlacionados com os níveis maternos[32].

A vida no útero pode ser o período mais vulnerável à intoxicação pelo Pb. A placenta é permeável ao metal e a transferência se dá especialmente no último trimestre da gravidez. A placenta geralmente é descrita como uma interface entre o organismo materno e o ambiente onde o feto se desenvolve. Substâncias atravessam a placenta por mecanismos de transporte que nosso organismo se dispõem: transporte ativo, pinocitose e difusão simples. A principal função é proporcionar os nutrientes adequados para que o feto se desenvolva sem prejuízos. A placenta tem mecanismos que aumentam o transporte daquelas substâncias que são necessárias e restringem aquelas que são prejudiciais[33].

O chumbo interfere na função neurotransmissora no sistema nervoso central bloqueando a entrada de cálcio nas terminações nervosas[34]. Além disso, o metal interfere no sistema catecolaminérgico e induzindo alterações em enzimas como etanolamina-N-metiltransferase e colina acetiltransferase[35]. O chumbo também modifica a captação mitocondrial provocando a diminuição da produção de energia, prejudicando o funcionamento da bomba de cálcio e sódio[34].

Toda essa dinâmica ainda não está esclarecida como está claro as consequências dessa exposição. Vários trabalhos já demonstraram que a exposição materna pode causar sérios danos para o desenvolvimento intelectual da criança logo na primeira infância[9, 33, 34, 36, 39]. Num estudo em crianças em idade pré-escolar que estiveram expostas a níveis moderados de chumbo (superiores a 20ppm na dentina) verificou-se que a desistência no ensino secundário era sete vezes maior e verificando-se uma capacidade para a leitura

seis vezes menor do que crianças expostas a níveis mais baixos. Crianças expostas a níveis mais elevados também demonstravam problemas de atenção, falta de vocabulário e dificuldades gramaticais. Um outro estudo verificou que crianças 2 a 3 anos mais velhas do que as anteriores e com níveis sanguíneos de chumbo superiores a 15µg/dL tinham maior tendência para apresentarem problemas de sono, eram cinco vezes mais agressivas, quatro vezes mais destrutivas e duas vezes e meia mais propensas a problemas somáticos do que crianças com níveis inferiores a 15µg/dL[40].

1.5- A importância do estudo do chumbo no plasma e/ou soro e fração plasmática (Pb-Plasma ou soro/Pb-Sangue Total)

A recomendação do CDC, nos Estados Unidos (Centro para Controle e Prevenção de Doenças) para o diagnóstico de exposição ao chumbo é a determinação do metal no sangue total. Concentrações de até 10µg/dL de chumbo no sangue (Pb-Sangue Total) são consideradas como níveis de intervenção[41]. No entanto, nos últimos anos, essas recomendações têm sido revistas. Estudos epidemiológicos vêm demonstrando associações inversas entre concentrações de chumbo no sangue inferiores a 10µg/dL a déficits de atenção e diminuição do QI em crianças na idade escolar[42, 43]. A maioria desses estudos tem como parâmetro, concentrações sanguíneas de chumbo.

A cinética do chumbo tem um papel importante a ser considerado. A meia vida no sangue é de 35 dias, indo preferencialmente se alojar nos tecidos ósseos, onde pode permanecer por diversos anos. Durante o remodelamento ósseo que ocorre, por exemplo, na gravidez, esses estoques vão preferencialmente para o plasma, alterando essa fração de modo independente do sangue total. Sendo assim, a dosagem do chumbo no sangue reflete exposição recente e o plasma, quando há remodelamento ósseo, exposições passadas [2, 20].

A figura 4 mostra de maneira didática que analisando apenas as concentrações de chumbo no sangue na gravidez, muitas vezes, não temos idéia das frações plasmáticas aumentadas devido ao remodelamento ósseo[24]. Na figura, são descritas as concentrações do chumbo no sangue e plasma de duas mulheres, sendo que uma delas está grávida. As concentrações do metal no sangue são equivalentes, mas devido ao remodelamento ósseo, a grávida apresenta uma fração plasmática maior que a não grávida. Além disso, é o metal livre no plasma que atravessa a placenta e contamina o feto. Dessa forma, fica claro a importância de se avaliar essa fração durante a gravidez.

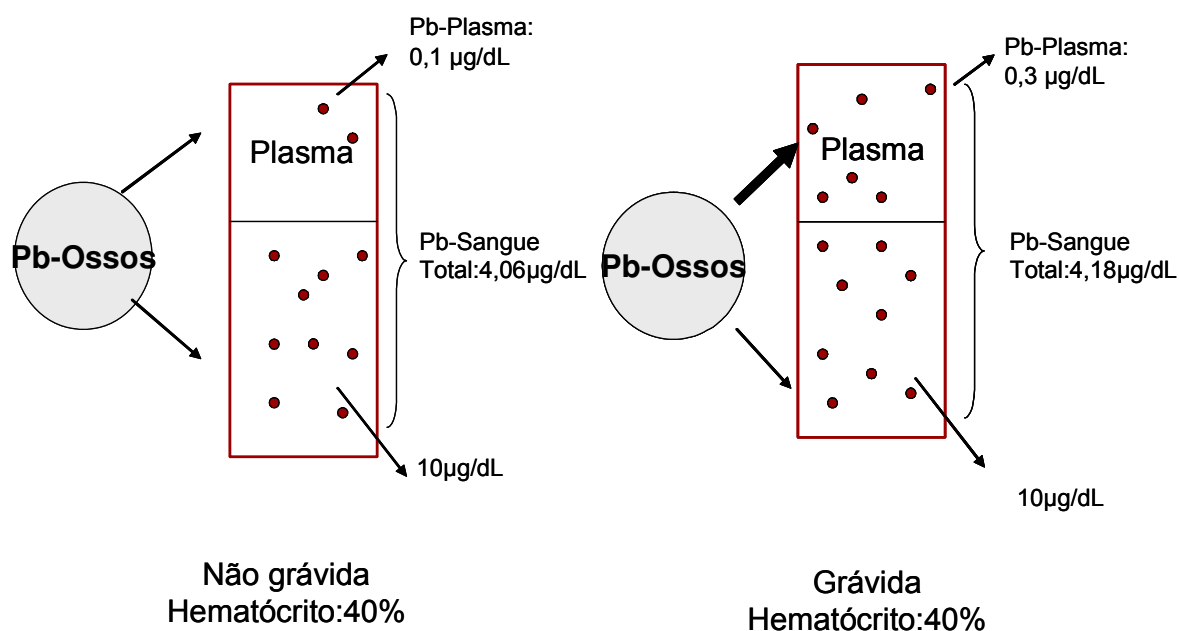


Figura 4- Exemplo hipotético ilustrando a importância de se avaliar a fração plasmática de chumbo na gravidez. Nessa fase, a fração plasmática pode triplicar sem aumentar de forma significativa a concentração do chumbo nos eritrócitos[24].

Entretanto, existe mais um fator importante que deve ser considerado nesse processo. Alguns genes estão associados à cinética do chumbo e podem alterar a susceptibilidade de cada indivíduo por apresentarem polimorfismos genéticos[3].

Apesar das medidas tomadas no sentido de proteger um indivíduo dos efeitos nocivos do metal, muitas vezes ele pode não estar completamente protegido. Atualmente, além dos estudos sobre a cinética e dinâmica do chumbo, há uma nova área surgindo: a Toxicogenética.

1.6- Toxicogenética: uma nova abordagem para o estudo de elementos tóxicos como o chumbo

As diferenças na expressão de vários genes entre populações e entre indivíduos de uma população podem ser delineadas pelo estudo de polimorfismos genéticos, os quais podem afetar funções protéicas. Isso pode determinar uma maior ou menor susceptibilidade de indivíduos ou grupos populacionais quanto ao desenvolvimento de determinadas doenças após a exposição a um agente toxicológico[44].

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 timina) em regiões do gene que codificam aminoácidos (exons), podendo causar uma correspondente substituição de um aminoácido por outro, podendo alterar a estrutura e/ou função da proteína correspondente. Alguns polimorfismos desse tipo são chamados de SNPs e são os mais comuns[44]. A análise de polimorfismos em estudos de exposição a toxinas ambientais tem tido sua importância, pois muitas vezes pessoas com diferentes “backgrounds” genéticos apresentam variações nas concentrações de chumbo no sangue e em diferentes tecidos. Conhecer a base genética e sua

relevância para a exposição ao chumbo é importante tanto para saber se aquela população tem um risco “aumentado” de exposição, ou para ver se, pela presença de um ou outro polimorfismo poderá trazer consequências para os níveis de chumbo encontrados nos tecidos ou fluidos biológicos.

A busca de fatores genéticos associados a cinética do chumbo levou ao estudo dos genes do Ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD) e do receptor da vitamina D (VDR)[3].

1.7- Polimorfismos ALAD e contaminação por chumbo

A enzima ALAD, à qual o chumbo se liga com grande afinidade, é uma metaloenzima composta de oito subunidades idênticas e oito átomos de zinco, que são essenciais à atividade enzimática (figura 5)[45]. Como o chumbo desloca o Zn, a atividade da ALAD é inibida[46]. Diversas dúvidas surgiram sobre o local onde o chumbo de fato se ligava no eritrócito. Sabia-se que cerca de 90% a 99,0% do metal estavam ligados à membrana dos eritrócitos e as frações protéicas. Até o início da década de 90, acreditava-se que a hemoglobina era principal proteína a que o chumbo se ligava, além de outras proteínas de baixo peso molecular nos eritrócitos. Entretanto, Bergdahl e colaboradores[47] concluíram que o chumbo se ligava ao ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD), sugerindo que o conceito de que o Pb se ligava primeiramente à hemoglobina deveria ser revisto[48].

A enzima ALAD é codificada por um gene localizado no cromossomo 9q34. Esse gene possui vários polimorfismos ao longo de sua extensão, mas existe um que tem sido bastante estudado e especialmente citado por modificar a susceptibilidade individual à toxicidade do chumbo[46]. Na região compreendida entre o íntron 3 e o éxon 4 (figura 5), ocorre o polimorfismo, especificamente na posição 177. Esta posição possui o nucleotídeo “G” (Guanina), que é substituído por “C” (citosina) no alelo polimórfico. Esta substituição altera o

códon comum “AAG”, para o códon mais raro “AAC”, que substitui o aminoácido lisina (AAG) por asparagina (AAC), na posição 59 da proteína ALAD (K59N). Esse polimorfismo é identificado como: *G177C*. Esse polimorfismo resulta em 2 alelos: ALAD 1 e ALAD 2 e são reconhecidos pela enzima de restrição *MspI*.

O cDNA do gene da ALAD foi clonado por Wetmur e colaboradores[49]. O alelo ALAD2, que é o menos frequente, ocorre de entre 5 a 20% de populações caucasianas e mais raramente em populações de descendentes africanos e asiáticos[50, 51]. A expressão destes genótipos (ALAD 1-1, 1-2, e 2-2) resulta em três formas distintas de enzimas. Os genótipos são identificados pela técnica de eletroforese[50]. A expressão da ALAD2 resulta 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, eletricamente neutro. Como o Pb possui carga positiva, a ALAD mais eletronegativa apresenta maior afinidade pelo metal. Foi a partir dessa idéia que surgiram os primeiros estudos sobre susceptibilidade individual a intoxicação pelo chumbo.

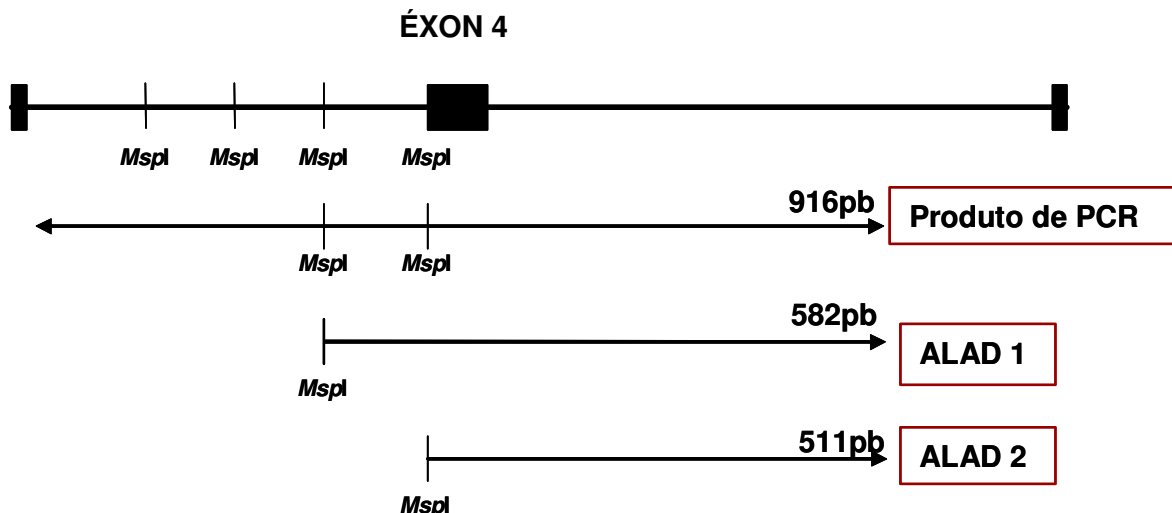


Figura 5- Análise molecular esquemática dos alelos da ALAD humana (*ALAD1* e *ALAD2*). Mapa de restrição *MspI* de um fragmento do gene da ALAD, mostrando sequências exônicas (caixas sólidas) e intrônicas (linha sólida); seguintes: produto de PCR amplificado com 916 nucleotídeos; produto amplificado digerido com *MspI*, resultando em 582 ou 511 nucleotídeos (*ALAD1* e *ALAD2*, respectivamente)[52].

1.8- Polimorfismos VDR e contaminação por chumbo

O estudo de genes relacionados ao processo de remodelamento ósseo na gravidez deve ser considerado. A vitamina D atua como potente regulador do metabolismo ósseo. As duas principais formas da Vitamina D são: Colecalciferol ou Vitamina D3, que é formada na pele após exposição aos raios UV, e Ergocalciferol ou Vitamina D2, que é obtida através dos alimentos[53]. 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, local onde são finalmente ativadas. A forma ativa da Vitamina D é $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e exerce seus efeitos no organismo através da ligação a um receptor nuclear específico presente em diversos tecidos, o Receptor da vitamina D (VDR)[53]. Essa interação promove um aumento na

concentração fisiológica de cálcio por dois mecanismos: aumentando a absorção de cálcio pelo intestino e promovendo a expressão de proteínas carregadoras de cálcio como a calbindin.

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[54]. Dessa forma, o metabólito ativo da Vitamina D, as enzimas responsáveis pela sua ativação e o VDR formam o sistema endócrino da Vitamina D (figura 7). Esse sistema está diretamente relacionado ao metabolismo ósseo. Como o chumbo possui semelhança bioquímica com o cálcio, acredita-se que tanto a absorção quanto a reabsorção do chumbo são regidos pelo sistema endócrino da vitamina D.

Sabe-se que fatores genéticos podem influenciar o *turnover* e a densidade óssea. Por esse motivo, alterações genéticas no receptor da vitamina D (VDR) também têm sido associadas a diferentes concentrações de Pb no sangue.

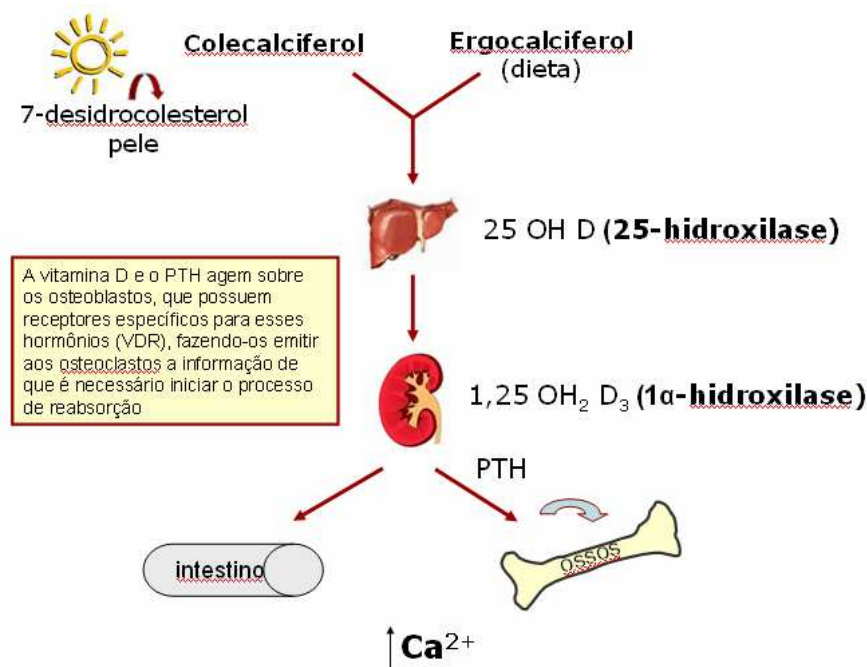


Figura 6- Ativação da Vitamina D e sua importância no processo de absorção de cálcio no intestino e reabsorção nos ossos[55].

O *VDR* situa-se no cromossomo 12 e possui cerca de 100kb e uma extensa região promotora capaz de gerar múltiplas transcrições tecido-específicas. Cerca de 100 polimorfismos são esperados ao longo desse gene, no entanto, apenas alguns são conhecidos e estudados (figura 8). Dentre eles encontram-se aqueles que são reconhecidos pelas enzimas de restrição: *BsmI*, *ApaI* e *FokI*, recebendo essa denominação[56]. Polimorfismos *VDR* já foram associados a diversas doenças[57] e também a diferentes concentrações de Pb no sangue e plasma de indivíduos expostos[16, 58, 59].

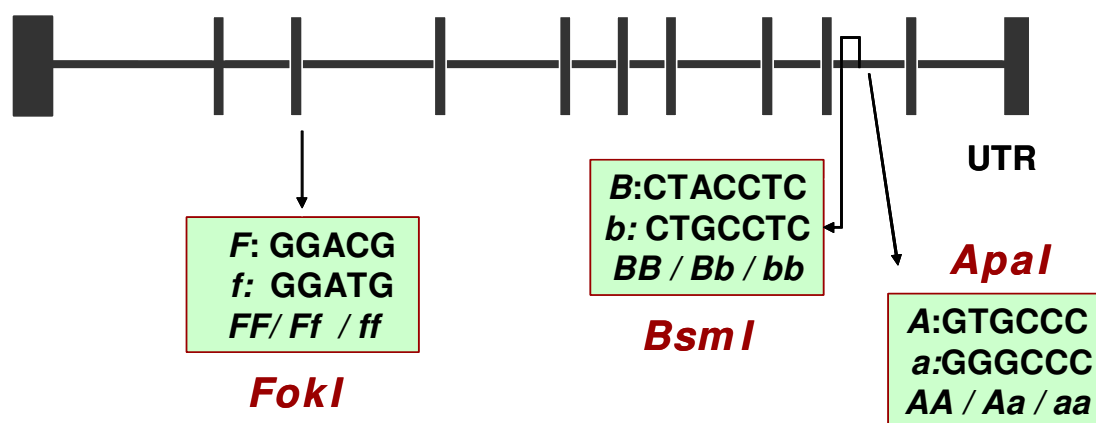


Figura 7- Estrutura genômica do *VDR* e posição de alguns polimorfismos conhecidos (modificado de Uitterlinden A. e col[56]).

O polimorfismo *BsmI* (rs1544410) situa-se no intron 8 e é caracterizado pela substituição de um nucleotídeo A por G (adenina por guanina)[60]. No mesmo intron 8, localiza-se o outro polimorfismo, *ApaI* (rs7975232) que se caracteriza pela substituição de uma T por G (timina por guanina). 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). 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)[61]. Essa diferença estrutural pode alterar a função do VDR e consequentemente 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, foram avaliados por diversos estudos de associação demonstrando a influencia destes polimorfismos sobre diversas doenças[62-67]. Entretanto, os resultados obtidos nos vários estudos de associações para um mesmo polimorfismo não são conclusivos. Uma possível causa destas inconsistências seria decorrente do fato de que na maioria destes estudos, não é levado em consideração que os SNPs não são independentes um dos outros. Na verdade, SNPs que estão fisicamente próximos no DNA são geralmente herdados juntos, ou seja, quando uma nova mutação ocorre numa posição do genoma ela é transmitida para a próxima geração, juntamente com outros variantes de *loci* próximos. O bloco de alelos co-herdados é chamado de haplótipo. Este fenômeno é chamado de desequilíbrio de ligação (DL), sendo que quanto menor a distância entre os variantes, menor a probabilidade de sofrerem recombinação, portanto maior é o desequilíbrio de ligação[68, 69].

Atualmente, acredita-se que a análise simultânea de um conjunto de polimorfismos numa dada região do gene - haplótipo - seja mais informativa do que a análise individual de cada polimorfismo.

1.9- Estudo de haplótipos

Haplótipos são combinações de alelos de diferentes marcadores genéticos presentes ao longo de um mesmo cromossomo e consequentemente herdados em unidade. Mostra-se de grande importância, pois podem fornecer informações sobre recombinação do DNA em um cromossomo[68], quando os polimorfismos estão presentes no mesmo cromossomo. No caso do nosso estudo, foi necessário a utilização de uma ferramenta estatística para estimar o grupo de haplótipos, uma vez que não temos os pais das gestantes em estudo[70].

O Projeto HapMap é um projeto internacional de mapas de haplótipos[69, 71]. Ao longo dos 6 anos de existência tem sido uma ferramenta importante para o entendimento dos componentes genéticos envolvidos em fenótipos complexos pelo estudo do desequilíbrio de ligação (DL). A extensão e localização dessas regiões é base do desenvolvimento de um conjunto de SNPs capazes de detectar associação por alto DL. O desafio de estabelecer o HapMap como padrão para pesquisas é questionado pela demonstração que a distribuição dos blocos haplotípicos diferem entre grupos populacionais devido a fatores genéticos e demográficos.

