

GLAUCE REGINA COSTA DE ALMEIDA

***UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES DE DOSE
INTERNA PARA AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO
CHUMBO E SUAS CORRELAÇÕES COM ANEMIA E
POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM CRIANÇAS
RESIDENTES EM UMA REGIÃO SUPOSTAMENTE
NÃO CONTAMINADA***

Tese apresentada a Faculdade de
Odontologia de Piracicaba,
da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em
Biologia Buco-Dental, área de
concentração em Histologia e
Embriologia.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

**PIRACICABA
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

AL64u

Almeida, Glauce Regina Costa de.

Utilização de biomarcadores de dose interna para avaliação da exposição ao chumbo e suas correlações com anemia e polimorfismos genéticos em crianças residentes em uma região supostamente não contaminada. / Glauce Regina Costa de Almeida. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Raquel Fernanda Gerlach.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Dentes decíduos. 2. Soro. 3. Saliva. 4. Anemia. I. Gerlach, Raquel Fernanda. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: The use of internal dose biomarkers for assessment of lead exposure and its correlations with anemia and genetic polymorphisms from children living in uncontaminated area

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Deciduous teeth. 2. Serum. 3. Saliva. 4. Anemia

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Raquel Fernanda Gerlach, Antônio Luiz Rodrigues Júnior, Sérgio Roberto Peres Line, Eduardo Mello de Capitani, Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Data da Defesa: 20-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 20 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata GLAUCE REGINA COSTA DI ALMEIDA aprovada.

PROF. DR. RAQUEL FERNANDA GERLACH

PROF. DR. ANTONIO LUIZ RODRIGUES JUNIOR

PROF. DR. SERGIO ROBERTO PERES LINE

PROF. DR. EDUARDO MELLO DE CAPITANI

PROF. DR. CHRISTIF RAMOS ANDRADE LETTE PANISSI

DEDICO ESTE TRABALHO

*Aos meus pais, **Mariana Costa de Almeida e Carlos Roberto de Almeida**, e aos meus irmãos, **Carlos Roberto de Almeida Jr. e Renata Cristina Costa de Almeida**, por estarem sempre ao meu lado compartilhando o mais puro e verdadeiro amor, que nos mantém unidos em todos os momentos de nossas vidas!*

*“Ser profundamente amado por alguém dá-nos força.
Amar alguém profundamente dá-nos coragem!”*

Lao-Tsé

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach, pela brilhante forma com que orientou e conduziu todas as etapas da realização desse trabalho e por compartilhar toda sua experiência científica, sua inteligência e, principalmente, sua sabedoria, com ensinamentos que levarei por toda vida.

"Um professor influi para a eternidade; nunca se pode dizer até onde vai a sua influência"

Henry B. Adams

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

*À **Profa. Dra. Ana Maria de Souza**, a técnica de laboratório **Zita Maria Gregório** e a pós-graduanda **Cristiane Tavares** do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pelas avaliações hematológicas e do status férrico.*

*Ao **Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior**, a pós-graduanda **Juliana Andrade Nunes** e a técnica de laboratório **Vanessa Oliveira** do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pelas análises de chumbo.*

*Ao **Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos** e aos pós-graduandos **Vânia Braghini Rezende** e **Jefferson Amaral** do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pelo auxílio nos procedimentos de genotipagem.*

*Ao **Prof. Dr. Frederico de Sousa Barbosa**, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, pelas análises da birrefringência no esmalte.*

*Ao **Prof. Dr. Rafael Rosales**, do Departamento de Física e Matemática da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, pelo cálculo das equações matemáticas.*

*À **Profa. Dra. Carolina Funayama**, do Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela colaboração nas avaliações psicológicas das crianças.*

*À **Dra. Clarice Umbelino de Freitas**, do Departamento de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, pela fundamental participação no estudo de chumbo nas salivas das crianças de Bauru.*

*Às minhas amigas **Andiara e Moara De Rossi, Camila Azenha e Larissa Gripp**, por compartilharem comigo todas minhas alegrias, conquistas e aprendizados. Pelo apoio incondicional em todos os momentos!*

*Ao amigo **Marcelo Rocha Marques**, pelo companheirismo, incentivo e por sempre se desdobrar em mil pra me ajudar!*

*Aos meus amigos **Fabício Kitazono de Carvalho e Cristiano Nakao**, pelo companheirismo, apoio e incentivo.*