A população brasileira possui um histórico de alta miscigenação, que certamente interfere nos padrões de DL, questionando a aplicação direta desses, assim chamados, tagSNPs selecionados a partir da população do HapMap.

O primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar distribuição dos polimorfismos *VDR* (*BsmI*, *ApaI* e *FokI*) isoladamente e em haplótipos, em uma população de brancos e negros no Brasil e compará-la com a distribuição desses mesmos polimorfismos na população estudada e publicada no HapMap.

Além disso, considerando a afinidade do Pb pela ALAD no eritrócito e que a fração plasmática representa o metal livre no plasma, sugere-se que mesmo pequenas hemólises ocorridas no processamento das amostras poderão modificar a leitura do chumbo no plasma. Testar as técnicas de coleta, o uso dos

anticoagulantes e o tempo entre a coleta e o processamento das amostras foi o segundo objetivo dessa tese.

Finalmente, como os polimorfismos nos gene ALAD e VDR podem estar associados a cinética do chumbo, avaliar a influência desses fatores sobre as concentrações sanguíneas e plasmáticas do metal na gravidez pode ser útil na identificação de uma população mais susceptível aos efeitos nocivos do metal, mesmo em baixas concentrações. Esse foi o foco central dessa tese.

2- HIPÓTESE

A hipótese desse projeto é que as concentrações sanguíneas e plasmáticas de chumbo nas grávidas possam estar modificadas pelos genótipos da ALAD (*ALAD 1-1* e *ALAD 1-2* e *ALAD 2-2*) e/ou VDR [*FokI*(*FF*, *Ff*, *ff*), *BsmI*(*BB*, *Bb* , *bb*) e *APA I*(*AA*, *Aa* , *aa*)], assim como pelos haplótipos VDR (*FokI*, *Apal* e *BsmI*).

3- OBJETIVOS

1- Avaliar a diferença na distribuição dos genótipos e haplótipos do gene *VDR* entre brancos e negros da população brasileira e também comparar essas frequências com as já publicadas no Projeto HapMap.

1.1- Determinar os genótipos e haplótipos *VDR* (*FokI*, *Apal*, *BsmI*) para a população de brancos e negros e também comparar com frequência da população branca e negra disponível no Projeto HapMap.

2- Avaliar os procedimentos metodológicos que afetam a determinação de chumbo no plasma.

2.1- Avaliar a influência do uso ou não de anticoagulante, e o uso do vacuumtainer ou catheter nas coletas sobre as concentrações plasmáticas de chumbo (Pb) e Ferro (Fe).

2.2- Avaliar a influência do tempo entre a coleta e o processamento das amostras sobre as concentrações plasmáticas de Pb, Fe e hemoglobina livre.

2.3- Avaliar a influência de concentrações crescentes de EDTA sobre concentrações plasmáticas de chumbo.

3- Avaliar se os polimorfismos do gene *ALAD* e *VDR* estão associados com as concentrações de chumbo no sangue e soro maternos.

3.1- Determinar as concentrações sanguíneas (Pb-SangueTotal) e plasmáticas (Pb-S= equivalente ao plasma) de chumbo nas amostras de gestantes e amostras de sangue dos respectivos cordões umbilicais.

3.2- Avaliar a relevância dos polimorfismos *ALAD* e do *VDR* isoladamente (*BsmI*, *Apal* e *FokI*) e associados em haplótipos sobre as concentrações sanguíneas e plasmáticas de chumbo nas grávidas e nas amostras de seus respectivos cordões umbilicais.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

Para atender aos objetivos propostos neste estudo, 3 grupos de voluntários foram selecionados. Por questões didáticas, cada etapa foi descrita individualmente.

Dessa forma:

- o item 4.1 refere-se ao objetivo 1,
- o item 4.2 refere-se ao objetivo 2,
- o item 4.3 refere-se ao objetivo 3,

O primeiro grupo, atende ao objetivo de avaliar se há diferença na distribuição dos genótipos e haplótipos do gene VDR entre brancos e negros da população brasileira, comparado ao banco de dados do Projeto HapMap.

4.1- Seleção dos voluntários e análise das amostras

O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de ética e pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo USP. Todos os voluntários adultos eram residentes na cidade de Bauru (São Paulo). Foram selecionados 120 indivíduos que se auto classificaram como negros e 100 indivíduos que se auto classificaram como brancos (total de 220 indivíduos). Os indivíduos que se auto classificaram como pardos foram excluídos. Os voluntários foram informados sobre a pesquisa e após assinarem o termo de consentimento esclarecido, as amostras de sangue foram coletadas.

As amostras de sangue venoso foram coletadas pelo sistema a vácuo em três tubos (6mL cada, Vacutainer BD) para as genotipagens. As amostras sanguíneas foram alicotadas em tubos tipo eppendorf (1,5mL) e imediatamente congelada a -80°C até a realização das análises.

4.1.1- Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído do sangue total utilizando-se o método da *proteínase K* de acordo com o proposto por Miller et al, 1988[72]. Em resumo, 900µL de sangue total foram lisados 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 3000rpm por 10 min. Após descarte do sobrenadante, adicionamos 600µL de *Tampão Cell Lysis* (Tris.Cl 1%, SDS 0,1%; EDTA 0,5M - 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 adicionou-se 3µL de *proteínase K* (20mg/mL) e incubou-se em banho maria a 55°C, por 16h. Foi adicionado 200µL de *Acetato de Potássio* (5M) e incubou-se em gelo por 5 min. Neste momento, ocorre a formação de um *pellet* de proteína. Em um novo tubo plástico de 2mL foi adicionado o sobrenadante e 600µL de *álcool isopropílico*. Após nova centrifugação a 3000rpm por 1 min foi descartado o sobrenadante e visualizado a formação de um “*pellet*” de DNA, que foi precipitado pela adição de 600µL de *etanol a 70%* gelado. Após a evaporação do etanol à temperatura ambiente por aproximadamente 15 min, o pellet de DNA foi ressuspenso em 50µL 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 absorbâncias a 260 e 280nm (Rel 260/280).

4.1.2- Determinação dos genótipos para VDR

Foi realizada a técnica PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain) para determinar os genótipos VDR (*FokI*, *ApaI* e *BsmI*).

4.1.2.1- Polimorfismo *FokI* (dbSNP ID: rs 10735810)

Foi amplificada a região do *exon 2* do gene *VDR* (figura 7), onde ocorre o polimorfismo identificado pela enzima de restrição *FokI* [73]. Para amplificar esse fragmento foram utilizados *primers* 5'-GATGCCAGCTGGCCCTGGCACTG-3' e 5'- ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'. A PCR foi realizada em um volume de 25µL de reação contendo 20mmol/L de cada *primer*, 200mmol/L de cada dNTP, tampão 1× da Invitrogen Corp (10mmol/l Tris-HCl, pH 8.8, 50mmol/l KCl), 2.0mmol/l MgCl₂, e 2.5U of DNA Taq polimerase (Biosystems, Curitiba, Brazil). As condições da reação foram: ciclo de pré desnaturação a 95°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 1 min, *annealing* a 69°C por 30s, e extensão a 72°C por 30s. Finalmente, a extensão final foi conduzida a 72°C por 3 min. O produto amplificado (272bp) foi digerido com a enzima de restrição *FokI* (Fermentas Life Sciences, Hanover,MD) por 3h a 55°C, produzindo fragmentos de 272bp para o alelo wild-type (alelo “F”), ou 198pb e 74pb no caso da variante polimórfica (alelo “f”). Os fragmentos foram separados através da técnica de eletroforese em gel 8% de poliacrilamida e visualizadas com Nitrato de Prata

4.1.2.2- Polimorfismo *ApaI* (dbSNP ID: rs 7975232)

A região do *intron 8* foi amplificada (figura 8) onde ocorre o polimorfismo identificado pela enzima de restrição *ApaI* [74]. Foram utilizados na PCR, os *primers* 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3' e 5'-CAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC- 3'. A reação foi realizada em um volume de 25µL, contendo 0.25mmol/L de cada *primer*, 200mmol/L de cada dNTP, tampão 1× da Invitrogen Corp (10mmol/l Tris-HCl, pH 8.8, 50mmol/l KCl), 2.0mmol/l MgCl₂, e 2.5U de DNA Taq polimerase (Biosystems, Curitiba, Brazil). As condições da reação foram: pré desnaturação a 94°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, *annealing* a 68°C por 1 min, e extensão a 72°C por 1 min. A extensão final foi conduzida a 72°C por 7 min. O produto amplificado (740pb) foi digerido com *ApaI* (Fermentas Life Sciences,

Hanover,MD) por 2h a 37°C, produzindo fragmentos de 740bp para o alelo wild-type (alele “A”), ou 515pb e 225pb no caso da variante polimórfica (alelo “a”). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel poliacrilamida 8% e visualizado com Nitrato de Prata.

4.1.2.3- Polimorfismo *BsmI* (dbSNP ID: rs 1544410)

Para amplificar o fragmento no íntron 8, onde se encontra o sítio polimórfico para *BsmI*[75] foi utilizado o par de *primers* 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' e 5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG-3'. A reação de PCR foi realizada em um volume de 25µL de reação contendo 0.25mmol/L de cada *primer*, 200mmol/L de cada dNTP, tampão 1x da Invitrogen Corp (10mmol/l Tris-HCl, pH 8.8, 50mmol/l KCl), 2.0mmol/l MgCl₂, e 2.5U de DNA Taq polimerase (Biosystems, Curitiba, Brazil). As condições da reação foram: aquecimento a 94°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, *annealing* a 67°C por 30s e extensão a 72°C por 1 min. O fragmento resultante 825pb foi digerido com *BsmI* (New England Biolabs, Ipswich, MA) por 2h a 65°C, produzindo fragmentos de 825pb para o alelo *wild-type* (alelo “B”), ou 650 e 175pb no caso da variante polimórfica (alelo “b”). Os fragmentos foram separados pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e visualizado com Nitrato de Prata.

4.1.3- Análise dos haplótipos

Os haplótipos foram analisados usando a estatística Bayesian baseado no programa PHASE ver. 2.1 (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>)[70]para estimar a frequência de haplótipos nos 2 grupos étnicos. Os possíveis haplótipos incluindo as variantes dos 3 polimorfismos VDR (*BsmI*, *ApaI* *FokI*) foram: H1(ABF); H2 (ABf); H3 (AbF); H4 (Abf); H5 (aBF); H6 (aBf); H7 (abF), and H8 (abf).

Calculamos também através do PHASE o D' (a probabilidade máxima estimada para o desequilíbrio de ligação) que é uma medida padrão de desequilíbrio de ligação. Os valores de D' estimados para combinação de variantes foram calculados como $D'=D/D_{max}$, onde $D=h \cdot p \cdot q$. P e q são as frequências para as variantes raras dos dois polimorfismos testados para a ligação, de forma que $p < q < 0.5$, e h é a frequência dos haplótipos incluindo duas variantes específicas. Quando $D < 0$, $D_{max} = -p \cdot q$; quando $D > 0$, $D_{max} = p(1-q)$. Assim, os valores de D' variam de +1 a -1, com D' positivo indicando que as variantes raras estão associadas e quando o D' é negativo indica que variantes raras de um polimorfismo está associada a variantes comuns em outro locus do gene.

4.1.4- Análise estatística

As distribuições dos genótipos para os polimorfismos VDR foram analisadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando teste chi-squared (qui quadrado) (StatView for Windows, Cary, NC). Diferenças nas frequências dos genótipos, alelos e haplótipos entre os grupos étnicos também foram estudadas com qui quadrado. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

O segundo grupo de voluntários atende ao objetivo de avaliar os procedimentos metodológicos que afetam a determinação de chumbo no plasma.

4.2- Seleção dos voluntários e análise das amostras

Este estudo está de acordo com os princípios básicos e éticos da Declaração de Helsinki. Foram selecionados 12 indivíduos saudáveis, idade entre 24 e 32 anos, residentes em Ribeirão Preto, SP, Brasil, e aparentemente não expostos ao chumbo. Todos foram informados sobre o objetivo da pesquisa e logo em seguida, 6mL de sangue venoso foram coletados.

Foram utilizados tubos livres de metal (“Metal free Vacuumtainer BD”) com e sem anticoagulantes (heparina ou EDTA) e as técnicas de punção com vácuo (tubos vacuumtainer) e punção sem vácuo (abocate ou catheter).

Todos materiais usados na coleta foram previamente descontaminados com solução de ácido nítrico a 10% e seco em capela de fluxo laminar. Essa etapa foi realizada em sala limpa (classe 100).

O primeiro passo foi avaliar se o uso ou não de anticoagulante (plasma de heparina ou soro, respectivamente) e a técnica com ou sem vácuo (vacuumtainer ou Catheter, respectivamente) modificam as concentrações plasmáticas de Pb (chumbo) e Fe (Ferro).

Foram utilizados tubos contendo heparina e tubos sem anticoagulante e a técnica de coleta com vácuo (vacuumtainer) e sem vácuo (catheter).

O próximo passo foi avaliar se o tempo de 0, 5 e 30 minutos entre a coleta e o processamento das amostras modificam as concentrações plasmáticas de Pb (chumbo), Fe (Ferro) e Hb (Hemoglobina Livre). Esse intervalo se refere ao tempo em que amostra foi coletada e o momento da centrifugação.

Finalmente, para avaliar a influência de concentrações crescentes de EDTA modificam as concentrações plasmáticas de Pb (chumbo) foram acrescentados 6, 4 e 2mL de sangue nos tubos contendo o anticoagulante EDTA. Dessa forma, obtivemos as diluições de 1,0x, 1,5 e 3,0x para o anticoagulante EDTA.

Os procedimentos seguintes a cada etapa foram: centrifugação a 2000rpm por 10 minutos e posterior análise do Pb no sangue e plasma.

4.2.1- Determinação de chumbo e ferro em sangue e plasma (ou soro).

4.2.1.1- Instrumentação e acessórios

Para a determinação de chumbo e ferro em sangue total e plasma ou soro foi utilizado o método proposto por Schutz e colaboradores[76]. Para tal, foi utilizado um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICPMS) VG PlasmaQuad PQII (VG Elemental, Winsford, Cheshire, UK) usando nebulizador Microneb 2000 com injeção direta (CETAC Technologies, Omaha, NE, USA). *O equipamento está localizado no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), onde foram feitas as determinações de chumbo nas amostras em estudo.*

Reagentes e soluções

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2M Ω .cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore[®]) foi utilizada em todo o trabalho. Ácido nítrico foi destilado em temperatura inferior à de ebulição, empregando-se 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, ponteiras e materiais de vidro foram mergulhados em solução contendo 10% v/v HNO₃ por 24h, 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 100, no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP).

Foi utilizada uma solução estoque de Pb contendo 1,0g.L⁻¹Pb (Perkin-Elmer, Inc.) padronizada pela “National Institute 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 $\mu\text{g.L}^{-1}\text{Pb}$ foram preparadas pela diluição 1+9 com solução contendo 0,2 % v/v HNO_3 + 0,5 % v/v Triton X-100 de soluções estoque intermediárias.

Para a determinação de chumbo em soro sanguíneo, soluções de referência de Pb em concentrações de 0,0; 25,0; 50,0 $\mu\text{g.L}^{-1}\text{Pb}$ foram preparadas em solução contendo amônia, EDTA e Triton X-100. Às amostras foram adicionados 1,0 $\text{mg.L}^{-1} {}^{206}\text{Pb}$. A quantidade de isótopos adicionada às amostras e o procedimento de medida foram ajustados para prover resultados analíticos precisos, calculados pela razão isotópica ${}^{206}\text{Pb}/{}^{208}\text{Pb}$.

4.2.1.2- Materiais de referência para controle dos resultados de chumbo

Materiais de referência certificados de sangue 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 20 amostras das usadas no estudo, para controle dos resultados obtidos.

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 20 amostras das usadas no estudo, para controle dos resultados obtidos.

4.2.2- Dosagem de Hemoglobina livre (Hb)

Para a dosagem de Hb livre no plasma foi utilizado o kit “Plasma Hemoglobin” (SIGMA DIAGNOSTICS), uma reação colorimétrica. A reação se baseia na ação catalítica da Hb sobre a oxidação da benzidina pelo peróxido de

hidrogênio (H₂O₂). A coloração resultante da reação é proporcional a concentração de Hb livre na amostra. Como a benzidina é um composto carcinogênico, o substituto para ela foi a 3 3'5 5'tetrametilbenzidina (TMB), tão sensível quanto a benzidina. Foram utilizados um Padrão de Hemoglobina (30mg/dPL).

Foram preparados soluções padrão e um branco. Para o preparo da solução padrão, foi acrescentado: 2,0mL de solução de TMB e 0,01mL do Padrão de Hemoglobina. Para o Branco, apenas 2,0mL de solução de TMB forma acrescentadas e finalmente, para a solução teste: 0,01mL das amostras e 2,0mL de TMB.

A intervalos de 1 minuto, 2,0mL de H₂O₂ foram adicionados em cada tubo, misturados gentilmente e lidos logo em seguida. A leitura era feita aos exatos 10 minutos após a adição do H₂O₂. Valores de referência para Hb livre: Amostras com valores acima de 5µg/dL foram consideradas hemolisadas.

4.2.3- Análise estatística

As médias das concentrações de Pb, Fe e Hb foram analisadas usando teste t Student e one Way Anova. O valor de P<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Finalmente, para atender ao objetivo central dessa tese, avaliamos se os polimorfismos do gene ALAD e VDR modificam as concentrações de chumbo no sangue e plasma maternos.

4.3- Casuística

Para este estudo observacional, no qual pretendíamos verificar o efeito dos polimorfismos G177C da ALAD e *Fok*, *Apal* e *BsmI* do VDR sobre concentrações sanguíneas (Pb-Sangue Total), plasmáticas (Pb-Soro) e fração

livre (Pb-Soro/Pb-Sangue Total) em grávidas, o tamanho amostral estimado se baseou no grupo haplotípico VDR de menor frequência (12%) e considerado para este estudo.

4.3.1- Seleção dos voluntários e análise das amostras

O projeto dessa pesquisa foi aprovado pelo comitê de pesquisa da Maternidade do Complexo Aeroporto na cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo.

Foram utilizadas amostras de sangue e soro provenientes de gestantes (n=256) com mais 38 semanas de gestação e amostras de sangue e soro das respectivas amostras de sangue do cordão umbilical. Os partos foram realizados na Maternidade do Complexo Aeroporto (MATER).

As voluntárias gestantes que aceitaram participar deste estudo, após esclarecimento detalhado sobre o projeto onde foram orientadas a respeito dos objetivos desta pesquisa, assinaram do termo de consentimento informado. A tabela 3 mostra as características dos participantes desse estudo.

4.3.2- Coleta e processamento das amostras

As amostras das 256 gestantes foram coletadas no centro obstétrico, no intervalo entre a indução e o parto. Foram incluídas as gestantes saudáveis com mais de 38 semanas de gestação, parto normal e cesária. As gestantes com hipertensão e diabetes gestacional, pré-eclâmpsia além daquelas cujas placentas foram contaminadas durante o parto, foram excluídas. Foram coletados 12mL de sangue venoso em tubo com EDTA (Metal free Vacuutainer BD) para análise da concentração de chumbo no sangue total e tubo sem anticoagulante para soro (Metal free Vacuutainer BD), utilizando os procedimentos de coleta adequados.

As amostras de sangue e soro do cordão umbilical foram coletadas no momento do parto, utilizando também: tubo com EDTA (Metal free Vacuntainer BD) para análise da concentração de chumbo no sangue total e tubo sem anticoagulante para soro (Metal free Vacuntainer BD).

Após as coletas, as amostras dos tubos coletadas em tubos de EDTA foram divididas em duas frações (sendo duplicatas para cada uma), para a dosagem de chumbo no sangue e para as genotipagens. As alíquotas foram armazenadas em tubos tipo eppendorf (1,5mL) e imediatamente congeladas a -20°C até a realização das análises. Para análises de chumbo no soro, o volume de 6mL de sangue, que foi coletado em tubo sem anticoagulante, foi centrifugado a 2000rpm durante 10 minutos. O soro foi cuidadosamente fracionado e congelado a -20°C até o momento das análises. Foi padronizado o prazo de até 10 minutos entre a coleta e a centrifugação das amostras.

4.3.3- Determinação de chumbo em sangue e soro

Para a determinação do chumbo em sangue e soro foram utilizadas as técnicas descritas no item 4.2.1.

4.3.4- Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico, foi utilizada a técnica descrita no item 4.1.1.

4.3.5- Determinação dos genótipos para ALAD

Utilizamos a técnica de reação de RFLP, a mesma utilizada para as genotipagens do Receptor da Vitamina D (VDR). No entanto, para a genotipagem dos polimorfismos ALAD, 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, 50mM KCl), 2,5mM MgCl₂, e 2.5 Unidades *DNA Taq polymerase* (Biosystems, Curitiba, Brasil). As condições da reação foram as seguintes: pré-desnaturação a 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, *annealing* de *primers* a 61°C por 30 segundos e síntese a 72°C por 1 min. 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.

Os fragmentos foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 8%. A visualização foi realizada com coloração pela prata. Dessa forma, os indivíduos com genótipo ALAD 1-1 apresentam somente uma banda de 582pb; os com genótipo ALAD 1-2 apresentam fragmentos de 582 e 511pb; indivíduos com genótipo ALAD 2-2 apresentam apenas uma banda com tamanho de 511bp (figura 8).

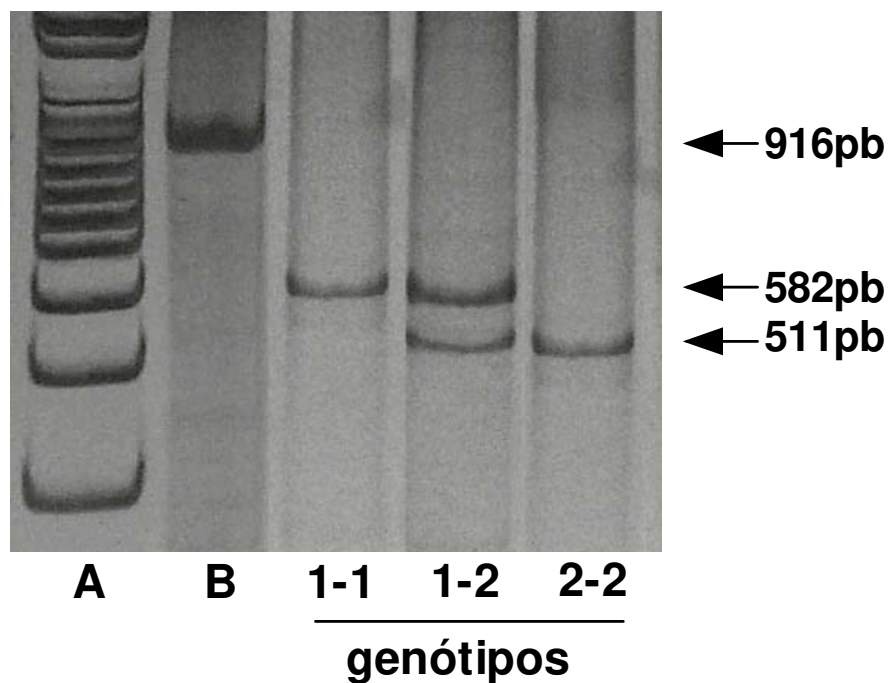


Figura 8- Foto de um gel representativo de genotipagem para o polimorfismo G177C da ALAD, obtido neste estudo. O produto de PCR foi digerido com enzima de restrição (*MspI*), produzindo diferentes fragmentos resultando a genótipos específicos. Coluna A: marcador molecular padrão (100bp DNA ladder, Promega, 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.

4.3.6- Determinação dos genótipos para VDR

Para a determinação dos genótipos VDR foi utilizado os mesmos procedimentos já descritos no item 4.1.2.

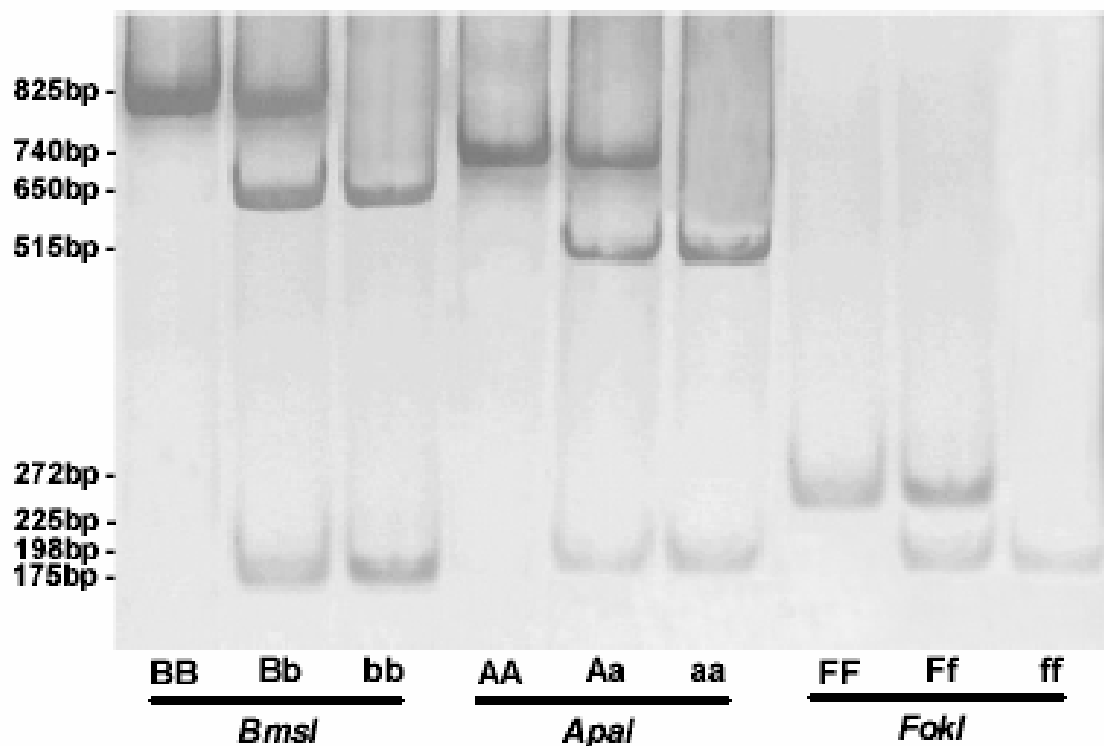


Figura 9- Foto de um gel representativo de genotipagem para os polimorfismos VDR: *BsmI*, *ApaI* e *FokI*, obtidos neste estudo. O produto de PCR foi digerido com enzimas de restrição (*BsmI*, *ApaI* e *FokI* respectivamente), produzindo diferentes fragmentos resultando a genótipos específicos. Genótipos *BsmI*: BB (825pb), Bb (825, 650 175pb) e bb (650 e 175pb). Genótipos *ApaI*: AA(740pb) Aa (740, 515 e 225pb) e aa (515 e 225pb). Genótipos *FokI* : FF (272pb), Ff (272 e 198) e ff (198 e 74pb).

4.3.7- Análise dos Haplótipos

Para as análises de haplótipos desse grupo, foi utilizada a ferramenta já descrita no item 4.1.3.

4.3.8- Análise estatística

As distribuições dos genótipos para os polimorfismos VDR foram analisadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando teste qui quadrado (StatView for Windows, Cary, NC). Diferenças entre os grupos de genótipos e haplótipos para as médias das concentrações de Pb-Sangue Total, Pb-Soro e % Pb-Soro/Pb-Sangue Total foram analisadas usando teste de análise de variância de uma via (One Way Anova). O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Foi utilizado o software GraphPad PRISM (GraphPad Prism, Software Inc., San Diego, CA, USA).

5- RESULTADOS

Assim como foi feito na seção de métodos, os resultados também foram apresentados separadamente, atendendo a cada objetivo proposto.

A distribuição dos genótipos e haplótipos do gene VDR entre brancos e negros da população brasileira são comparados ao banco de dados do Projeto HapMap

A tabela 1 mostra a frequência de genótipos e alelos nos indivíduos brancos e negros incluídos no estudo e nos indivíduos estudados no projeto HapMap. A distribuição dos genótipos para os três polimorfismos (*BsmI*, *ApaI* e *FokI*) mostrou-se de acordo com a Lei de Hardy Weinberg. A distribuição dos genótipos VDR ou dos alelos para esses polimorfismos nos indivíduos brasileiros não mostraram diferenças étnicas. (todos $P > 0,05$; tabela 1).

Tabela 1- Frequência dos genótipos e haplótipos (%) nos 2 grupos étnicos e na população do Projeto HapMap (<http://www.HapMap.org>; The International Haplotype Map Project)

Estudo			Projeto HapMap ^a	
Genótipos	Negros	Branços	Negros	Branços
<i>BsmI</i>	(N=120)	(N=100)	(N=59)	(N=60)
<i>BB</i>	14	15	14	23
<i>Bb</i>	46	51	32	42
<i>bb</i>	40	34	54	35
Alelos	Negros	Branços	Negros	Branços
	(N=240)	(N=200)	(N=118)	(N=120)
<i>B</i>	36	40	30	44
<i>b</i>	64	60	70	56
Genótipos	Negros	Branços	Negros	Branços
<i>Apal</i>	(N=120)	(N=100)	(N=60)	(N=58)
<i>AA</i>	23	27	37	40 ^b
<i>Aa</i>	57	41	51	36 ^b
<i>Aa</i>	20	32	12	24 ^b
Alelos	Negros	Branços	Negros	Branços
	(N=240)	(N=200)	(N=120)	(N=116)
<i>A</i>	49	47	62	58
<i>a</i>	51	53	38	42
Genótipos	Negros	Branços	Negros	Branços
<i>FokI</i>	(N=120)	(N=100)	(N=60)	(N=60)
<i>FF</i>	42	47	68	35 ^b
<i>Ff</i>	46	41	30	42 ^b
<i>ff</i>	12	12	2	23 ^b
Alelos	Negros	Branços	Negros	Branços
	(N=240)	(N=200)	(N=120)	(N=120)
<i>F</i>	65	67	83	56 ^b
<i>f</i>	35	33	17	44 ^b

N =número de indivíduos para os genótipos (genótipos) ou número de alelos (alelos). **a:** Indivíduos negros de Yoruba em Ibadan, Nigeria, e brancos residentes em Utah-USA com ancestralidade do norte e oeste Europeu. **b:** P <0.05 comparados aos negros (teste qui-quadrado) do projeto HapMap.

A tabela 2 mostra a frequência de haplótipos (%) estimada nos dois grupos étnicos do estudo e do projeto HapMap.(<http://www.HapMap.org>). Não encontramos diferenças inter-étnicas na distribuição da frequência de haplótipos estimada na população brasileira ($P>0,05$ tabela 2). Entretanto, encontramos diferenças inter-étnicas na frequência haplotípica da população do projeto HapMap. Além disso, encontramos diferenças significativas na distribuição da frequência haplotípica em brancos da população brasileira comparada com os brancos do projeto HapMap ($P<0,05$ tabela 2). E também, diferenças significativas foram encontradas quando comparamos a distribuição das frequências haplotípicas em negros da população brasileira comparados com a população do HapMap ($P<0,05$ tabela 2). Os haplótipos H3 e H4, ausentes na população do HapMap, foram encontrados na população brasileira.

Tabela 2- Frequência de haplótipos estimada(%) nos 2 grupos étnicos na população do Projeto HapMap (<http://www.HapMap.org>)

	Haplótipos			Estudo		Projeto HapMap ^a	
	Bsml	Apal	FokI	Negro ^b	Branco ^b	Negro	Branco ^c
H1	B	A	F	11.7	12.8	23.0	23.0
H2	B	A	f	6.2	6.1	21.0	6.0
H3	B	a	F	12.0	14.5	0	0
H4	B	a	f	6.3	7.0	0	0
H5	b	A	F	20.7	18.9	8.0	26.0
H6	b	A	f	11.0	9.1	5.0	7.6
H7	b	a	F	21.0	21.3	24.0	34.0
H8	b	a	f	11.1	10.3	19.0	3.4

a: Indivíduos negros de Yoruba em Ibadan, Nigéria, e brancos residentes em Utah-USA com ancestralidade do norte e oeste Europeu;

b: $P < 0.05$ comparados aos brancos (teste qui-quadrado) do projeto HapMap;

c: $P < 0.05$ comparando aos negros (teste qui-quadrado) do projeto HapMap.

O uso ou não de anticoagulante Heparina e o uso da técnica de vacuumtainer nas coletas alteram as concentrações plasmáticas de chumbo (Pb) e Ferro (Fe)

Nós não encontramos diferenças significativas para as concentrações de PbI no plasma (quando as amostras foram coletadas com anticoagulante heparina) e/ou soro (quando as amostras foram coletadas sem anticoagulante) quando coletadas com técnica que utiliza vácuo (vacuumtainer) e/ou sem vácuo (catheter) (figura 10 (A)).

Não houve diferenças significativas também para as concentrações de plasmáticas e séricas de Ferro (Fe), coletadas com técnica que utiliza vácuo (vacuumtainer) e/ou sem vácuo (catheter) (figura 10 (B)).

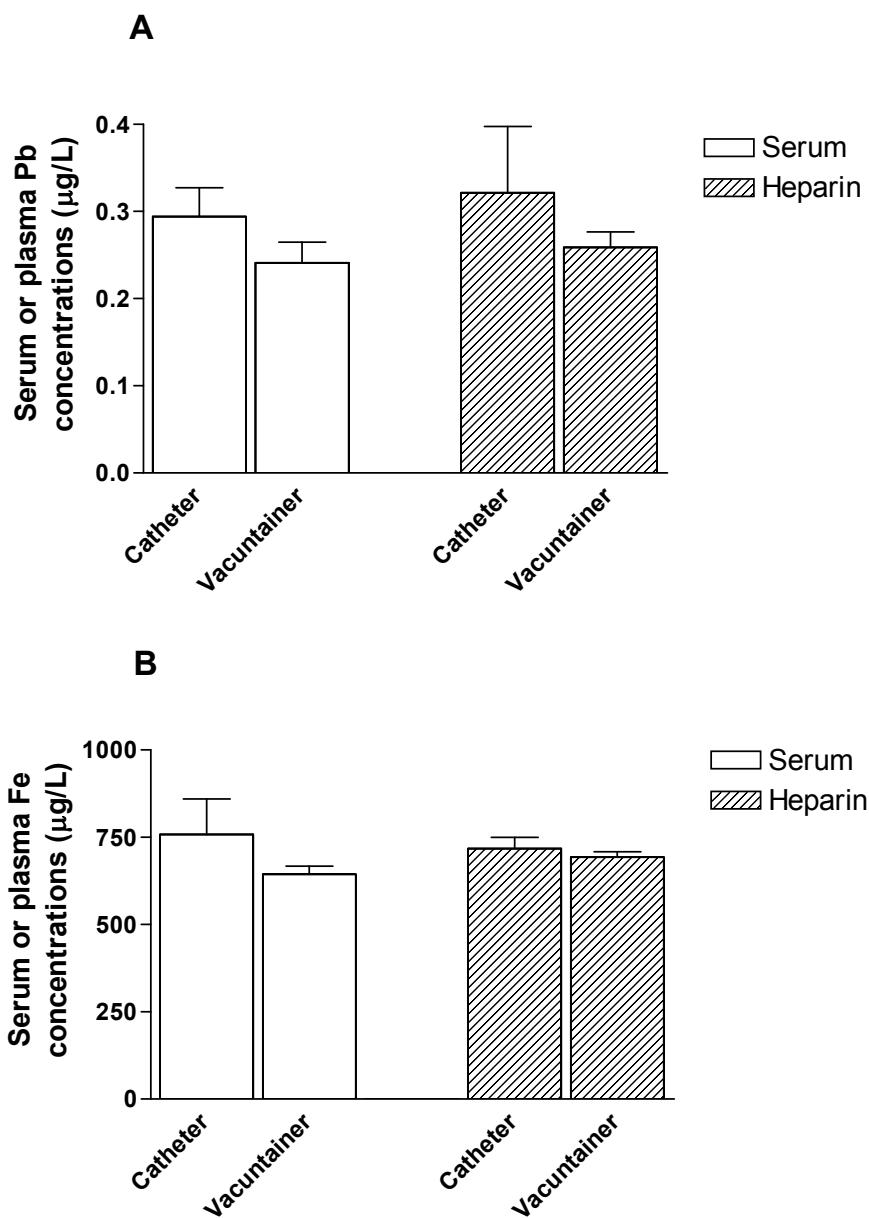


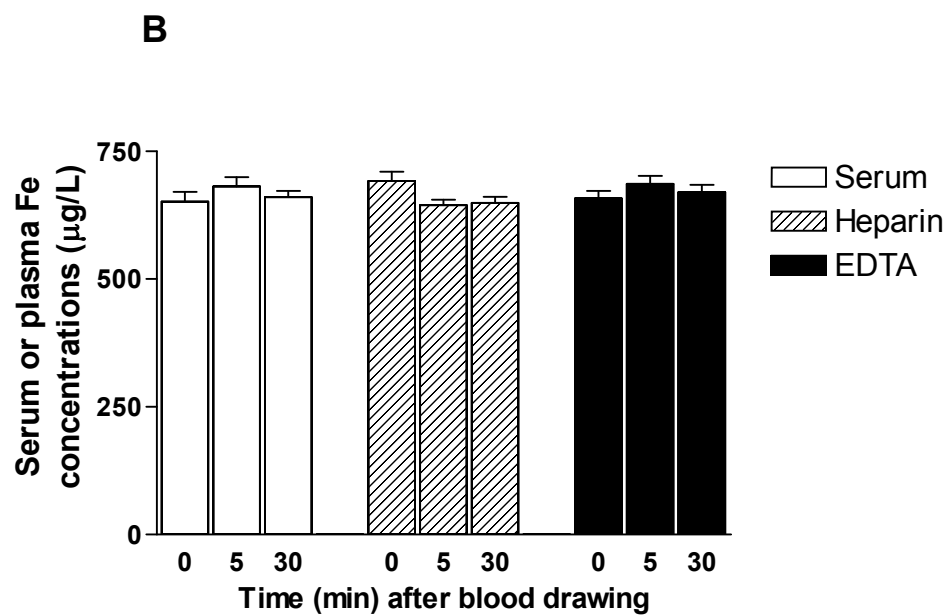
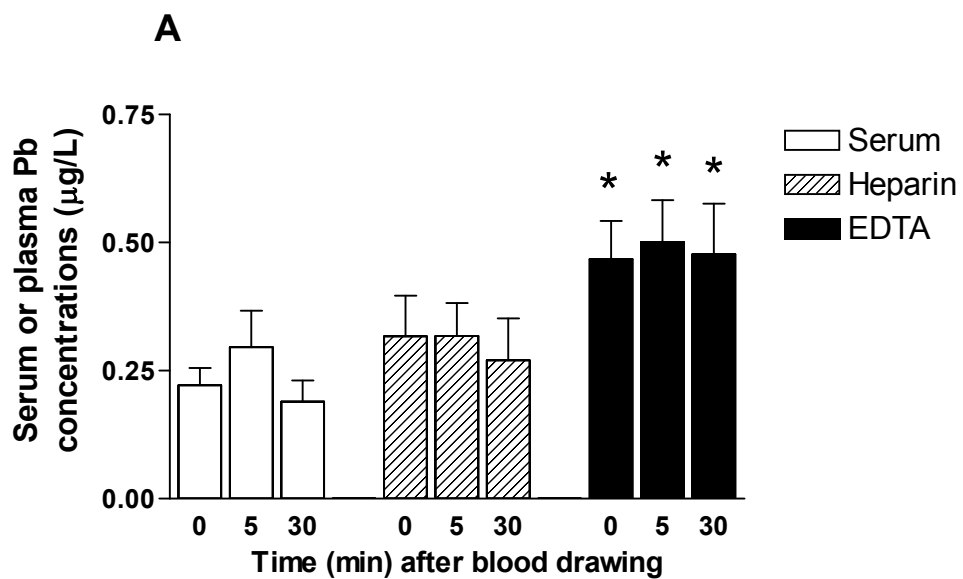
Figura 10- Valores de média ($\pm$ SEM) das concentrações de Pb (A) e Ferro (Fe) (B) em soro (Soro) e/ou plasma (Heparina), coletadas com sistemas a vácuo (vacutainer) e catheter. Média Pb-SangueTotal: $20,01 \pm 2,28 \mu\text{g/L}$. $N=12$ $P>0,05$. *One Way Anova*.

O tempo entre a coleta e o processamento das amostras modificam as concentrações plasmáticas de chumbo (Pb), Ferro (Fe) e hemoglobina livre (Hb)

Nessa etapa das análises nós encontramos diferenças significativas para as concentrações de chumbo no plasma (Pb-P) nos intervalos de tempo 0, 5 e 30 minutos, quando comparadas com amostras coletadas com anticoagulante EDTA. As concentrações de Pb-P não apresentaram diferenças quanto ao tempo 0,5 e 30 minutos, quando coletadas com soro e heparina. (figura 11 (A)).

Não houve diferenças significativas para as concentrações de Ferro (Fe) quando as amostras foram coletadas em plasma (quando utilizamos anticoagulante heparina ou EDTA) e/ou soro (quando as amostras foram coletadas sem anticoagulante) e nos intervalos de tempos 0,5 e 30 minutos entre a coleta e o processamento das amostras (figura 11 (B)).

A figura 11 (C) mostra que não houve diferenças significativas para as concentrações de hemoglobina (Hb) no plasma (quando as amostras foram coletadas com anticoagulante heparina) e/ou soro (quando as amostras foram coletadas sem anticoagulante) e nos intervalos de tempos 0, 5 e 30 minutos entre a coleta e o processamento das amostras. Para essa análise, o EDTA não foi utilizado porque esse anticoagulante interfere na reação da tetrametilbenzidina.



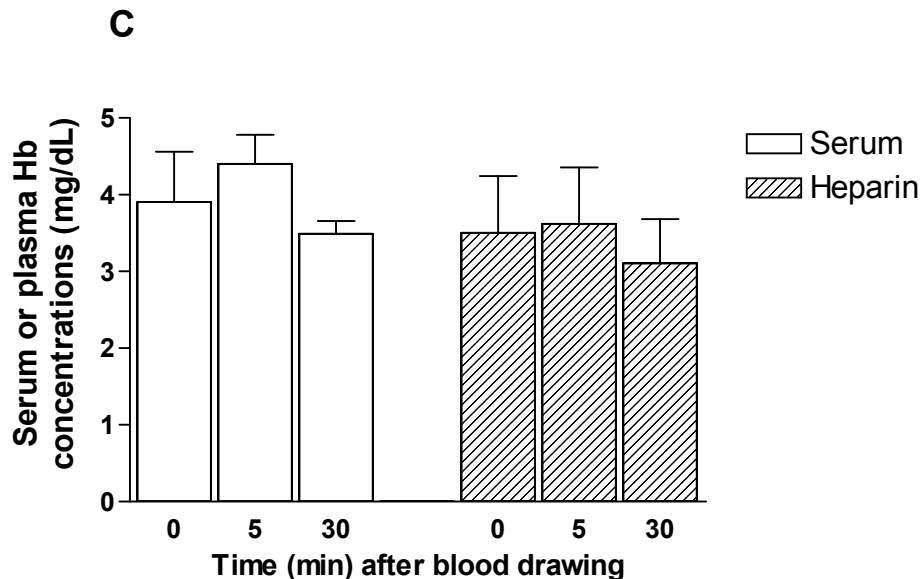


Figura 11- Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações plasmáticas de Pb (A), Ferro (Fe) (B) e hemoglobina livre (Hb) (C) em soro (Soro) e/ou plasma (Heparina), coletados com sistemas vacutainer, nos intervalos de 0, 5 e 30 minutos entre a coleta e o processamento da amostra. Média Pb-SangueTotal: $18,34 \pm 3,12 \mu\text{g/L}$. $N=12$. $*P<0,05$ EDTA comparado com os demais grupos. *One Way Anova*.