*Aos meus amigos de Piracicaba: **Liza Ramenzoni, Nádia Fayez, Juliana Neves, Gustavo Narvaes, Rafael Stipp, Daniel Vasconcelos, Gilson Kuntz e José Rosa Gomes**, pelos momentos de alegrias compartilhados.*

*Aos meus amigos do laboratório: **Anna Laura Jacob, Isabel Porto, Andrea Marcaccini, Elen Rizzi, Michele Castro, Carla Speroni, César Meschiari, Gisele Leite, Rosângela Sawan, Andrezza Rodrigues, Gabriela Molina, Raquel Carros, Tiago Sampaio e Rafael Sturaro**, por tornarem agradável o convívio diário nessa importante etapa de nossa vida.*

*À **Eliene Narvaes e Maria Aparecida Varella**, técnicas de laboratório do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelo entusiasmo, competência e disposição em ajudar sempre!*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pelo apoio financeiro.*

*À todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, **muito obrigada!!!***

“O agradecimento é a memória do coração”

Lao Tsé

RESUMO

Devido ao aumento das evidências de que o desenvolvimento mental das crianças pode ser afetado quando elas apresentam concentrações de chumbo no sangue $< 10 \mu\text{g/dL}$, estudos a respeito de novos biomarcadores de dose interna são necessários, principalmente para se obter informações em relação à exposição de populações residentes em áreas sem contaminação conhecida pelo chumbo. No Brasil, não existe programa nacional para detecção de crianças contaminadas por este metal, as quais são as mais vulneráveis aos efeitos neurológicos resultantes da exposição crônica a baixas concentrações de chumbo, entretanto, alguns estudos mostraram altas concentrações de chumbo no esmalte superficial de dentes decíduos de crianças brasileiras. Os objetivos deste estudo foram: 1) determinar e correlacionar a concentração de chumbo de crianças residentes no Bairro Campos Elíseos de Ribeirão Preto, no sangue total, soro, saliva e amostras de esmalte superficial *in vivo*; 2) comparar a concentração de chumbo encontrada nos diferentes biomarcadores de acordo com a presença ou ausência de anemia; 3) avaliar a influência dos polimorfismos da ALAD e VDR nos níveis de chumbo dos diferentes biomarcadores. 444 crianças, com idades entre 6 e 8 anos, participaram deste estudo. Amostras de sangue, soro, saliva total, saliva submandibular e da parótida foram coletadas. Duas microbiópsias de esmalte sucessivas foram realizadas em dente decíduo e permanente, nas quais o fósforo foi determinado colorimetricamente, para calcular sua profundidade. As concentrações de chumbo no sangue, soro, saliva e esmalte dental foram determinadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICPMS). O limite de detecção (LD) do método foi $0,03 \mu\text{g/L}$ e $0,02 \mu\text{g/L}$ para o soro e saliva, respectivamente. A concentração de hemoglobina foi determinada pelo contador de células Micros – ABX. Os genótipos para os polimorfismos da ALAD e VDR foram determinados por PCR e enzimas de restrição. Para a realização das análises de correlação, as crianças foram divididas em 2 grupos de acordo com a concentração de chumbo no sangue (< 4 and $\geq 4 \mu\text{g/dL}$) e no esmalte dental (< 400 e $\geq 400 \mu\text{g/g}$). O nível de significância utilizado em cada uma das estatísticas foi de 0,05. Os níveis de chumbo no sangue e no soro variaram de 0,2 a 9,4 (mediana, 2,1) $\mu\text{g/dL}$ e $< \text{LD}$ a 2,6 (mediana, 0,4) $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Dez por cento das crianças apresentaram concentração de chumbo no sangue $\geq 4 \mu\text{g/dL}$. Os meninos mostraram quantidades de chumbo no sangue total significativamente maiores do que as meninas (2,3 *versus* 2,0