Concentrações crescentes de EDTA modificam as concentrações plasmáticas de chumbo (Pb)

A figura 12 mostra que as concentrações de chumbo no plasma quando coletados com concentrações crescentes do anticoagulante EDTA apresentaram um aumento proporcional à concentração do anticoagulante. Para essa análise, quantidades de 6, 4 e 2mL de sangue foram adicionados aos tubos contendo a mesma quantidade de EDTA. Dessa forma, obtivemos as seguintes concentrações do anticoagulante EDTA: 1X; 1,5X e 3,0X, respectivamente.

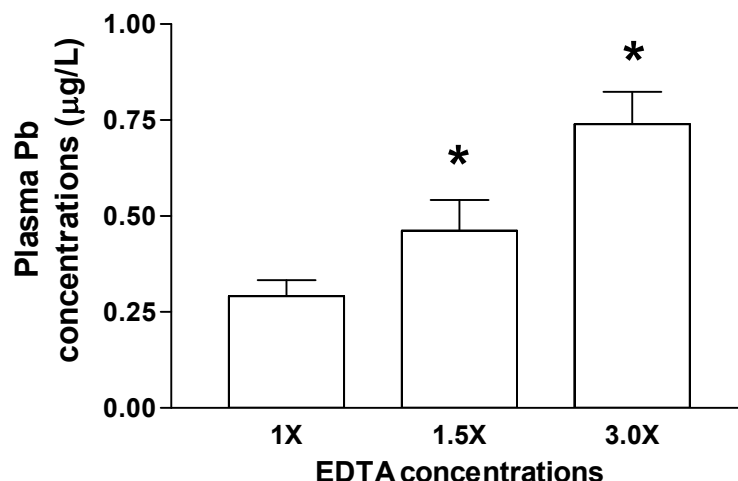


Figura 12- Valores de média ($\pm$ SEM) das concentrações plasmáticas de Pb coletados em tubos contendo concentrações crescentes de anticoagulante EDTA * $P < 0,05$ para as concentrações 1,5X e 3,0X Média ($\pm$ SEM) Pb-SangueTotal: $22,29 \pm 2,47 \mu\text{g/L}$. $N=12$ *One Way Anova*.

As concentrações de chumbo no sangue materno atravessam a placenta e contaminam o feto

A figura 13 mostra diferenças significativas entre as médias das concentrações de Pb-Sangue Total (A); Pb-Soro (B) nas gestantes e nas respectivas amostras de sangue do cordão umbilical. Não houve diferenças significativas para a razão Pb-Soro/Pb-Sangue (C).

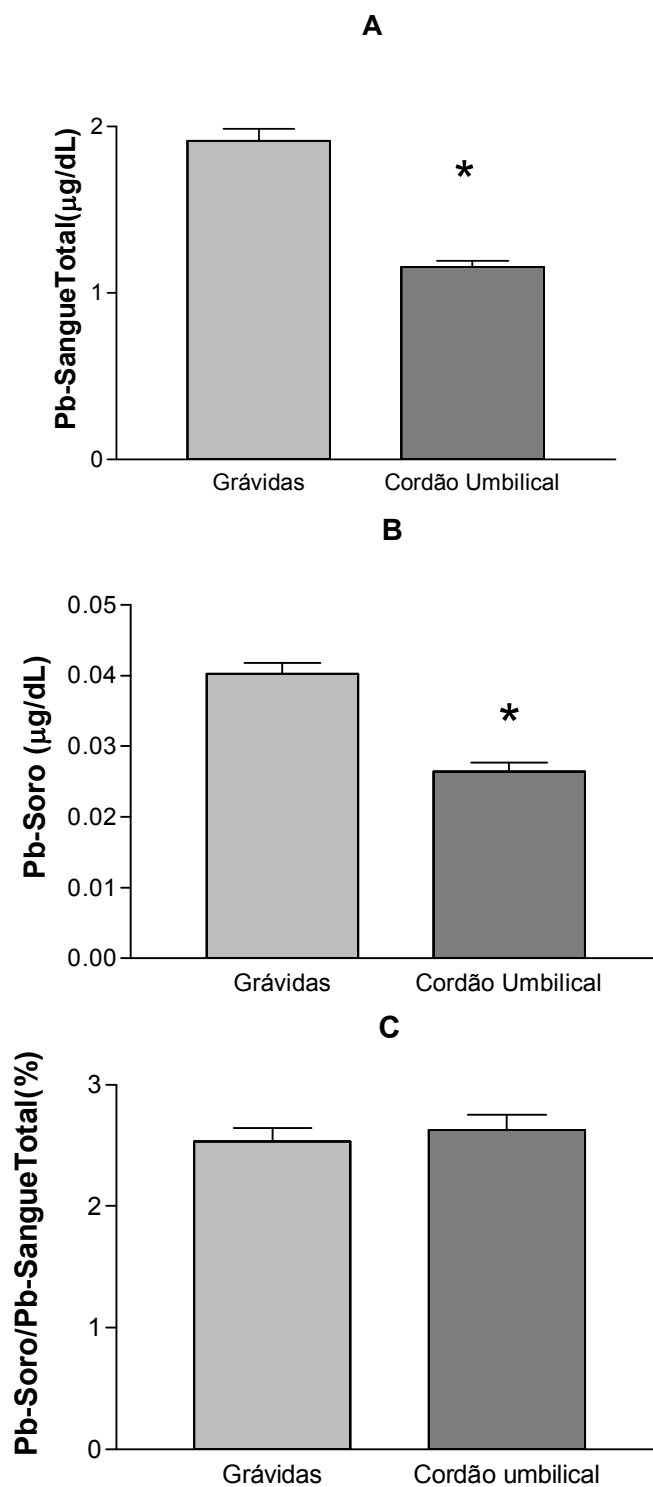


Figura 13- Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas (A), séricas (B) e fração livre (C) de Pb nas amostras de sangue dos respectivos cordões umbilicais. * $P < 0,001$. *Teste t Student*.

Os genótipos da ALAD (Alad 1-1 e ALAD 1-2) não modificam as concentrações sanguíneas (Pb-SangueTotal), séricas (Pb-Soro) e fração livre (Pb-Soro/Pb-SangueTotal) das gestantes

A tabela 3 mostra as características das gestantes e as amostras de sangue dos respectivos cordões umbilicais.

Tabela 3- Características dos participantes do estudo

Variáveis	Total (n=256)
Gestantes	Média ± SEM ou (%)
Idade (anos)	24.0 ± 4.1
Hemoglobina (g/dL)	12.4 ± 1.2
Hematócrito (%)	37.1 ± 5.2
Não fumantes (%)	202 (79.0)
Fumantes (%)	54 (21.0)
Pb-SangueTotal (µg/dL)	1,89 ± 0,070
Pb-Soro (µg/dL)	0,040 ± 0,001
Pb-Soro/Pb-SangueTotal (%)	2,5 ± 1,0
Cordão umbilical	
Pb-Sangue Total (µg/dL)	1,13 ± 0,036
Pb-Soro (µg/dL)	0,025 ± 0,001
Pb-Soro/Pb-Sangue Total (%)	2,4 ± 1,1

A tabela 4 mostra as concentrações de Pb-Sangue total, Pb-Soro e também a fração livre (Pb-soro/Pb-Sangue Total) segundo os genótipos ALAD 1-1 e ALAD 1-2 das gestantes. Não foram encontrados indivíduos ALAD 2-2.

Tabela 4- Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas, séricas e fração livre de Pb nas amostras das gestantes genotipadas para o polimorfismo G177 C (ALAD). $P>0,05$. *Teste t Student*

ALAD	Grávidas ALAD 1-1 (N=204)		Grávidas ALAD 1-2 (N=52)		P
	Grávidas	Cordão umbilical	Grávidas	Cordão umbilical	
Pb-Sangue Total ($\mu\text{g/dL}$)	1,876 $\pm$ 0,074	1,170 $\pm$ 0,057	1,984 $\pm$ 0,165	1,232 $\pm$ 0,099	NS
Pb-Soro ($\mu\text{g/dL}$)	0,039 $\pm$ 0,001	0,025 $\pm$ 0,002	0,044 $\pm$ 0,003	0,028 $\pm$ 0,002	NS
Pb-Soro/ Pb-SangueTotal(%)	2,478 $\pm$ 0,125	2,532 $\pm$ 0,132	2,895 $\pm$ 0,269	2,626 $\pm$ 0,232	NS

A figura 14 mostra que não houve diferenças significativas para as médias das concentrações sanguíneas (A) (Pb-SangueTotal), séricas (B) (Pb-Soro) e fração livre (C) (Pb-Soro/Pb-SangueTotal) das gestantes desse estudo, genotipadas para o polimorfismo C177G da ALAD.

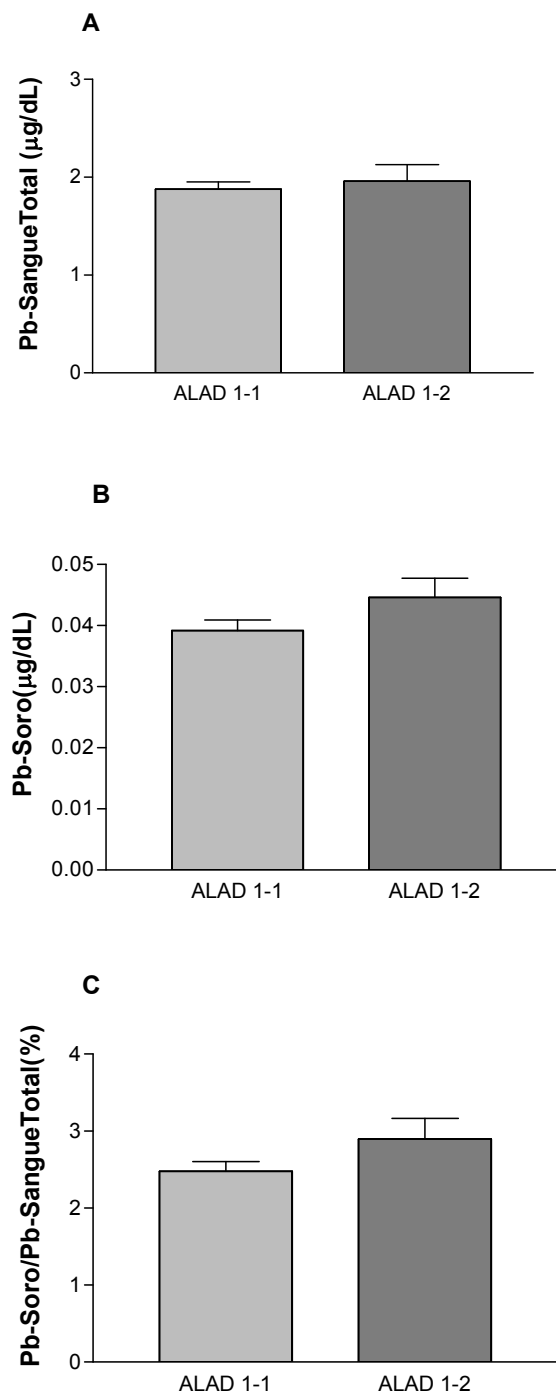


Figura 14- Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas (A), séricas (B) e fração livre (C) de Pb em grávidas genotipadas para ALAD $P > 0,05$. *Teste t Student*.

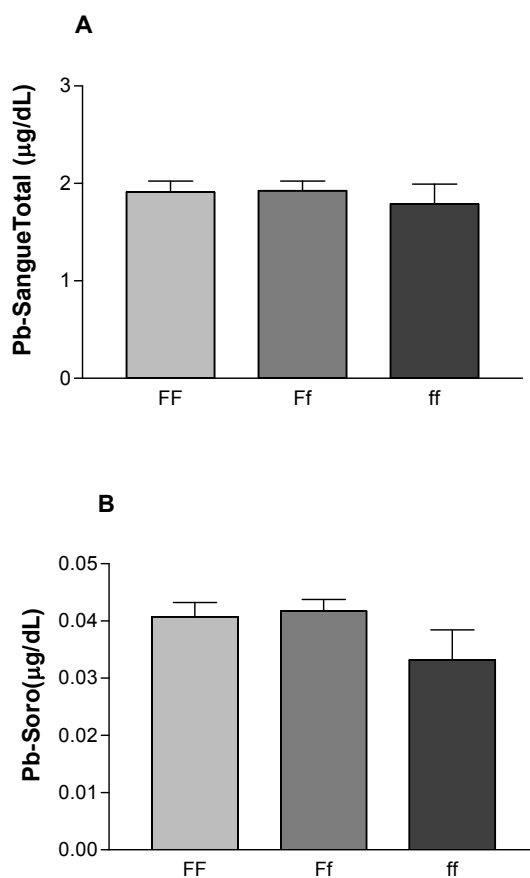
A tabela 5 mostra as concentrações de Pb-Sangue total, Pb-Soro e também a fração livre (Pb-soro/Pb-Sangue Total) para todos os genótipos dos polimorfismos VDR (*FokI*, *Apal* e *BsmI*).

Tabela 5- Características dos participantes do estudo. Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas (Pb-Sangue Total), séricas (Pb-Soro) e fração livre de Pb (Pb-Soro/Pb-Sangue Total) nas amostras das gestantes genotipadas para os polimorfismos *FokI*, *Apal* e *BsmI* (VDR). $P>0,05$. *Teste One Way anova*

Grávidas FF (N=106)		Grávidas Ff (N=127)		Grávidas ff (N=23)		P
FokI (VDR)	Grávidas	Cordão umbilical	Grávidas	Cordão umbilical	Grávidas	
Pb-B (μ g/dL)	1,911 $\pm$ 0,110	1,115 $\pm$ 0,061	1,927 $\pm$ 0,096	1,168 $\pm$ 0,052	1,788 $\pm$ 0,199	NS
Pb-S (μ g/dL)	0,041 $\pm$ 0,002	0,026 $\pm$ 0,002	0,041 $\pm$ 0,002	0,025 $\pm$ 0,001	0,033 $\pm$ 0,005	NS
Pb-S/Pb-B(%)	2,687 $\pm$ 0,195	2,720 $\pm$ 0,201	2,526 $\pm$ 0,141	2,480 $\pm$ 0,150	2,051 $\pm$ 0,330	NS
Grávidas BB (N=30)		Grávidas Bb (N=129)		Grávidas bb (N=97)		P
BsmI (VDR)	Grávidas	Cordão umbilical	Grávidas	Cordão umbilical	Grávidas	
Pb-B (μ g/dL)	1,810 $\pm$ 0,180	1,201 $\pm$ 0,110	1,810 $\pm$ 0,090	1,160 $\pm$ 0,080	2,030 $\pm$ 0,130	NS
Pb-S (μ g/dL)	0,047 $\pm$ 0,003	0,031 $\pm$ 0,003	0,040 $\pm$ 0,002	0,025 $\pm$ 0,001	0,040 $\pm$ 0,002	NS
Pb-S/ Pb-B(%)	3,381 $\pm$ 0,410	3,062 $\pm$ 0,380	2,670 $\pm$ 0,160	2,551 $\pm$ 0,180	2,492 $\pm$ 0,210	NS
Grávidas AA (N=70)		Grávidas Aa (N=130)		Grávidas aa (N=56)		P
Apal (VDR)	Grávidas	Cordão umbilical	Grávidas	Cordão umbilical	Grávidas	
Pb-B (μ g/dL)	1,851 $\pm$ 0,101	1,140 $\pm$ 0,060	1,870 $\pm$ 0,090	1,180 $\pm$ 0,051	2,041 $\pm$ 0,160	NS
Pb-S (μ g/dL)	0,045 $\pm$ 0,003	0,027 $\pm$ 0,002	0,040 $\pm$ 0,002	0,026 $\pm$ 0,001	0,036 $\pm$ 0,003	NS
Pb-S/ Pb-B(%)	2,781 $\pm$ 0,201	2,601 $\pm$ 0,210	2,680 $\pm$ 0,171	2,541 $\pm$ 0,160	2,141 $\pm$ 0,220	NS

Os genótipos *FokI* (FF, Ff e ff) do VDR não se associam às concentrações sanguíneas (Pb-SangueTotal), séricas (Pb-Soro) e fração livre (Pb-Soro/Pb-SangueTotal) das gestantes

A figura 15 mostra que não houve diferenças significativas para as médias das concentrações sanguíneas (A) (Pb-SangueTotal), séricas (B) (Pb-Soro) e fração livre (C) (Pb-Soro/Pb-SangueTotal) das gestantes desse estudo, genotipadas para o polimorfismo *FokI* do *VDR*.



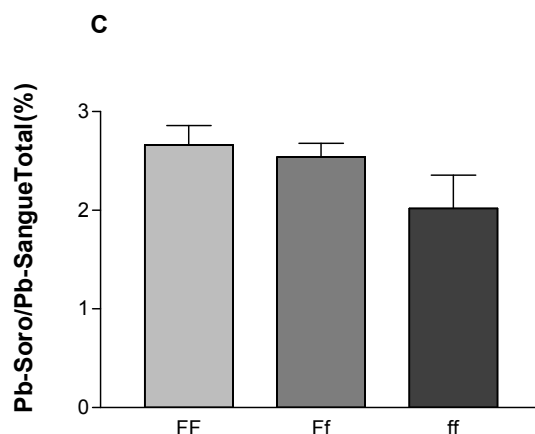


Figura 15- Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas (A), séricas (B) e fração livre (C) de Pb em grávidas genotipadas *VDR-FokI* (FF, Ff, ff). $P > 0,05$ One way Anova.

Os polimorfismos *Apal* (*VDR*) não se associam às concentrações sanguíneas, séricas e fração livre de Pb nas amostras das gestantes

A figura 16 mostra que não houve diferenças significativas para as médias das concentrações sanguíneas (A) (Pb-SangueTotal), séricas (B) (Pb-Soro) e fração livre (C) (Pb-Soro/Pb-SangueTotal) das gestantes desse estudo, genotipadas para o polimorfismo *Apal* do *VDR*.

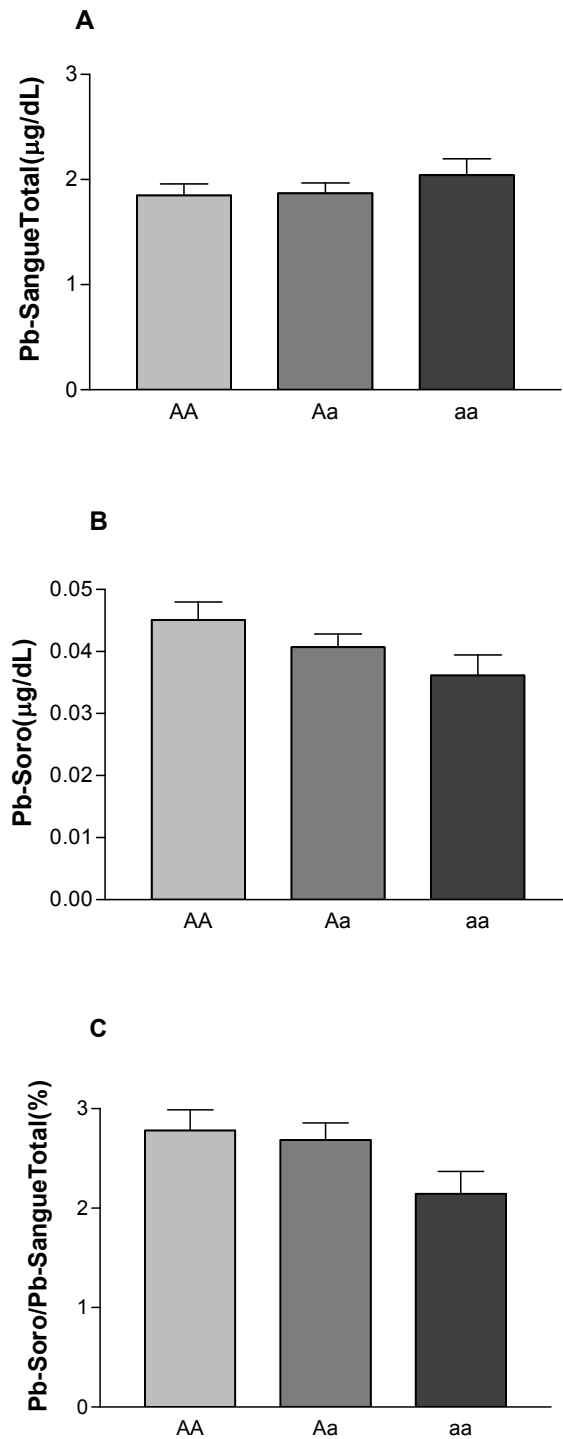
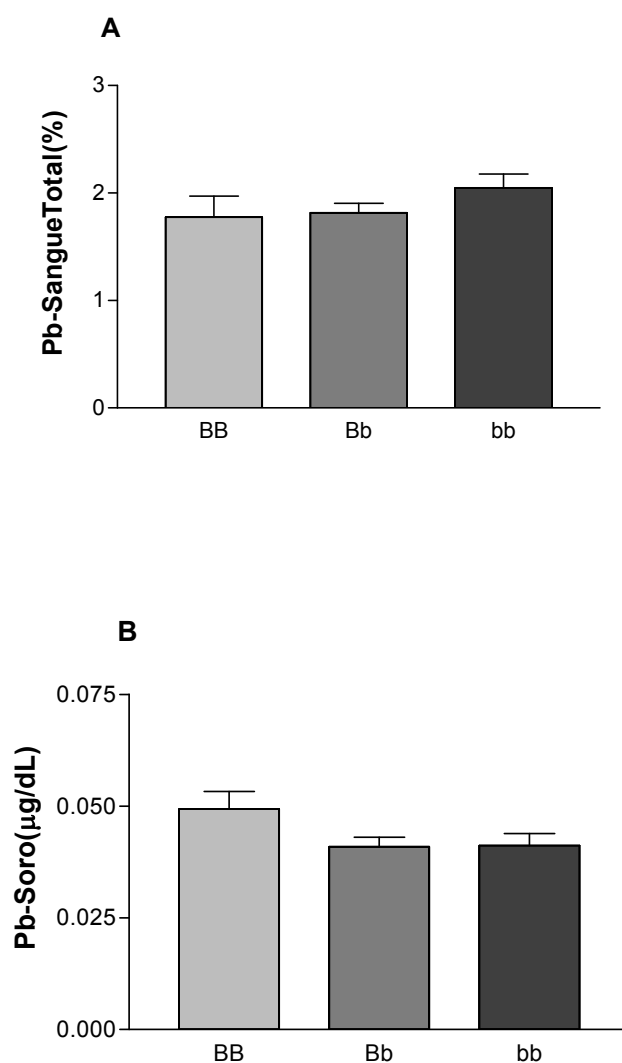


Figura 16- Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas (A), séricas (B) e fração livre (C) de Pb em grávidas genotipadas *VDR-ApaI* (AA, Aa, aa). $P > 0,05$ One way Anova.

Os polimorfismos *BsmI* (*VDR*) não se associam às concentrações sanguíneas, séricas e fração livre de Pb nas amostras das gestantes

A figura 17 mostra que não houve diferenças significativas para as médias das concentrações sanguíneas (A) (Pb-SangueTotal), séricas (B) (Pb-Soro) e fração livre (C) (Pb-Soro/Pb-SangueTotal) das gestantes desse estudo, genotipadas para o polimorfismo *BsmI* do *VDR*.



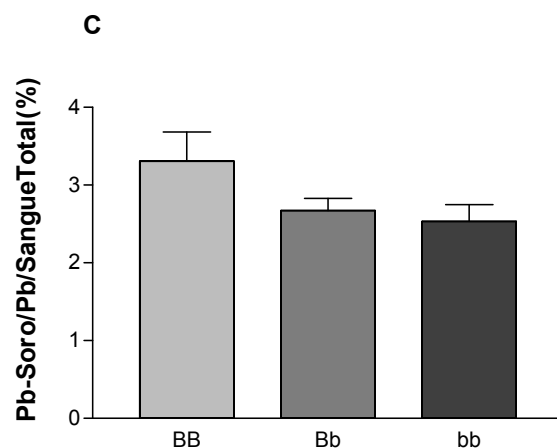


Figura 17- Valores de médias ($\pm$ SEM) das concentrações sanguíneas (A), séricas (B) e fração livre (C) de Pb em grávidas genotipadas *VDR-BsmI* (BB, Bb, bb). $P > 0,05$ One way Anova.

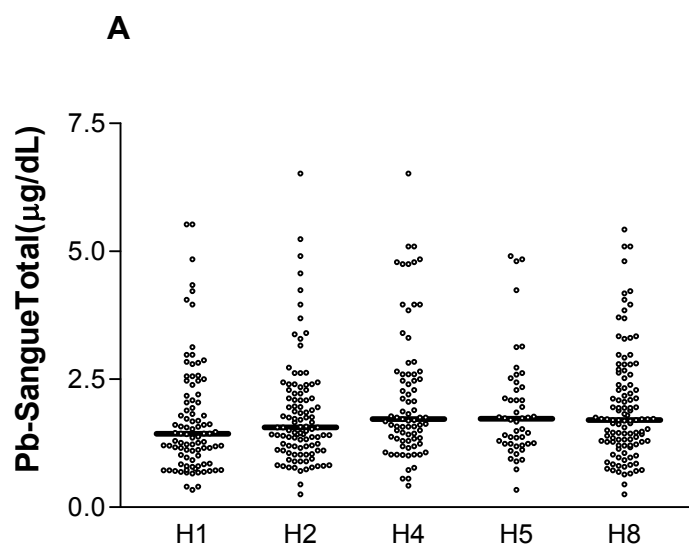
A tabela 6 mostra a frequência haplotípica (%) estimada para os polimorfismos VDR. Para o estudo foram excluídas as frequências inferiores a 10%.

Tabela 6- Frequência haplotípica (%) estimada para os polimorfismos VDR

	Haplótipos			Frequência (%)
	<i>FokI</i> <i>Apal</i>	<i>Apal</i>	<i>BsmI</i>	
H1 -	<i>F</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	12,1
H2 -	<i>F</i>	<i>A</i>	<i>b</i>	21,9
H3 -	<i>F</i>	<i>a</i>	<i>B</i>	9,3
H4 -	<i>F</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	17,6
H5 -	<i>f</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	12,0
H6 -	<i>f</i>	<i>A</i>	<i>b</i>	8,1
H7 -	<i>f</i>	<i>a</i>	<i>B</i>	5,2
H8 -	<i>f</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	13,8

Os haplótipos VDR (*FokI*, *Apal* e *BsmI*)polimorfismos *BsmI* (*VDR*) não modificam as concentrações sanguíneas de Pb, porém o haplótipo H8 (formados pelos alelos *f*, *a* e *b*) modificam as concentrações plasmáticas e fração livre de Pb nas amostras das gestantes

A figura 18 mostra que não houve diferenças significativas para as médias das concentrações sanguíneas (A) (Pb-SangueTotal). Porém, o grupo de haplótipo H8, formado pelos alelos *a*, *b* e *f*, mostrou uma diminuição das concentrações séricas de chumbo (B) (Pb-Soro) e fração livre (C)(Pb-Soro/ Pb-SangueTotal) quando comparados com demais grupos.



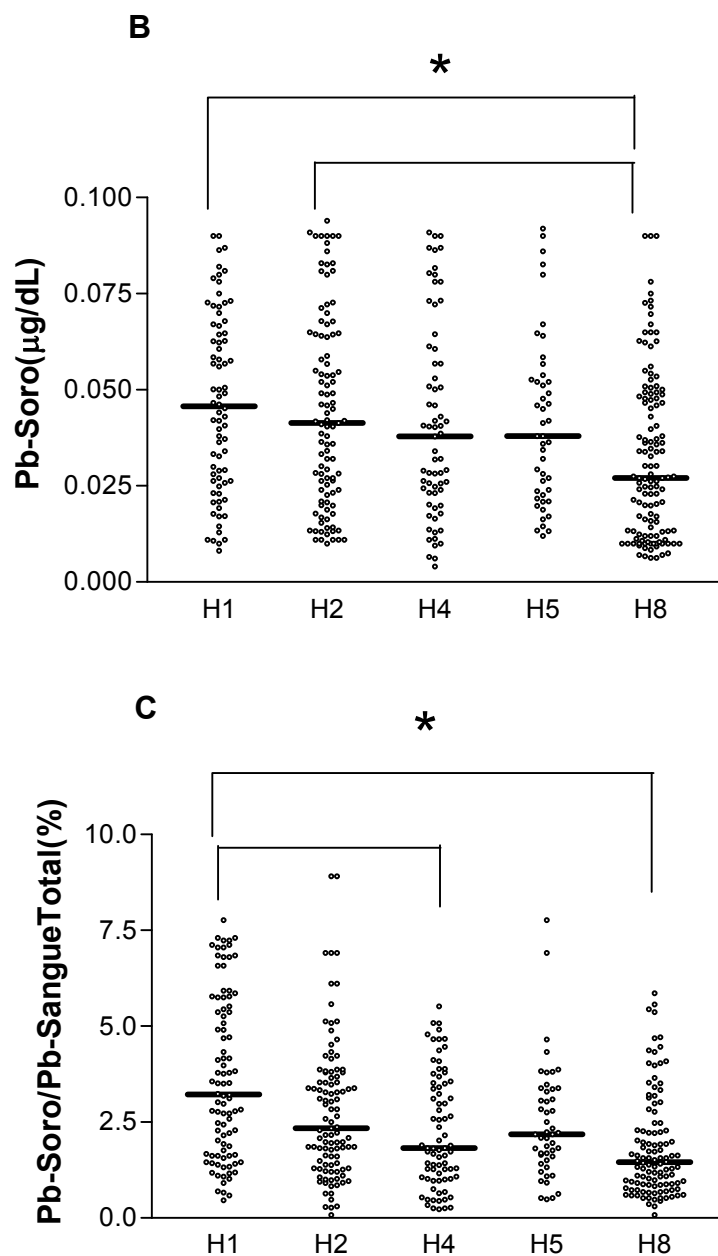


Figura 18- Variação nas concentrações sanguíneas (A), séricas (B) e fração livre (C) de Pb entre os diferentes haplótipos de grávidas $P > 0,05$ *One way Anova*

As barras indicam as medianas. $*P < 0,05$ para as comparações indicadas. *One Way Anova*. Foram excluídos os grupos com frequências inferiores a 10%.

6- DISCUSSÃO

O remodelamento ósseo na gravidez promove a saída do chumbo dos estoques ósseos para o plasma materno. Como a placenta não é seletiva para o chumbo, o metal é transferido para o feto, caracterizando a contaminação materno fetal[1]. As gestantes desse estudo apresentaram valores de chumbo no sangue entre 0,250 e 6,520µg/dL e média de $1,915 \pm 0,068\mu\text{g/dL}$. Para as amostras coletadas dos respectivos cordões umbilicais, o Pb no sangue variou entre 0,090 e 4,120µg/dL. e apresentou média de $1,156 \pm 0,036\mu\text{g/dL}$. A figura 13 mostra que mesmo em concentrações relativamente baixas, o metal foi encontrado na circulação materno fetal. Essa exposição é preocupante se considerarmos os trabalhos já publicados, onde concentrações cada vez menores no sangue materno, vem sendo associadas a problemas na primeira infância da criança.

Goyer e colaboradores[77] revisaram as consequências da exposição pré natal ao chumbo sobre o desenvolvimento neurológico de crianças. Utilizando a Escala de Bayley (Escala de desenvolvimento infantil, produzida a partir de testes padronizados que permitem concluir a respeito do desenvolvimento de crianças) avaliou crianças com baixas concentrações de chumbo no sangue ao nascer e verificaram uma diminuição no desenvolvimento motor, sensorial e visual. Um estudo recente associou exposição fetal ao chumbo e o desenvolvimento mental em crianças de 12, 24 e 36 meses de vida. Os autores estudaram 444 crianças nascidas de mães atendidas no ambulatório do local, entre o primeiro e segundo trimestres de gravidez. A avaliação da exposição fetal foi feita através da dosagem do metal no sangue do cordão umbilical e o desenvolvimento mental na infância usando a mesma escala citada no estudo anterior (Escala de Bayley). A mediana das concentrações de chumbo no sangue do cordão umbilical foi de 1,23µg/dL, variando de 0,44 a 6,90µg/dL. Os testes mostraram associação inversa das concentrações de chumbo no sangue materno com índices de desenvolvimento mental medido através da escala de Bayley, mostrando que o impacto da neurotoxicidade pode ser sentida nos primeiros anos de vida e com concentrações consideradas relativamente baixas[78]. O ideal para um metal tóxico, pouco excretado como o chumbo, são concentrações iguais a zero[79].

O estudo da toxicocinética do chumbo ainda não está completamente esclarecido, mas sabemos que existem fatores relacionados a esta cinética que podem modificar as concentrações sanguíneas[80, 81] e plasmáticas do metal [16, 17]. Os dois genes que codificam proteínas envolvidas no processo de absorção, distribuição e reabsorção do Pb são: ALAD e VDR[3]. O principal objetivo desse trabalho foi avaliar se fatores genéticos modificam as concentrações do metal no sangue e soro de gestantes expostas ambientalmente ao chumbo. Porém, para podermos avaliar adequadamente esses fatores, duas questões foram consideradas anteriormente: saber qual a distribuição da frequência de genótipos e haplótipos na população brasileira e se havia diferenças entre brancos e negros, além disso, a padronização dos processos metodológicos envolvidos na análise do chumbo plasmático.

6.1- Distribuição da frequência genotípica e haplotípica do VDR entre brancos e negros da população brasileira

O primeiro objetivo dessa tese foi avaliar a distribuição dos genótipos e haplótipos do *VDR* entre a população branca e negra do Brasil e também compará-las a população do HapMap. Nossas descobertas mostraram que a distribuição das variantes do gene *VDR* pode ser diferente entre as raças em algumas populações, como a população que foi estudada no HapMap. Entretanto, essa regra não se aplica para populações miscigenadas, como a população brasileira. Na população Caucasiana do HapMap, o alelo *f* para o polimorfismo *FokI* foi mais comum entre os Caucasianos que entre os Africanos. Nós não encontramos essa diferença, uma vez que a população brasileira é uma mistura de populações. Entretanto, não acreditamos que essas diferenças sejam apenas devido ao fato da população brasileira ser miscigenada. Conforme discutido por Uitterlinden e colaboradores[56], os blocos de haplótipos podem refletir a origem da população e também, as interações gene-ambiente. Dessa forma, certas variações podem ter vantagens de sobrevivência e reprodução. Por outro lado, muitos dos SNPs são encontrados em Desequilíbrio

de Ligação (DL) em regiões chamadas blocos haplotípicos os quais nos dão mais informações em estudos de associação que o estudo de SNPs isoladamente. Nós calculamos D' (D' = medida de desequilíbrio de ligação) para a população brasileira e para a população do HapMap. Para a população do HapMap, encontramos o $D'=1,0$ ($P<0,05$) tanto para brancos quanto para negros, indicando um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos *BsmI* e *Apal*. O polimorfismo *FokI* não está em desequilíbrio de ligação com nenhum outro polimorfismo no *VDR*. Não encontramos o mesmo para a população brasileira. Para os polimorfismos *Apal* e *BsmI* D' para a população brasileira é quase 0 ($P=0,99$), indicando que não há desequilíbrio de ligação entre esses polimorfismos. Juntos, esses resultados sugerem que blocos de haplótipos selecionados para uma população podem não ser transferíveis para populações como a população brasileira, que é miscigenada[82].

6.2- Dosagem do Pb no soro e/ou plasma necessita de cuidados metodológicos

A maioria dos estudos de associação considera a análise do metal no sangue materno[41]. A razão pela qual nós também avaliamos as concentrações de Pb-Soro e %Pb-Soro/Pb-Sangue Total é que a mobilização de Pb nos ossos na gravidez contribui para o aumento da fração plasmática do metal. Avaliando as concentrações do metal no sangue e plasma e a relação dessas concentrações, podemos ter uma idéia melhor da quantidade do metal que está sendo disponibilizada para o feto[1]. Entretanto, para se avaliar o Pb no plasma e/ou soro, são necessários cuidados metodológicos no processamento das amostras e também, técnicas mais apuradas, como ICPMS. Dessa forma, o segundo objetivo dessa tese foi avaliar se os procedimentos metodológicos alteram as concentrações de Pb, Fe (Ferro) e Hb (Hemoglobina livre). As dosagens de Fe e Hb foram usadas como indicadores de hemólises[83].

Como o Pb está ligado a ALAD no eritrócito, hemólises resultantes de procedimentos inadequados na coleta e processamento das amostras, podem trazer resultados errôneos a respeito da concentração plasmática do chumbo[84]. Para tal, dosamos concentrações plasmáticas de Fe e Hb livre. Os valores de referência para Fe: são 500 a 1600µg/dL e Hb livre: até 5µg/dL. Não encontramos diferenças entre as concentrações de Pb e Fe quando a coleta foi feita com sistema a vácuo (vacuumtainer) ou sem vácuo (catheter). Dessa forma, sugerimos que a utilização do método vacuumtainer é mais adequado por ser mais prático e evita contaminações por ser um “sistema fechado”.

O tempo de espera entre a coleta e o processamento das amostras também não modificaram as concentrações de Pb, Fe e Hb. Dessa forma, nós padronizamos um tempo de até 10 minutos para o estudo posterior. O mais interessante para essa etapa do estudo foi o aumento da concentração plasmática de Pb quando usamos os tubos de EDTA. Sabe-se que o EDTA é um forte quelante de Pb[84]. O fato de quelar o metal que está livre no plasma faz com que o Pb que estava no eritrócito se desloque do eritrócito, aumentando a fração plasmática. Por esse motivo, não foram utilizados os tubos com EDTA para o estudo posterior quando analisamos o metal no plasma. Os tubos contendo esse anticoagulante apenas foram utilizados para as dosagens do metal no sangue total, pois o ICPMS pode detectar o metal mesmo quando quelado pelo EDTA.

6.3- Haplótipos VDR modificam as concentrações de Pb-Soro e Fração plasmática (Pb-Soro/Pb-Sangue Total)

Existem grandes evidências sugerindo um importante papel de polimorfismos genéticos na toxicidade do Pb. Os genes mais estudados são aqueles que codificam a ALAD e o Receptor da Vitamina D (VDR)[16, 17, 19, 80]. A associação de polimorfismos nesses genes com o acúmulo biológico de chumbo em indivíduos expostos já é bem conhecida, embora o mecanismo através do qual esse feito ocorre ainda não esteja esclarecido.

Considerando os dados atualmente disponíveis na literatura, este é o primeiro estudo a demonstrar a associação dos polimorfismos *G177C* da *ALAD* e os polimorfismos *FokI*, *ApaI* e *BsmI* do *VDR* em grávidas ambientalmente expostas ao chumbo.

Estudando os genótipos da *ALAD*, para os indivíduos *ALAD* 1-1 as concentrações de Pb-Sangue Total variaram de 0,250 a 6,520µg/dL, com médias de $1,876 \pm 0,074$ e para os indivíduos *ALAD* 1-2: 0,340 a 5,530µg/dL, com médias de $1,959 \pm 0,168$ µg/dL. Esses valores não foram estatisticamente significativos, embora as concentrações plasmáticas e frações plasmáticas dos indivíduos *ALAD* 2 tendessem ao aumento (figura 15). Esses resultados foram esperados, uma vez que as concentrações estavam relativamente baixas, comparadas com os valores de outros estudos. Muitos trabalhos já mostraram influência desses genótipos sobre as concentrações sanguíneas e alguns sobre concentrações plasmáticas do metal[17, 46, 49, 85, 86]. Existem desacordos quanto ao genótipo que pode estar associado a maiores concentrações de chumbo.

No caso da *ALAD*, dois diferentes cenários podem ser abertos para a discussão. Como a substituição de um único aminoácido, que caracteriza o polimorfismo *G177C* leva a formação de enzimas com diferentes cargas, o chumbo eletricamente positivo, terá uma afinidade maior pela enzima mais eletronegativa (codificada pelo *ALAD* 2)[46]. Esses indivíduos portadores desse alelo, segundo alguns estudos, apresentam concentrações de chumbo maiores no sangue e também no plasma. Esse aumento poderia ser explicado pelo fato do chumbo possuir uma maior afinidade pela enzima mais eletronegativa aumentando a distribuição do metal para outros órgãos-alvo como rins e cérebro. Sugere-se que, a *ALAD* 2-2 possa ser um seqüestrador 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 *ALAD*2 experimentaríamos 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 homozigotos para o alelo *ALAD*1, expostos aos mesmos níveis de chumbo.

De uma maneira geral, as concentrações sanguíneas de chumbo nesses estudos são maiores do que as encontradas na nossa população. No entanto, há uma outra colocação na literatura, onde se atribui às baixas concentrações, o motivo pelo qual o efeito do genótipo não aparece. Analisando os trabalhos onde os autores encontraram diferenças significativas nas concentrações do metal, sendo estas moduladas pelos genótipos, encontramos concentrações normalmente maiores que 10µg/dL. No caso dos nossos resultados, o fato de não termos encontrado diferenças significativas para as concentrações do metal entre os genótipos ALAD 1-1 e ALAD 1-2 (nós não encontramos indivíduos ALAD 2-2), pode ser explicado pela concentração do metal estar relativamente baixa no sangue (Média Pb-Sangue Total 1,89 µg/dL). É provável que, se estudássemos uma população exposta a concentrações maiores de chumbo, poderíamos encontrar algum efeito do genótipo.

Outro gene que também tem sido associado à toxicidade do chumbo é o VDR [3]. Como mencionado anteriormente, o chumbo é similar ao cálcio e segue suas rotas no organismo[22]. A vitamina D está diretamente relacionada ao balanço de cálcio fisiológico e sua função depende da ligação com o receptor nuclear VDR, presente na maioria das células, incluindo osteoblastos (figura 6)[55]. Parece que o retorno do chumbo dos estoques ósseos segue o caminho do cálcio, durante o remodelamento. Os estudos de associação dos genótipos VDR com diferentes concentrações sanguíneas e plasmáticas de chumbo foram baseados no fato de que o remodelamento ósseo possui um fator genético determinante. 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. Nesse caso, o genótipo BB seria um indicador para o risco de osteoporose[75]. Outros estudos também associaram baixa densidade mineral óssea em mulheres com o alelo “B”[87, 88]. Mulheres homozigotas para o alelo “B” possuem densidade mineral óssea cerca de 2 a 10% menores que mulheres bb[65].

Foi baseado nisso, que surgiram as primeiras associações desses polimorfismos com concentrações sanguíneas e ósseas do metal. Schwartz e colaboradores[89] associaram polimorfismos *BsmI* a concentrações de chumbo na tíbia de trabalhadores expostos de forma ocupacional e encontraram uma associação dos homozigotos *bb* a uma menor concentração de chumbo na tíbia.

Os polimorfismos VDR, especialmente *BsmI*, *Apal* e *FokI* já foram isoladamente associados a diferentes concentrações do metal no sangue e plasma de indivíduos expostos ambientalmente. Em nosso estudo anterior (indivíduos ambientalmente expostos com concentração média de Pb-Sangue Total=7,1ug/dL), portadores dos alelos *bb*, *aa* e *ff* foram associados a concentrações menores de chumbo no plasma e fração plasmática[16].