µg/dL, $p < 0.0003$). As concentrações de chumbo na saliva total, sublingual e parótida foram 1,7; 1,4 e 1,3 µg/L, respectivamente. Não houve correlação entre a concentração de chumbo no sangue e soro e nem entre chumbo no sangue e saliva. Também não encontramos correlação entre concentração de chumbo no soro e saliva. Nas profundidades de 3,1 e 7,0 µm, a mediana da concentração de chumbo, para a primeira e segunda microbiópsias nos decíduos, foi 109,3 e 45,9 µg/g, respectivamente. Para a primeira e segunda microbiópsias nos permanentes, a mediana da concentração de chumbo foi de 308,3 e 99,7 µg/g, respectivamente, e a mediana de suas profundidades 2,9 e 6,0 µm, respectivamente. Não houve correlação entre concentração de chumbo no sangue e no esmalte dental. Nove ($n = 35$) e 3% ($n = 12$) das crianças apresentaram concentração de chumbo ≥ 400 µg/g na superfície do esmalte decíduo, para a primeira e segunda microbiópsias, respectivamente, e 33 ($n = 92$) e 7% ($n = 18$) tiveram chumbo ≥ 400 µg/g no esmalte permanente, para a primeira e segunda microbiópsias, respectivamente. Uma forte e significativa correlação entre chumbo no plasma e no esmalte foi encontrada apenas para crianças que possuíam concentração de chumbo no esmalte superficial ≥ 400 µg/g ($r = 0,65$, $p < 0,0001$, para decíduos e $0,51$, $p < 0,0001$, para permanentes). Além disso, não encontramos correlação entre chumbo no esmalte e chumbo nas salivas. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre a distribuição dos alelos da ALAD e VDR (para os polimorfismos *BsmI*, *ApaI* e *FokI*) e chumbo no sangue, soro e esmalte. Nossos resultados mostram uma exposição indevida ao metal na população de 6-8 anos, residente no bairro dos Campos Elíseos (Ribeirão Preto, SP), com 10% das crianças com concentração de chumbo no sangue entre 4,0 e 9,4 µg/dL. Uma forte e significativa correlação foi encontrada somente entre a concentração de chumbo no soro e no esmalte dental, nas crianças que foram mais expostas ambientalmente ao metal. Os dados sugerem que as fontes em que as crianças estão expostas ao chumbo merecem mais estudos no Brasil, assim como dados de concentrações do metal no sangue total de crianças mais novas, pois já está descrito que os níveis de chumbo no sangue < 10 µg/dL podem causar danos neurológicos às crianças.

Palavras chave: chumbo, biomarcadores, crianças, microbiópsia de esmalte, dentes decíduos, anemia, polimorfismo da ALAD, polimorfismos do VDR.

ABSTRACT

With increasing evidence of adverse health effects of lower levels of lead (below 10 µg/dL in whole blood), studies on novel internal dose biomarkers are needed. In Brazil, some studies showed high amounts of lead in the superficial enamel of deciduous enamel. The aim of this study was 1) to determine and to correlate the lead concentration in children living in Campos Eliseos district (in Ribeirao Preto, SP, Brazil), in whole blood (BL), serum, saliva, and surface enamel; 2) to correlate lead concentrations found using these biomarkers with anemia; 3) to evaluate the influence of ALAD and VDR polymorphisms on lead concentrations in these biomarkers. 444 children aged 6-8 years were enrolled in this study. BL, serum, parotid, submandibular and whole saliva were collected in trace element free tubes. Two successive acid etch enamel microbiopsies were performed on one deciduous and one permanent teeth. Phosphorus was colorimetrically determined to calculated microbiopsy depth. Lead concentrations were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS). The detection limit (DL) was 0.03 µg/L (serum) and 0.02 µg/L (saliva). The hemoglobin level was determined by an automated cell counter (Micros – ABX). Genotypes for the ALAD and VDR polymorphism were determined by PCR and restriction fragment length digestion. For correlations, children were subdivided in two groups according to BL concentration (< 4 and ≥ 4 µg/dL) and enamel lead concentration (< 400 and ≥ 400 µg/g). Statistical significance was accepted when $p < 0.05$. BL and serum lead levels ranged from 0.2 to 9.4 (median, 2.1) µg/dL and $< DL$ to 2.6 (median, 0.4) µg/L, respectively. 10% of the children showed BL above 4 µg/dL. Boys showed higher BL concentrations than girls (2.3 *versus* 2.0 µg/dL, $p < 0.0003$). Lead concentrations in whole, sublingual and parotid saliva were 1.7, 1.4 and 1.3 µg/L, respectively. No correlations between BL and serum, and between BL and saliva lead concentrations were found, nor between serum lead *versus* whole, sub and parotid lead values. The median lead concentrations found in the first and second deciduous tooth enamel microbiopsy were 109.3 and 45.9 µg/g, respectively, when median biopsy depths were 3.1 and 7.0 µm. For the first and second microbiopsies in permanent teeth, median lead concentrations were 308.3 and 99.7 µg/g, respectively, and median biopsy depths were 2.9 and 6.0 µm, respectively. There was no correlation between BL and enamel lead. Nine