Considerando a importância da cinética Pb na gravidez, é razoável associar os efeitos dos polimorfismos e/ou haplótipos no gene VDR sobre as concentrações sanguíneas e plasmáticas de chumbo nessa fase.

No atual estudo, não encontramos influência dos genótipos VDR para as concentrações sanguíneas e plasmáticas do Pb. As figuras 15, 16 e 17 podem representar talvez, uma tendência a concentrações menores para os genótipos *bb*, *ff* e *aa*. No entanto, mais uma vez, se as concentrações do metal fossem maiores no sangue e/ou plasma, essa diferença talvez pudesse ser evidenciada.

Entretanto, 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 este, associado a uma diminuição da concentração de Pb-Soro e %Pb-Soro/Pb-Sangue Total. 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[90] e principalmente osteoporose[91]. Em nosso estudo anterior, este mesmo grupo de haplótipo foi associado a menores concentrações sanguíneas e plasmáticas de chumbo[16]. Contudo, este foi o primeiro trabalho a

demonstrar o efeito de haplótipos sobre as concentrações de Pb-P e %Pb-P/Pb-S em mulheres grávidas.

A funcionalidade da maioria dos polimorfismos, incluindo aqueles aqui estudados, ainda permanece desconhecida[92]. 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-Plasma 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 *Apal* aqui estudados ainda permanece desconhecida. Como já mencionado anteriormente, esses polimorfismos aparentemente “não funcionais” podem apresentar desequilíbrio de ligação com algum outro funcional, na região reguladora do gene. A localização desses polimorfismos no mapa físico do gene VDR mostra uma proximidade com a região reguladora do gene. Uitterlinden e colaboradores[56, 57] discutem que até mesmo a proximidade do gene VDR com o gene do colágeno (COL2A1) pode explicar muitos dos estudos de associação entre esses polimorfismos.

No caso do nosso estudo, nós escolhemos os três polimorfismos *FokI*, *Apal* e *BsmI* porque eles já haviam sido associado a diferentes concentrações de chumbo no sangue. Além disso, esses polimorfismos estão associados ao metabolismo ósseo e durante a gravidez o remodelamento é um fator importante que deve ser considerado. Estudos dos mecanismos moleculares envolvidos nessa associação são necessários para validar tais efeitos.

Infelizmente, pouco se sabe a respeito da cinética do chumbo e como ocorre a dinâmica durante a gravidez. O que é fato são os efeitos das baixas concentrações do metal no sangue e plasma para as grávidas e para o feto. Nós dosamos as concentrações sanguíneas e plasmáticas das amostras de

sangue do cordão umbilical e encontramos uma correlação entre as concentrações sanguíneas e plasmáticas (soro) mãe x feto (resultados não mostrados). Isso mostra que quanto mais chumbo no sangue e soro maternos maiores as chances do feto se contaminar, pois o metal se encontra na circulação materno fetal. E isso sim é bastante relevante, uma vez que o feto está em desenvolvimento ativo e o chumbo é um elemento estranho e nocivo. Encontrar marcadores genéticos que possam estar relacionados a aumentos das concentrações de chumbo na gravidez pode ser uma ferramenta muito útil na prevenção dos efeitos nocivos do metal. Medidas preventivas talvez possam ser mais efetivas, se encontrarmos diante de um grupo que, sabidamente é mais susceptível ao metal.

Nós também não encontramos diferenças entre os genótipos maternos e as concentrações do metal nas amostras de cordão umbilical. A questão da cinética mãe-feto é mais complexa, pois o feto representa um outro compartimento que também está acumulando (pois ele está sob exposição recente, através da mãe) e remodelando, pois está em crescimento. Estudos posteriores são necessários para a compreensão desses processos. Porém, há uma população de crianças nascidas dessas gestantes, que foram expostas a concentrações relativamente baixas, que estão crescendo, mas não sabemos quais serão os efeitos dessa exposição para o desenvolvimento intelectual no futuro.

7- CONCLUSÃO

Este estudo sugere que gestantes portadoras do haplótipo H8 (formado pela combinação dos alelos f, a, b para os polimorfismos *FokI*, *Apal* e *BsmI* do VDR experimentam menores concentrações de Pb-Soro e %Pb-Soro/Pb-SangueTotal do que as não portadoras deste haplotipo, o que sugere que as mães portadoras do haplótipo H8 são menos vulneráveis à contaminação por chumbo. Já aquelas portadoras do polimorfismo da D-ALAD parece não apresentarem diferenças nas concentrações plasmáticas de Pb na gestação.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Silbergeld EK, Patrick TE. Environmental exposures, toxicologic mechanisms, and adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192(5 Suppl):S11-21.
- [2] Rabinowitz MB. Toxicokinetics of bone lead. *Environ Health Perspect.* 1991;91:33-7.
- [3] Onalaja AO, Claudio L. Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ Health Perspect.* 2000;108(Suppl 1):23-8.
- [4] Nriagu JO. Occupational exposure to lead in ancient times. *Sci Total Environ.* 1983;31(2):105-16.
- [5] Gidlow DA. Lead toxicity. *Occup Med (Lond).* 2004;54(2):76-81.
- [6] Steinbock RT. Lead ingestion in history. *N Engl J Med.* 1979;301(5):277.
- [7] Nriagu JO. Saturnine gout among Roman aristocrats. Did lead poisoning contribute to the fall of the Empire? *N Engl J Med.* 1983;308(11):660-3.
- [8] Woolley DE. A perspective of lead poisoning in antiquity and the present. *Neurotoxicology.* 1984;5(3):353-61.
- [9] Patrick L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev.* 2006;11(1):2-22.
- [10] de Freitas CU, De Capitani EM, Gouveia N, Simonetti MH, de Paula ESMR, Kira CS, et al. Lead exposure in an urban community: investigation of risk factors and assessment of the impact of lead abatement measures. *Environ Res.* 2007;103(3):338-44. Epub 2006 Nov 7.
- [11] Needleman HL. The removal of lead from gasoline: historical and personal reflections. *Environ Res.* 2000;84(1):20-35.
- [12] Annet JL, Pirkle JL, Makuc D, Neese JW, Bayse DD, Kovar MG. Chronological trend in blood lead levels between 1976 and 1980. *N Engl J Med.* 1983;308(23):1373-7.

- [13] de Freitas Cu Fau - De Capitani EM, De Capitani Em Fau - Gouveia N, Gouveia N Fau - Simonetti MH, Simonetti Mh Fau - de Paula E Silva MR, de Paula E Silva Mr Fau - Kira CS, Kira Cs Fau - Sakuma AM, et al. Lead exposure in an urban community: investigation of risk factors and. *Environ Res.* 2007;103(3):338-44.
- [14] Carvalho F, Tavares TM, Souza SP, Linhares PS. Lead and cadmium concentrations in the hair of fishermen from the Subae River basin, Brazil. *Environ Res.* 1984;33(2):300-6.
- [15] Carvalho FM, Silvany-Neto AM, Tavares TM, Lima ME, Waldron HA. Lead poisoning among children from Santo Amaro, Brazil. *Bull Pan Am Health Organ.* 1985;19(2):165-75.
- [16] Rezende VB, Barbosa F, Jr., Montenegro MF, Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Haplotypes of vitamin D receptor modulate the circulating levels of lead in exposed subjects. *Arch Toxicol.* 2008;82(1):29-36.
- [17] Montenegro MF, Barbosa F, Jr., Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies plasma/whole blood lead ratio. *Arch Toxicol.* 2006;80(7):394-8.
- [18] de Almeida GR, de Souza Guerra C, Tanus-Santos JE, Barbosa F, Jr., Gerlach RF. A plateau detected in lead accumulation in subsurface deciduous enamel from individuals exposed to lead may be useful to identify children and regions exposed to higher levels of lead. *Environ Res.* 2008;107(2):264-70.
- [19] 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.
- [20] Bergdahl IA, Gerhardsson L, Liljelind IE, Nilsson L, Skerfving S. Plasma-lead concentration: investigations into its usefulness for biological monitoring of occupational lead exposure. *Am J Ind Med.* 2006;49(2):93-101.

- [21] Moreira FR, Moreira JC. [Effects of lead exposure on the human body and health implications]. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;15(2):119-29.
- [22] Kirberger M, Yang JJ. Structural differences between Pb²⁺- and Ca²⁺-binding sites in proteins: implications with respect to toxicity. *J Inorg Biochem*. 2008;102(10):1901-9.
- [23] Barbosa F, Jr., Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect*. 2005;113(12):1669-74.
- [24] Hu H, Rabinowitz M, Smith D. Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: conceptual paradigms. *Environ Health Perspect*. 1998;106(1):1-8.
- [25] Menke A, Muntner P, Batuman V, Silbergeld EK, Guallar E. Blood lead below 0.48 micromol/L (10 microg/dL) and mortality among US adults. *Circulation*. 2006;114(13):1388-94.
- [26] Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Lead exposure and cardiovascular disease--a systematic review. *Environ Health Perspect*. 2007;115(3):472-82.
- [27] Hu Y, Shen H, Keep RF, Smith DE. Peptide transporter 2 (PEPT2) expression in brain protects against 5-aminolevulinic acid neurotoxicity. *J Neurochem*. 2007;103(5):2058-65.
- [28] Pischik E, Kauppinen R. Neurological manifestations of acute intermittent porphyria. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2009;55(1):72-83.
- [29] Patrick L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of. *Altern Med Rev*. 2006;11(2):114-27.
- [30] Pounds JG, Long GJ, Rosen JF. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ Health Perspect*. 1991;91:17-32.

- [31] Hamanishi T Fau - Furuta H, Furuta H Fau - Kato H, Kato H Fau - Doi A, Doi A Fau - Tamai M, Tamai M Fau - Shimomura H, Shimomura H Fau - Sakagashira S, et al. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are. *Diabetes*. 2004;53(9):2455-60.
- [32] Zetterlund B, Winberg J, Lundgren G, Johansson G. Lead in umbilical cord blood correlated with the blood lead of the mother in areas with low, medium or high atmospheric pollution. *Acta Paediatr Scand*. 1977;66(2):169-75.
- [33] Dorea JG, Donangelo CM. Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. *Clin Nutr*. 2006;25(3):369-76.
- [34] Bellinger D Fau - Leviton A, Leviton A Fau - Waternaux C, Waternaux C Fau - Needleman H, Needleman H Fau - Rabinowitz M, Rabinowitz M. Low-level lead exposure, social class, and infant development. *Neurotoxicol Teratol*. 1988;10(6):497-503.
- [35] McIntosh MJ, Meredith PA, Petty MA, Reid JL. Influence of lead exposure on catecholamine metabolism in discrete rat brain nuclei. *Comp Biochem Physiol C*. 1988;89(2):211-3.
- [36] Banks Ec Fau - Ferretti LE, Ferretti Le Fau - Shucard DW, Shucard DW. Effects of low level lead exposure on cognitive function in children: a. *Neurotoxicology*. 1997;18(1):237-81.
- [37] Bellinger D Fau - Leviton A, Leviton A Fau - Waternaux C, Waternaux C Fau - Needleman H, Needleman H Fau - Rabinowitz M, Rabinowitz M. Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early. *N Engl J Med*. 1987;316(17):1037-43.
- [38] Buchet Jp Fau - Lauwerys R, Lauwerys R Fau - Roels H, Roels H Fau - Hubermont G, Hubermont G. Mobilization of lead during pregnancy in rats. *Int Arch Occup Environ Health*. 1977;40(1):33-6 FAU - Buchet, J P.

- [39] Dietrich Kn Fau - Succop PA, Succop Pa Fau - Bornschein RL, Bornschein RI Fau - Krafft KM, Krafft Km Fau - Berger O, Berger O Fau - Hammond PB, Hammond Pb Fau - Buncher CR, et al. Lead exposure and neurobehavioral development in later infancy. *Environ Health Perspect.* 1990;89:13-9.
- [40] Sciarillo WG, Alexander G, Farrell KP. Lead exposure and child behavior. *Am J Public Health.* 1992;82(10):1356-60.
- [41] ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 1999;68-196.
- [42] Takser L, Mergler D, Lafond J. Very low level environmental exposure to lead and prolactin levels during pregnancy. *Neurotoxicol Teratol.* 2005;27(3):505-8.
- [43] Lafond J, Hamel A, Takser L, Vaillancourt C, Mergler D. Low environmental contamination by lead in pregnant women: effect on calcium transfer in human placental syncytiotrophoblasts. *J Toxicol Environ Health A.* 2004;67(14):1069-79.
- [44] Crawford DC, Akey DT, Nickerson DA. The patterns of natural variation in human genes. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005;6:287-312.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] 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.

- [48] 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.
- [49] Wetmur JG, Kaya AH, Plewinska M, Desnick RJ. Molecular characterization of the human delta-aminolevulinate dehydratase 2 (ALAD2) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. *Am J Hum Genet*. 1991;49(4):757-63.
- [50] 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.
- [51] Montenegro MF, Barbosa F, Jr., 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.
- [52] Wetmur JG, Kaya AH, Plewinska M, Desnick RJ. Molecular characterization of the human delta-aminolevulinate dehydratase 2 (ALAD2) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. *Am J Hum Genet*. 1991;49(4):757-63.
- [53] Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;92(1):4-8. Epub 2006 Feb 28.
- [54] McDonnell DP, Mangelsdorf DJ, Pike JW, Haussler MR, O'Malley BW. Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science*. 1987;235(4793):1214-7.
- [55] Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-81.
- [56] Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004;338(2):143-56.

- [57] Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89-90(1-5):187-93.
- [58] Schwartz BS, Lee BK, Lee GS, Stewart WF, Simon D, Kelsey K, et al. 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.* 2000;108(10):949-54.
- [59] Schwartz BS, Stewart WF, Kelsey KT, Simon D, Park S, Links JM, et al. Associations of tibial lead levels with BsmI polymorphisms in the vitamin D receptor in former organolead manufacturing workers. *Environ Health Perspect.* 2000;108(3):199-203.
- [60] Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89(15):6665-9.
- [61] Gross C, Krishnan AV, Malloy PJ, Eccleshall TR, Zhao XY, Feldman D. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants. *J Bone Miner Res.* 1998;13(11):1691-9.
- [62] Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Odding E, Duijn CM, Hofman A, et al. Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knee. *J Clin Invest.* 1997;100(2):259-63.
- [63] Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res.* 1996;11(12):1841-9.
- [64] Thijssen JH. Gene polymorphisms involved in the regulation of bone quality. *Gynecol Endocrinol.* 2006;22(3):131-9.
- [65] Vandevyver C, Wylin T, Cassiman JJ, Raus J, Geusens P. Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res.* 1997;12(2):241-7.

- [66] Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, et al. Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. *Eur J Cancer*. 2005;41(8):1164-9. Epub 2005 Apr 14.
- [67] Gunes S, Bilen CY, Kara N, Asci R, Bagci H, Yilmaz AF. Vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with urolithiasis. *Urol Res*. 2006;34(1):47-52. Epub 2006 Jan 6.
- [68] Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*. 2005;56:303-20.
- [69] Montpetit A, Chagnon F. [The Haplotype Map of the human genome: a revolution in the genetics of complex diseases]. *Med Sci (Paris)*. 2006;22(12):1061-7.
- [70] Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 2001;68(4):978-89.
- [71] A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437(7063):1299-320.
- [72] 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.
- [73] Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HT, et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;177(1-2):145-59.
- [74] Faraco JH, Morrison NA, Baker A, Shine J, Frossard PM. Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(5):2150.
- [75] Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994;367(6460):284-7.

- [76] 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.
- [77] Goyer RA. Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. *Environ Health Perspect.* 1996;104(10):1050-4.
- [78] Jedrychowski W, Perera FP, Jankowski J, Mrozek-Budzyn D, Mroz E, Flak E, et al. Very low prenatal exposure to lead and mental development of children in infancy and early childhood: Krakow prospective cohort study. *Neuroepidemiology.* 2009;32(4):270-8.
- [79] Rogan WJ, Ware JH. Exposure to lead in children--how low is low enough? *N Engl J Med.* 2003;348(16):1515-6.
- [80] Schwartz BS, Lee BK, Lee GS, Stewart WF, Simon D, Kelsey K, et al. 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.* 2000;108(10):949-54.
- [81] 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.
- [82] Rezende VB, Barbosa F, Jr., Montenegro MF, Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. An interethnic comparison of the distribution of vitamin D receptor genotypes and haplotypes. *Clin Chim Acta.* 2007;384(1-2):155-9.
- [83] 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.
- [84] Manton WI, Rothenberg SJ, Manalo M. The lead content of blood serum. *Environ Res.* 2001;86(3):263-73.

- [85] Fleming DE, Chettle DR, Wetmur JG, Desnick RJ, Robin JP, Boulay D, et al. Effect of the delta-aminolevulinate dehydratase polymorphism on the accumulation of lead in bone and blood in lead smelter workers. *Environ Res.* 1998;77(1):49-61.
- [86] 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.
- [87] Gong G, Stern HS, Cheng SC, Fong N, Mordeson J, Deng HW, et al. The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms. *Osteoporos Int.* 1999;9(1):55-64.
- [88] Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, Tawa T, Miura Y, Fukamauchi K, et al. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res.* 1996;11(7):1003-9.
- [89] Schwartz BS, Stewart WF, Kelsey KT, Simon D, Park S, Links JM, et al. Associations of tibial lead levels with BsmI polymorphisms in the vitamin D receptor in former organolead manufacturing workers. *Environ Health Perspect.* 2000;108(3):199-203.
- [90] Cicek MS, Liu X, Schumacher FR, Casey G, Witte JS. Vitamin D receptor genotypes/haplotypes and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(12):2549-52.
- [91] Grundberg E, Lau EM, Pastinen T, Kindmark A, Nilsson O, Ljunggren O, et al. 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.* 2007;19:19.
- [92] Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004;338(2):143-56.

9- ANEXOS

Parecer do Comitê de Ética



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: **“Implicações Toxicogenéticas da Exposição Ambiental a Metais Durante a Gravidez”**

Responsáveis:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (FMRP-USP)

Profa Dra. Silvana Maria Quintana - (FMRP-USP)

Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach - (FORP - USP)

Eu, _____,
fui convidado a participar do estudo **“Implicações Toxicogenéticas da Exposição Ambiental a Metais Durante a Gravidez”**

- 1) Este projeto pretende basicamente estudar alguns marcadores encontrados em nossos genes e marcadores bioquímicos (substâncias comuns que existem no seu plasma) que possam alterar as concentrações de metais no seu sangue e no sangue do cordão umbilical. Isto poderá nos auxiliar no entendimento de como a intoxicação ambiental por metais afeta as diversas funções no nosso organismo e se há passagem desses metais para o bebê. 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 do seu sangue e no sangue da placenta.

2) Sua participação neste estudo será:

Serão retirados, no máximo, 20mL do seu sangue, coletados por punção venosa utilizando técnica adequada. Este sangue será utilizado para realizar todo os estudos bioquímicos e genéticos mencionados acima.

Serão coletados também sangue e parte da placenta, assim que ela for expelida após o nascimento do bebê. Normalmente a placenta é descartada.

Com isto, encerra-se a sua participação neste estudo.

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

4) 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.

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

6) 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 ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (telefone 016-602-3163), do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), à Dra. Silvana Maria Quintana (telefone 016-3602-2813), do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) ou à Dra Raque Gerlach (telefone 016-3602-4065) do Departamento de Histologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP). O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da MATER é 3962-8200

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

Ribeirão Preto , _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Assinatura do investigador/testemunha

Short communication

An interethnic comparison of the distribution of vitamin D receptor genotypes and haplotypes

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

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, São University of Campinas, 13081-970, Campinas, SP, Brazil

^b Department of Clinical, Toxicological and Food Science Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, Av. do Café s/n, S.P. 14040-903, Ribeirão Preto, Brazil

^c Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, CEP 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Department of Morphology, Endocrinology and Physiology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Received 20 April 2007; received in revised form 9 May 2007; accepted 14 May 2007

Available online 23 May 2007

Abstract

Background: The biological actions of vitamin D receptor (VDR) may be affected by genetic variations in the VDR gene. While there are interethnic differences in the frequency of VDR gene variants, there is little haplotype information, especially from admixed populations. We examined the distribution of genetic variants of 3 VDR polymorphisms (*BsmI*, *ApoI* and *FokI*) and haplotypes in black and white Brazilians. We have also compared our results with those from the HapMap project.

Methods: We studied 120 subjects self reported as black, and 100 subjects self reported as white (total $N = 220$; men and women; age range: 19–56 years). Genomic DNA was extracted from venous blood and the genotypes for the VDR gene polymorphisms were determined by PCR followed by restriction fragment length digestion and gel electrophoresis. Haplotypes were inferred with the program PHASE ver. 2.1.

Results: While the distribution of VDR genotypes or alleles for the 3 VDR gene polymorphisms in Brazilians showed no interethnic differences (all $P < 0.05$), significant differences were found for the *ApoI* and *FokI* polymorphisms in the HapMap populations (both $P < 0.05$). While no interethnic differences in the distribution of haplotypes were found in Brazilians ($P > 0.05$), significant differences were found in the HapMap populations ($P < 0.05$).

Conclusions: VDR genotype and haplotype differences between the Brazilian population and the HapMap population gives support to the idea that significant differences in haplotype structures may exist between different populations, especially admixed populations.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Genotype; Haplotype; Interethnic differences; Polymorphisms; Vitamin D receptor

1. Introduction

Vitamin D and its active metabolites (especially 1,25-dihydroxyvitamin D, or calcitriol) are primarily involved in maintaining bone and calcium homeostasis, but other important roles have also been studied [1–3]. Many of the biological actions of vitamin D are mediated by vitamin D receptor (VDR), which is

an ligand-activated transcription factor [1]. The effects produced by vitamin D may be affected by several genetic variations (single nucleotide polymorphisms; SNP) that have been identified in the VDR gene. For example, SNPs in VDR gene have been associated with altered calcium metabolism and bone biology [4,5]. Moreover, variations in VDR gene may modulate the susceptibility to cancer, diabetes, and cardiovascular diseases [6,7]. Interestingly, these polymorphisms may also affect the susceptibility to lead toxicity [8].

While there is evidence indicating that VDR gene variants occur with different frequencies in different ethnic groups [4],

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3163; fax: +55 16 3693 2301.
E-mail address: vania@fmrp.usp.br (J.E. Tanus-Santos).

and that it is important to define the haplotype (specific combinations of genetic markers within a chromosome cluster location) structure in different ethnic groups [4], very few studies have provided haplotype information derived from different populations. Moreover, there is no data regarding the frequencies of VDR alleles and haplotypes in heterogeneous populations such as the present-day Brazilian population, which results from extensive interethnic crosses between peoples from different continents including Europeans, Africans, Asians and autochthonous Amerindians [9]. Defining the haplotype structure in different populations may explain in part the ethnic disparities in health risk [10].

We examined the distribution of genetic variants of 3 VDR polymorphisms (*BsmI*, *ApaI* and *FokI*) in black and white Brazilians. Based on previous studies showing significant differences in the distribution of other clinically relevant genetic variants when black and white Brazilians were compared [11,12], we hypothesized that significant differences would be found in the distribution of genetic variants of VDR polymorphisms and haplotypes when comparing black and white Brazilians. We have also compared our results with those from the HapMap project [13].

2. Materials and methods

2.1. Study subjects

Approval for this study was obtained from the Institutional Review Board at the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto. A total of 220 unrelated subjects (age range 19–56 years) living in the city of Baurão (state of São Paulo, Brazil) were randomly selected to participate in this study. We studied 120 subjects self-reported as black, and 100 subjects self-reported as white (total $N = 220$). Because the Brazilian population is heterogeneous, we have not studied subjects self-reported as intermediate. Subjects were recruited to give blood after informed consent was obtained. Venous blood samples were collected into evacuated tubes containing EDTA (Vacuette, Becton-Dickinson, Brazil) and genomic DNA was extracted

from the cellular component of 1 ml of whole blood by a salting-out method and stored at -20°C until analyzed.

2.2. Genotype determination for the VDR polymorphisms

2.2.1. *BsmI* polymorphism (dbSNP ID: rs1544410)

An assay based on polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism was used to determine the genotypes for the *BsmI* polymorphism in intron 3 using the primers 5'-CAACCAAGACTACAAAGTACCGGCTCACTGA-3' and 5'-AATCCAGCGGGAACAGGTCAGAGGG-3', as previously described [14]. The PCR reaction was performed in a 25 μl reaction volume that included approximately 500 ng of template genomic DNA, 0.5 $\mu\text{mol/l}$ of each primer, 200 $\mu\text{mol/l}$ of each dNTP, 1 $\times$ PCR buffer supplied by Invitrogen Corp (10 mmol/l Tris-HCl, pH 8.8, 50 mmol/l KCl, 2.0 mmol/l MgCl_2 and 2.5 U of DNA Taq polymerase (Biosystems, Curitiba, Brazil). The running conditions were: holding at 94°C for 5 min, then 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 67°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min. The resulting 825-bp fragment was digested with *BsmI* (New England Biolabs, Ipswich, MA) for 2 h at 65°C , producing fragments of 825 bp for wild-type allele (allele "B"), or 650 and 175 bp in the case of a polymorphic variant (allele "b"). Fragments were separated by electrophoresis in 8% polyacrylamide gels and visualized by silver staining (Fig. 1).

2.2.2. *ApaI* polymorphism (dbSNP ID: rs7975233)

For the detection of the *ApaI* polymorphism in intron 3, the primers 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3' and 5'-CAACTCTCATGGCTCAAGGTC-3' were used in a PCR [15]. The PCR was performed in a 25- μl reaction volume containing 0.25 $\mu\text{mol/l}$ of each primer, 200 $\mu\text{mol/l}$ of each dNTP, 1 $\times$ PCR buffer supplied by Invitrogen Corp (10 mmol/l Tris-HCl, pH 8.8, 50 mmol/l KCl, 2.0 mmol/l MgCl_2 and 2.5 U of DNA Taq polymerase (Biosystems, Curitiba, Brazil). The running conditions were: pre-denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 68°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. Finally, extension was conducted at 72°C for 7 min. The amplified products were digested with *ApaI* (Fermentas Life Sciences, Hanover, MD) for 2 h at 37°C , producing fragments of 740 bp for wild-type allele (allele "A"), or 515 bp and 225 bp in the case of a polymorphic variant (allele "a"). The fragments were separated by electrophoresis in 8% polyacrylamide gels and visualized by silver staining (Fig. 1).

2.2.3. *FokI* polymorphism (dbSNP ID: rs10733810)

Genotypes for the *FokI* polymorphisms in exon 2 were determined by PCR using the primers: 5'-GATGCCAGCTGGCCCTGGCACTG-3' and 5'-

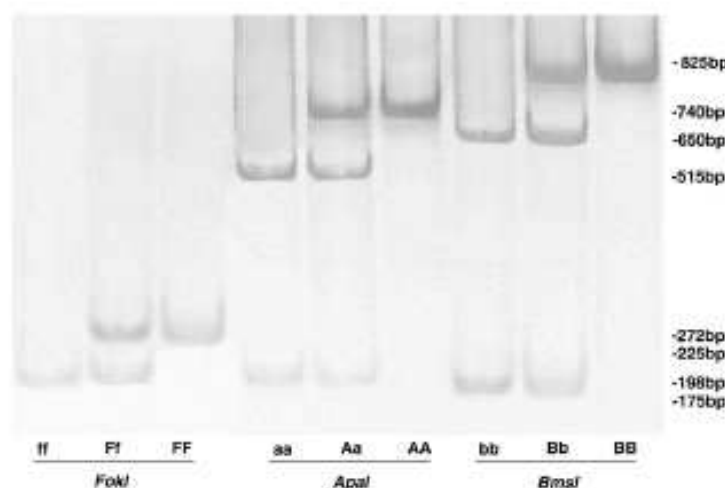


Fig. 1. Genotyping for the *BsmI*, *ApaI* and *FokI* VDR gene polymorphisms. The PCR products were digested with restriction enzymes producing different fragments leading to specific genotypes.

ATGGAAACACCTTGCCTCTCTCCCTC-3' [15]. The PCR was performed in a 25- μ l reaction volume containing 0.20 μ mol/l of each primer, 200 μ mol/l of each dNTP, 1 $\times$ PCR buffer supplied by Invitrogen Corp (10 mmol/l Tris-HCl, pH 8.8, 50 mmol/l KCl, 2.0 mmol/l $MgCl_2$ and 2.5 U of DNA Taq polymerase (Bioprotection, Curitiba, Brazil). The running conditions were: predenaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 69 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s. Finally, extension was conducted at 72 °C for 3 min. The amplified products were digested with *FokI* (Fermentas) for 3 h at 55 °C, producing fragments of 272 bp for wild-type allele (allele "P"), or 198 bp and 74 bp in the case of a polymorphic variant (allele "F"). The fragments were separated by electrophoresis in 8% polyacrylamide gels and visualized by silver staining (Fig. 1).

2.3. Haplotype inference

Haplotypes were inferred using the Bayesian statistical based program PHASE ver. 2.1 (<http://www.stat.washington.edu/phase/phase.html>) [16] to estimate the haplotype frequencies in the 2 ethnic groups. The possible haplotypes including genetic variants of 3 VDR polymorphisms studied (*BsmI*, *ApaI*, *FokI*) were: H1 (ABP), H2 (ABF), H3 (ABP), H4 (ABF), H5 (ABP), H6 (ABF), H7 (abP), and H8 (abf). PHASE was also used to calculate D' (the maximum-likelihood estimate of disequilibrium), which is a standard measure of linkage disequilibrium, as previously described [12]. The estimated disequilibrium D' values for each pairwise combination of variants were calculated as D'/D_{max} , where $D = h - p \cdot q$. Here, p and q are the frequencies for the rarer variants of the two polymorphisms being tested for linkage, such that $p + q < 0.5$, and h is the frequency of the haplotype including two specific variants. When $D < 0$, $D_{max} = -p \cdot q$; when $D > 0$, $D_{max} = p(1 - q)$. Thus, D' values can vary from +1 to -1, with a positive D' indicating that the rarer variants are associated and a negative D' indicating that the rarer variant of one polymorphism is associated with the common variant at the other locus.

2.4. Statistical analysis

The distributions of genotypes for the VDR polymorphisms were assessed for deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium by using chi-squared test (StatView for Windows, Cary, NC). Differences in the genotypes, alleles, and haplotypes frequencies between the two ethnic groups were also assessed with χ^2 . A $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results and discussion

Table 1 shows the frequency of genotypes and alleles in black and white subjects included in the present study, and in subjects included in the HapMap project [13]. The distribution of genotypes for the 3 polymorphisms showed no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Importantly, the distribution of VDR genotypes or alleles for the 3 VDR gene polymorphisms in Brazilians showed no differences between the two ethnic groups (all $P < 0.05$; Table 1). However, significant differences were found in the distribution of genotypes for the *ApaI* polymorphism when blacks were compared with whites from the HapMap project ($P < 0.05$; Table 1). In addition, the distribution of *FokI* genotypes and alleles was significantly different when blacks were compared with whites from the HapMap project (both $P < 0.05$; Table 1). Together, these findings show that ethnicity may have significant effects on the distribution of VDR gene variants in some populations (subjects studied in the HapMap project), but not in all populations. Indeed, the *f* allele for the *FokI* polymorphism was more commonly found in Caucasians than in Africans [4], as we have found for the subjects included in the HapMap project. However, these findings were not replicated in the Brazilian population, which is an admixed population

resulting from interethnic crosses between peoples from different continents [9].

The estimated haplotype frequency for the 2 ethnic groups is shown in Table 2. Interestingly, we found no interethnic differences in the distribution of estimated haplotype frequency in Brazilians ($P > 0.05$; Table 2). However, significant interethnic differences were found in haplotype distribution in the HapMap populations ($P < 0.05$; Table 2). In addition, significant differences were found when the distribution of haplotype frequency in white Brazilians was compared with that found in the HapMap project white population ($P < 0.05$; Table 2). Moreover, significant differences were found when the distribution of haplotype frequency in black Brazilians was compared with that found in the HapMap project black population ($P < 0.05$; Table 2). Curiously, H3 and H4 haplotypes were now found in the HapMap project population, although both haplotypes were relatively common among Brazilians (Table 2). These haplotype differences between the Brazilian population and the HapMap population gives support to the idea that significant differences in haplotype structures may exist when different populations are compared [4,17]. However, we do not believe that the differences in haplotype distribution is only due to the fact that the Brazilian population is an admixed population. As discussed by Uitterlinden et al. [4], the set of

Table 1
Genotype and allele frequency (%) in 2 ethnic groups and from the HapMap project (<http://www.hapmap.org>; The International HapMap Project)

	This study		HapMap project*	
	Blacks	Whites	Blacks	Whites
BsmI				
Genotype	(N 120)	(N 100)	(N 59)	(N 60)
BB	14	15	14	23
Bb	45	51	32	42
bb	40	34	54	35
Allele	(N 240)	(N 200)	(N 118)	(N 120)
B	36	40	30	44
b	64	60	70	56
ApaI				
Genotype	(N 120)	(N 100)	(N 60)	(N 58)
AA	23	27	37	40 ^b
Aa	57	41	51	36 ^b
aa	20	32	12	24 ^b
Allele	(N 240)	(N 200)	(N 120)	(N 116)
A	49	47	62	58
a	51	53	38	42
FokI				
Genotype	(N 120)	(N 100)	(N 60)	(N 60)
FF	42	47	68	35 ^b
Ff	46	41	30	42 ^b
ff	12	12	2	23 ^b
Allele	(N 240)	(N 200)	(N 120)	(N 120)
F	65	67	83	56 ^b
f	35	33	17	44 ^b

N = number of subjects for genotyped subjects (genotype) or number of alleles (allele).

* Black subjects from Yoruba in Ibadan, Nigeria, and white subjects from Utah residents with ancestry from northern and western Europe.

^b $P < 0.05$ compared to Blacks (chi-squared test) from HapMap project.

Table 2

Estimated haplotype frequency (%) in 2 ethnic groups and from the HapMap project (<http://www.hapmap.org>)

Haplotypes				This study		HapMap project ^c	
	<i>BsmI</i>	<i>ApaI</i>	<i>FokI</i>	Black ^a	White ^a	Black	White
H1	B	A	F	11.7	12.8	23.0	23.0
H2	B	A	f	6.2	6.1	21.0	6.0
H3	B	a	F	12.0	14.5	0	0
H4	B	a	f	6.3	7.0	0	0
H5	b	A	F	20.7	18.9	8.0	26.0
H6	b	A	f	11.0	9.1	5.0	7.6
H7	b	a	F	21.0	21.3	24.0	34.0
H8	b	a	f	11.1	10.3	19.0	3.4

^aBlack subjects from Yoruba in Ibadan, Nigeria, and white subjects from Utah residents with ancestry from northern and western Europe.

^b $P < 0.05$ compared to respective ethnic group from HapMap project.

^c $P < 0.05$ compared to Blacks (chi-squared test) from HapMap project.

haplotypes may reflect the origin of human populations and also the gene–environmental interactions, so that certain variants might have had survival and/or reproductive advantages.

The human genome contains a block-like structure so that SNPs are not distributed randomly [17,18]. Many SNPs are commonly found in linkage disequilibrium (LD) in regions called haplotype blocks, which are much more informative in association studies because they avoid many problems associated with multi-SNP analysis [17], even though the origin of haplotype blocks is not completely understood [18]. We calculated D' for the Brazilians and for the HapMap subjects. Interestingly, we found maximum D' values ($D' = 1.0$; $P < 0.05$) for both black and white populations in the HapMap project, thus indicating a very strong linkage disequilibrium between the *BsmI* and the *ApaI* VDR gene polymorphisms in the HapMap populations. *FokI* polymorphism is not in linkage disequilibrium with any other VDR polymorphism. These findings confirm previous findings [4,18]. However, D' values for white or black Brazilians were about zero (both $P > 0.99$), thus indicating no linkage disequilibrium between the *BsmI* and the *ApaI* VDR gene polymorphisms in these two Brazilian ethnic groups. Together, these results give support to the suggestion that haplotype blocks selected from one specific population may not predict the haplotype blocks in other populations [10,18], especially in admixed populations as the Brazilian population. It should be noted that the general properties of haplotypes in the human genome still remain unclear [10].

In the present study, ethnicity has been defined with basis on self-report. While some concern exists when this criterion is used to define ethnicity, self-report has been valued as one of the best criteria [19]. However, it should be noted that ethnicity is still a rather deficiently defined concept when looking for risk factors associated with different diseases. This is due to the fact that most common diseases result from the interaction between genetic, environmental, and social factors [20,21]. The study of haplotypes associated with diseases will offer more definitive data regarding health risks, even though ethnicity may provide useful information in

some cases because it offers a clue that certain genetic variants may be found [12,22].

In conclusion, we found no significant interethnic differences in the distribution of some VDR gene polymorphisms in the admixed Brazilian population, although significant differences were found in the HapMap project population. Maybe more importantly, however, we found no interethnic differences in the VDR gene haplotype distribution in the Brazilian population although significant differences were found in the HapMap project population. It is highly possible that VDR haplotype blocks from one population may not be extrapolated to other populations, especially admixed populations.

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

- (1) Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2005;147:5542–8.
- (2) Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol* 2005;289:R8–R28.
- (3) Masay S, Marco MJ, Caver L, Roe M, Valdivielso SM, Fernandez E. Influence of mineral metabolism parameters on pulse pressure in healthy subjects. *Clin Nephrol* 2005;68:411–7.
- (4) Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen PJ. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004;338:143–56.
- (5) Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89:90:87–99.
- (6) Valdivielso SM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta* 2005;371:1–12.
- (7) Norman PE, Powell JT. Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:39–46.
- (8) Gualaja AO, Claudio L. Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ Health Perspect* 2000;108:23–8.
- (9) Paes FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:177–82.
- (10) Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenfeld B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science (New York, NY)* 2002;296:2225–9.
- (11) Montenegro MP, Barbosa Jr J, Sandrim VC, Geddes RF, Tavares-Santos JE. Ethnicity affects the distribution of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-DE) genetic variants. *Clin Chim Acta* 2005;367:192–5.
- (12) Marcond AS, Metzger JF, Souza-Costa DC, Nagasaki S, Sandrim VC, Correa RK, et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genetic polymorphisms. *Nitric Oxide* 2005;12:177–82.
- (13) The international HapMap project. *Nature* 2003;426:780–96.
- (14) Schwartz ES, Stewart WF, Kelsey KT, Simon D, Paik S, Linker DM, et al. Associations of tibial lead levels with *BsmI* polymorphisms in the vitamin D receptor in former organlead manufacturing workers. *Environ Health Perspect* 2000;108:199–203.
- (15) Coran JE, Vaughan T, Lea RA, Weinstein SK, Morrison NA, Griffiths DR. Association of A vitamin D receptor polymorphism with sporadic breast cancer development. *Int J Cancer* 1999;83:723–6.

- [16] Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68:978–89.
- [17] Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 2006;7:781–91.
- [18] Nejentsev S, Godfrey I, Snook H, Rance H, Nodland S, Walker NM, et al. Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. *Hum Mol Gen* 2004;13:1633–9.
- [19] Kaudman JS. How inconsistencies in racial classification demystify the race construct in public health statistics. *Epidemiology* 1999;10:101–3.
- [20] Collins FS. What we do and don't know about 'race', 'ethnicity', genetics and health at the dawn of the genome era. *Nat Genet* 2004;36:S13–5.
- [21] Barbosa Jr P, Sandrim VC, Umetani JA, Gerlach RJ, Tenus-Santos JE. eNOS genotype-dependent correlation between whole blood lead and plasma nitric oxide products concentrations. *Nitric Oxide* 2006;14:58–64.
- [22] Tenus-Santos JE, Demi M, Floelhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 2001;11:719–25.

Methodological issues affecting the determination of plasma lead concentrations

Vania B. Rezende^a, Jefferson Amaral^b, Raquel F. Gerlach^c, Fernando Barbosa Jr^d, and Jose E. Tanus-Santos^{b,*}

^aDepartment of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, 13081-970, Campinas, SP, Brazil.

^bDepartment of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, CEP 14049-900, Ribeirao Preto, SP, Brazil

^cDepartment 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

^dDepartment of Clinical, Toxicological and Food Science Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, Av. do Cafe s/n, S.P. 14040-903, Ribeirao Preto, Brazil.

*Corresponding author: Jose Eduardo Tanus-Santos, MD, PhD.

Department of Pharmacology

Faculty of Medicine of Ribeirao Preto

University of Sao Paulo

Av. Bandeirantes, 3900

14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil

FAX: +55 16 3633 2301

Phone: +55 16 3602 3163

E-mail: tanus@fmrp.usp.br

Abstract

Objectives: To compare lead (Pb) concentrations in serum *versus* heparin plasma separated from blood collected with or without vacuum, and to examine the effects of sample standing time on Pb concentrations measured in serum, heparin plasma, and EDTA plasma.

Design and Methods: We studied plasma and serum samples from twelve healthy subjects. Blood samples were collected via venous drainage phlebotomy with and without vacuum into trace metal free tubes containing no anticoagulants (serum), or lithium heparin, or EDTA (to obtain plasma). Variable sample standing time (0,5, and 30 min) prior to centrifugation were allowed. Plasma and serum Pb and iron concentrations were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry. Plasma and serum cell-free hemoglobin concentrations were measured.

Results: Pb concentrations in serum and in heparin plasma from blood samples collected with or without vacuum were similar and not associated with significant changes in iron or hemoglobin concentrations. The sample standing time (up to 30 min) did not affect Pb concentrations in serum or in heparin plasma, which were approximately 50% lower than those found in EDTA plasma.

Conclusions: Serum or heparin plasma separated from blood samples collected via venous phlebotomy with or without vacuum are appropriate medium to assess Pb concentrations, independently of the sample standing time.

Key words: lead; plasma; serum.

Introduction

Lead (Pb) exposure is widely recognized as a serious environmental health problem. Although the precise mechanisms involved in Pb toxicology are not fully understood, a few mechanisms and causal association between lead exposure and cancer or cardiovascular diseases have been suggested[1-5]. These findings have justified major efforts to monitor human exposure to Pb. However, the appropriate selection and measurement of biomarkers of Pb exposure are still widely discussed[6]. In this regard, whole blood has been considered the primary biological fluid for assessment of Pb exposure, both for screening and diagnostic purposes. While whole blood Pb measurements reflect recent exposure, past exposures may also be represented in them, as a result of Pb mobilization from bone back into blood[6 ,7]. Importantly, there has been renewed interest in biomarkers that may improve the diagnose and evaluate the extent of lead exposure, and the plasma Pb levels are probably of great relevance as markers of exposure, distribution, and health risks associated with Pb, especially in some populations[8 ,9]. This is because the toxic effects of lead are primarily associated with the most rapidly exchangeable fraction (the plasma fraction) of lead in the bloodstream[6], which is the fraction associated with the harmful effects of Pb[1 ,10].

Many serious errors may be introduced during the procedures from sample collection to the ultimate measurement of Pb concentrations, especially in plasma or serum samples[11]. For example, as Pb has much higher concentrations in erythrocytes than in plasma samples, hemolysis may induce the release of Pb from erythrocytes and lead to unreliable results. Therefore, hemolysis should be assessed by measuring hemoglobin or iron concentrations in the plasma or in the serum samples in order to make sure that reliable plasma or serum Pb results are obtained[12]. Indeed, mild hemolysis may lead to 30% artificially higher Pb concentrations[13], and it is not clear if serum or plasma is the best medium[13-15]. Moreover, Smith et al[12] suggested that serum Pb concentrations increase by more than 400% with standing time prior to centrifugation.

This increases in serum Pb concentrations were associated with increases in serum Fe concentrations, thus suggesting that serum Pb determinations are susceptible to a time-dependent artificial increase[12]. However, this suggestion was based on measurements carried out in serum samples from only one subject[12].

In the present study, we carried out a detailed investigation on how different the Pb concentrations are in serum *versus* heparin plasma samples. This analysis was carried out using blood samples collected via venous phlebotomy with or without vacuum, and careful assessment of hemolysis was performed by measuring iron concentrations. Moreover, we studied the effects of sample standing time (up to 30 min) on Pb concentrations measured in serum, heparin plasma, and EDTA plasma samples. We studied cell-free hemoglobin and iron concentrations to examine whether significant hemolysis results from increasing sample standing time.

Materials and Methods

Materials

High purity de-ionized water (resistivity 18.2m 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 chemical solutions used for Pb determination were stored in high-density polypropylene bottles. Whole blood and plasma samples were stored in 2mL tubes at -80° C. All tubes, plastic bottles, autosampler cups, and glassware materials were cleaned by soaking in 10% v/v HNO₃ for 24h, rinsing five times with Milli-Q water and dried in a class100 laminar flow hood located inside the class 10000 clean room.

Subjects, blood collection, and evaluations

The present work was carried out in accordance with the ethics standards of the Helsinki Declaration. We studied twelve healthy subjects, aged from 24 to 32 years, living in Ribeirao Preto, SP, Brazil, and apparently not environmentally exposed to lead. Before collection, the site of venipuncture was cleaned with alcohol and MilliQ water.

Three major evaluations were carried out. In the first evaluation, we examined whether any differences exist when venous blood samples are collected via venous drainage phlebotomy with and without vacuum, we carried out simultaneous venous blood drawing from 12 volunteers. Blood samples were collected via venous drainage phlebotomy using a gauge-18 catheter and via vacuum venous phlebotomy using a gauge-21 Vacutainer needle. These venous blood samples were collected into trace metal free tubes (Becton-Dickinson, Brazil) containing no anticoagulants (to obtain serum) or into trace metal free tubes containing lithium heparin (to obtain plasma). Blood samples were immediately centrifuged (800 x g, 6min) to separate plasma from whole blood. In the second evaluation, we examined the effects of sample standing time after blood drawing on serum or plasma Pb, Fe, and cell-free hemoglobin concentrations. Venous blood samples were collected into trace metal free tubes containing no anticoagulants (to obtain serum), or into trace metal free tubes containing lithium heparin (to obtain heparin plasma), or into trace metal free tubes containing EDTA (to obtain EDTA). Immediately after collection, samples were allowed to stand for 0, 5 or 30 min at room temperature (25°C) prior to centrifugation (800 x g, 6min). In the third evaluation, we examined the effects of increasing EDTA concentrations on plasma Pb concentrations. This evaluation was done by adding either the recommended volume of blood (1X), 1.5 (1.5X), or 3.0 (3.0X) times as much as that volume into trace metal free tubes containing EDTA. Blood samples were immediately centrifuged (800 x g, 6min) to separate plasma from whole blood.

Each plasma or serum fraction were then pipetted into two ultra-cleaned eppendorffs tubes (2mL) and immediately frozen at -80°C until used for analysis.

Measurement of whole blood, plasma, and serum lead and iron concentrations

Whole blood, plasma, and serum samples were analyzed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry as previously described (ICP-MS, Perkin Elmer 6100)[16 ,17]. Briefly, 300 μ L of each sample was diluted 1:10 with a solution containing ammonia (0.04mol/L), disodium ethylenediaminetetraacetic dehydrate (Na₂EDTA; 200mg/L) and Triton X-100 (100mg/l). The detection limit for lead was 0.001 μ g/l. Iron levels in plasma were also obtained by ICP-MS from each sample to check for hemolysis. 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.

Measurement of plasma and serum cell-free hemoglobin concentrations

This method involves the use of a peroxidase reaction to measure plasma or serum hemoglobin concentrations. Free hemoglobin oxidizes 3,3',5,5-tetramethylbenzidine (TMB) in the presence of hydrogen peroxide. In the present study, we used a kit from Sigma Diagnostics (St. Louis, MO, USA), which utilizes this reaction. Briefly, the procedure involves adding 2.0ml of TMB reagent to 0.01ml of plasma, mixing, and then adding 2.0ml of H₂O₂. Exactly ten min after the addition of H₂O₂, the absorbance is read at 600nm and the concentration of hemoglobin is calculated according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Possible differences in each evaluation were assessed by paired Student's t test or repeated measurements one-way analysis of variance followed by a post hoc Tukey test. Data were reported as the mean $\pm$ S.D., and P<0.05 was considered significant throughout.

Results

The results found during the first evaluation are shown in figure 1. We found similar Pb concentrations, both in serum and in heparin plasma derived from venous blood samples were collected via venous drainage phlebotomy with or without vacuum (fig. 1A; both $P>0.05$). Interestingly, we found no significant differences when the iron concentrations were in serum and in heparin plasma were compared, either in venous blood samples collected via venous drainage phlebotomy with vacuum or without vacuum (fig. 1B; both $P>0.05$).

In the second evaluation, we found no significant changes in serum, heparin plasma, or EDTA plasma Pb concentrations when the respective blood samples were standing for up to 30 min prior to centrifugation (fig. 2A). However, significantly higher Pb concentrations were found in EDTA plasma samples compared with serum or with heparin plasma samples, independently of the sample standing time prior to centrifugation (fig. 2A; all $P<0.05$). In addition, we found no significant differences when the iron or cell-free hemoglobin concentrations in serum, heparin plasma, or EDTA plasma were compared (figs. 2B and 2C; all $P<0.05$).

Finally, we found that increasing EDTA concentrations were associated with increased plasma Pb concentrations (fig. 3; $P<0.05$). Indeed, we found approximately 60% and 150% higher plasma Pb concentrations when EDTA concentrations increased by 50% and 200%, respectively (fig. 3; both $P<0.05$).

Discussion

The major findings of the present study were: **(i)** the Pb concentrations found in serum and in heparin plasma separated from blood samples collected via venous phlebotomy with or without vacuum are similar and not affected by significant hemolysis. **(ii)** The sample standing time (up to 30 min) does not significantly affect Pb concentrations measured in serum or in heparin plasma

samples, whereas EDTA plasma samples have artificial higher Pb concentrations, independently of blood sample standing time. (iii) The use of EDTA tubes produces artificially higher plasma Pb concentrations that are dependent on EDTA concentrations.

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, including serum or plasma Pb concentrations[6]. Although there is controversy on this matter[14], it is possible Pb concentrations in serum or plasma may reflect Pb exposure, distribution, and health risks associated with Pb because the toxic effects of Pb are primarily associated with its most rapidly exchangeable fraction in the bloodstream[18]. While there are few studies showing any relationship between serum or plasma Pb concentrations and the toxic effects produced by this metal, it is clear that these biomarkers deserve further studies[14].

Our results showing similar Pb concentrations in serum and in heparin plasma separated from blood samples collected via venous phlebotomy with or without vacuum suggest that hemolysis is not a limitation to the use of phlebotomy with vacuum. This is important because this is a much more convenient way to collect blood, especially when studying many subjects. The similar results in serum and heparin plasma samples confirm previous results showing that serum and “low-Pb heparin” (ultraclean plasma) have comparable Pb concentrations[12].

We found no significant changes in serum or in heparin plasma Pb concentrations when venous blood samples were standing for up to 30 min prior to centrifugation. While our heparin plasma results are in agreement with a previous report[12], our serum samples results are in contrast with those reported by Smith et al[12]. They found major increases in serum Pb concentrations with standing time prior to centrifugation, which were associated with increases in serum iron concentrations[12]. Although we have no precise explanation for this discrepancy, the conclusions by Smith et al were based on the analysis of serum from only one subject[12]. In support of lack of significant increases in serum Pb concentrations

with increasing sample standing time, we found no significant changes in serum iron or hemoglobin concentrations. Together, our findings suggest that serum or heparin plasma samples could be used to assess serum or plasma Pb concentrations.

Finally, our results agree with previous reports[12 ,14 ,19] showing that EDTA tubes should not be used to measure plasma Pb concentrations. Interestingly, we confirmed previous findings showing that heparin plasma samples have approximately 50% lower Pb concentrations as compared with those found in EDTA plasma samples[12 ,19]. In addition, we found higher Pb concentrations in EDTA plasma samples that were independent of the sample standing time. These increases were associated with lack of significant increases in iron or cell-free hemoglobin concentrations, thus supporting a previous suggestion that EDTA may cause Pb redistribution from erythrocytes to the plasma fraction[19], and not due to hemolysis. The huge increases in plasma Pb concentrations resulting from increased EDTA concentrations indicate that the bias associated with the use of EDTA tubes to assess plasma Pb concentrations is proportional to the final EDTA concentration.

In conclusion, we found that serum or heparin plasma separated from blood samples collected via venous phlebotomy with or without vacuum are appropriate medium to assess Pb concentrations, independently of the sample standing time (up to 30 min).

Acknowledgements: This study was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil).

References

- 1- Banks EC, Ferretti LE, Shucard DW. Effects of low level lead exposure on cognitive function in children: a review of behavioral, neuropsychological and biological evidence. *Neurotoxicology* 1997;18:237-281.
- 2- Barbosa F, Jr., Sartorio JTC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Clinical evidence for lead-induced inhibition of nitric oxide formation. *Arch Toxicol* 2006; 80:811-816.
- 3- Barbosa Jr F, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Matrix metalloproteinase- 9 activity in plasma correlates with plasma and whole blood lead concentrations. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006;98:559-564.
- 4- Barbosa Jr F, Sandrim VC, Uzuelli JA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. eNOS genotype-dependent correlation between whole blood lead and plasma nitric oxide products concentrations. *Nitric Oxide* 2006;14:58-64.
- 5- ATSDR. Toxicological Profile for Lead. Atlanta, Ga: US Department of Health and Human Services, Public Health Services. 1999.
- 6- Barbosa F, Jr., Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect* 2005;113:1669-1674.
- 7- 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;130:51-62.
- 8- 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;110:263-268.
- 9- Montenegro MF, Barbosa F, Jr., Tanus-Santos JE. Assessment of how pregnancy modifies plasma lead and plasma/whole blood lead ratio in ALAD 1-1 genotype women. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:347-351.

- 10- Schnaas L, Rothenberg SJ, Flores MF, Martinez S, Hernandez C, Osorio E, et al. Reduced intellectual development in children with prenatal lead exposure. *Environ Health Perspect* 2006;114:791-797.
- 11- Cornelis R, Heinzow B, Herber RF, Christensen JM, Poulsen OM, Sabbioni E, et al. Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine. *Pure & Appl. Chem.* 1995;67:1575-1608.
- 12- Smith DR, Ilustre RP, Osterloh JD. Methodological considerations for the accurate determination of lead in human plasma and serum. *Am J Ind Med* 1998;33:430-438.
- 13- Bergdahl IA, Gerhardsson L, Liljelind IE, Nilsson L, Skerfving S. Plasma-lead concentration: investigations into its usefulness for biological monitoring of occupational lead exposure. *Am J Ind Med* 2006;49:93-101.
- 14- Bergdahl IA, Skerfving S. Biomonitoring of lead exposure-alternatives to blood. *J Toxicol Environ Health A* 2008;71:1235-1243.
- 15- Bergdahl IA, Schutz A, Gerhardsson L, Jensen A, Skerfving S. Lead concentrations in human plasma, urine and whole blood. *Scand J Work Environ Health* 1997;23:359-363.
- 16- Rezende VB, Barbosa F, Jr., Montenegro MF, Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Haplotypes of vitamin D receptor modulate the circulating levels of lead in exposed subjects. *Arch Toxicol* 2008;82:29-36.
- 17- Montenegro MF, Barbosa F, Jr., Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies plasma/whole blood lead ratio. *Arch Toxicol* 2006;80:394-398.
- 18- 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;53:736-740.
- 19- deSilva PE. Determination of lead in plasma and studies on its relationship to lead in erythrocytes. *Br J Ind Med* 1981;38:209-217.

Legends for figures:

Figure 1- Effects of different methods used to collect blood samples. Panel A shows Pb concentrations in serum or plasma samples separated from whole blood samples collected into trace metal free tubes (Becton-Dickinson, Brazil) containing no anticoagulants (serum) or lithium heparin (plasma). Blood samples were collected via venous drainage phlebotomy without vacuum and using a gauge-18 catheter (Catheter) or via vacuum venous phlebotomy using a gauge-21 Vacutainer needle (Vacutainer).

The bars show the means $\pm$ S.D. (N=12/group).

Figure 2- Effects of sample standing time after blood drawing on serum or plasma Pb (panel A), Fe (Panel B), or hemoglobin (Panel C) concentrations.

The bars show the means $\pm$ S.D. (N=12/group).

*P<0.05 *versus* respective Serum or Heparin.

Figure 3- Effect of increasing EDTA concentrations on plasma Pb concentrations were examined by adding either the recommended volume of blood (1X), 1.5 (1.5X), or 3.0 (3.0X) times as much as that volume to tubes with EDTA.

*P<0.05 *versus* 1X.

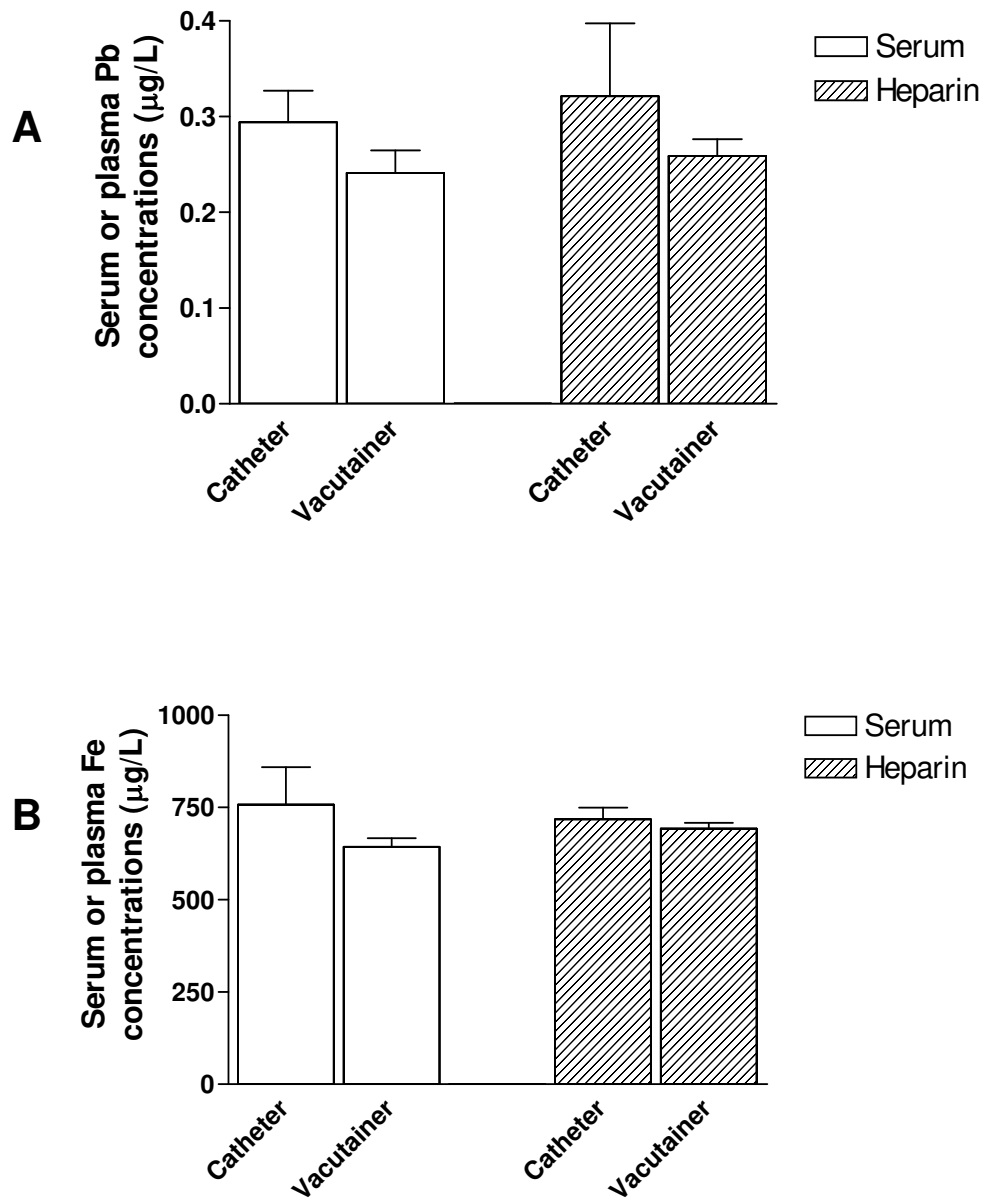


Figure 1

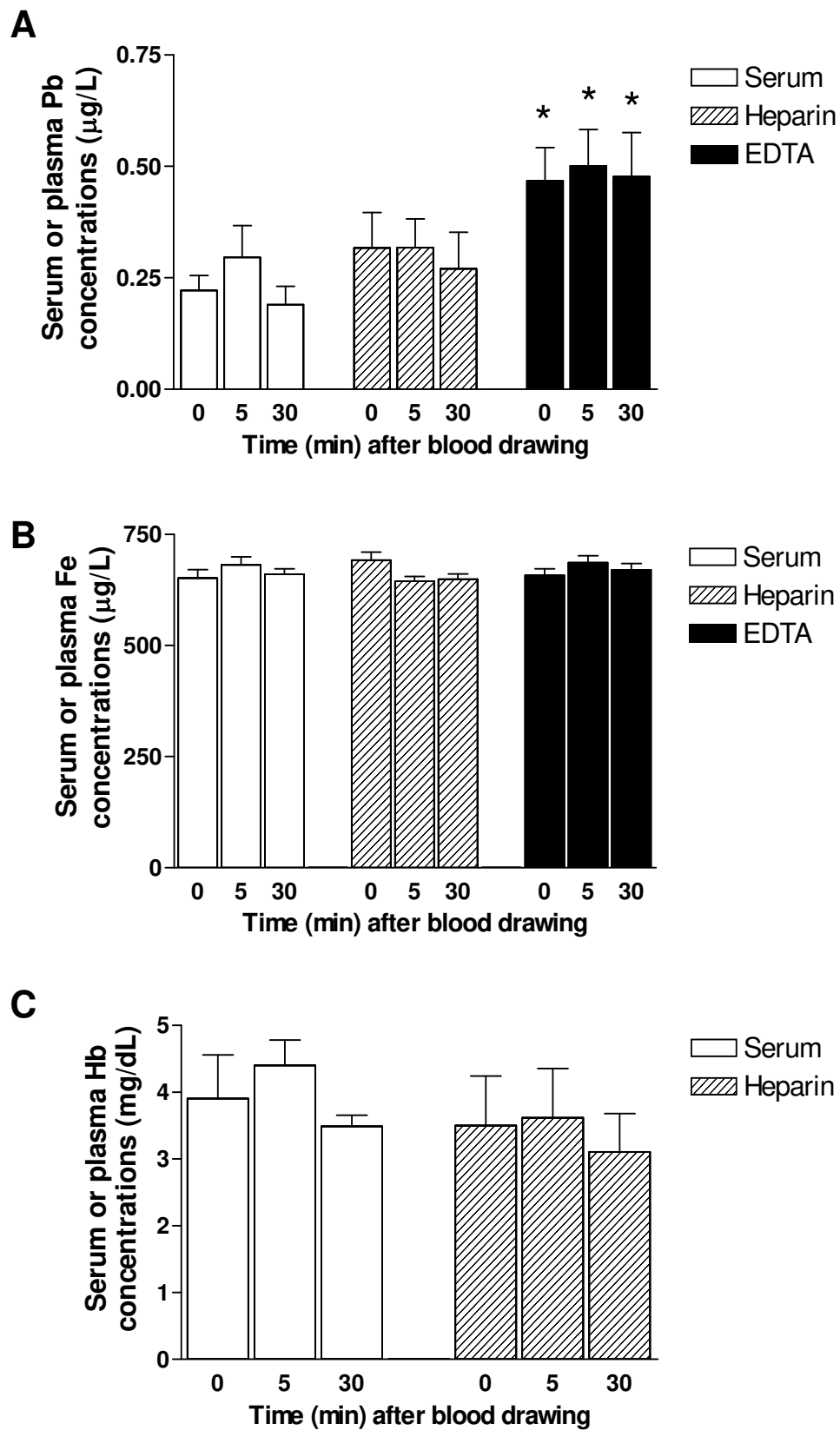


Figure 2

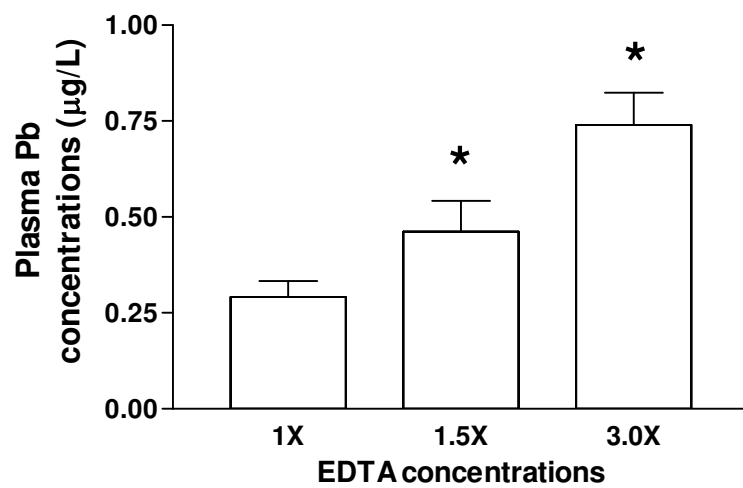


Figure 3