% (n= 35) and 3% (n= 12) of the children showed surface enamel lead levels in the first and second deciduous enamel microbiopsy $\geq 400 \mu\text{g/g}$, respectively, and 33% (n= 92) and 7% (n= 18) had lead $\geq 400 \mu\text{g/g}$ in the first and second permanent enamel microbiopsies, respectively. A significant correlation between serum and enamel lead levels was found for children with surface enamel lead concentrations $\geq 400 \mu\text{g/g}$ ($r= 0.65$, $p< 0.0001$ for deciduous and 0.51 , $p< 0.0001$ for permanent teeth). No correlation was found between lead content in enamel and saliva. No difference between the distribution of ALAD alleles and among VDR alleles (for *BsmI*, *ApaI* and *FokI* polymorphisms) and BL, serum and enamel lead levels was found. In conclusion, our data showed an undue exposure in the study population of 6-8-years-old children living in Campos Elíseos (Ribeirão Preto, SP), as observed in the BL and enamel samples. We found a strong correlation between serum and enamel lead levels only for children who were probably more exposed to lead. Our data suggests that sources of exposure to lead by children deserve further studies in Brazil, as well as the BL lead levels of younger children.

Key words: lead, biomarkers, children, enamel microbiopsy, deciduous teeth, anemia, ALAD polymorphism, VDR polymorphism, whole blood, serum, saliva.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
2	PROPOSIÇÃO	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4	RESULTADOS	41
4.1	Concentração de chumbo no sangue	41
4.2	Concentração de chumbo no soro	42
4.3	Concentração de chumbo nas salivas	42
4.4	Concentração de chumbo no esmalte dental e profundidade de microbiópsia	43
4.5	Correlações	48
4.5.1	<i>Correlação entre sangue e soro</i>	48
4.5.2	<i>Correlação entre sangue/ soro e salivas</i>	48
4.5.3	<i>Correlação entre sangue total e esmalte</i>	50
4.5.4	<i>Correlação entre soro/salivas e esmalte</i>	51
4.6	Parâmetros hematológicos	55
4.7	Polimorfismos genéticos	56
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO	105
	APÊNDICE	109

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Histórico

O chumbo inorgânico é, sem dúvida, uma das mais antigas toxinas ambientais (Gidlow, 2004). É um elemento que existia em concentrações muito baixas na atmosfera e superfície da Terra até surgirem as atividades humanas de fundição de metais, na Idade dos Metais (de 5000 a.C. a 1500 a.C., aproximadamente). Nessa época, algumas comunidades descobriram a extração e fusão de metais, o que permitiu a fundição de ferramentas e armas. Dentre os metais utilizados, o chumbo passou a ter uma grande importância devido ao seu baixo ponto de fusão (327°C), sendo, por isso, facilmente utilizado em várias aplicações.

Já no Império Romano (509 a.C. a 476 d.C.), o chumbo passou a ser tão fundamental para sociedade, que existem registros que mostram que 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 (Warren, 2000). A produção de chumbo pelos romanos naquele período era enorme, chegando a bater um verdadeiro *record* histórico. A produção industrial do metal per capita daquela época (cerca de 8 x 10⁴ tons/5 x 10⁷ pessoa/ano durante o período de 50 a.C. à 150 d.C.) pôde, inclusive, ser comparada à dos E.U.A dos anos 80 (1,5 x 10⁶ tons/2 x 10⁸ pessoa/ano) (Patterson *et al.*, 1987). Como a produção industrial do chumbo iniciou-se há pelo menos 5.000 anos, é provável que surtos de intoxicação tenham ocorrido a partir deste momento.

Gilfillan (1965) foi o principal promotor da idéia de que a decadência do Império Romano ocorreu, dentre outros fatores, devido ao elevado grau de intoxicação por chumbo de seus estadistas e próceres administrativos. As afirmações de Gilfillan, de que os romanos foram gravemente intoxicados por ingerir quantidades excessivas de chumbo, foram baseadas em medidas do metal em amostras de ossos romanos. Suas alegações foram sustentadas por outros autores, que também estudaram chumbo em amostras similares (Waldron & Wells, 1979).

Assim, nesse período do Império Romano, houve o primeiro incremento de chumbo na crosta terrestre, quantificado nas camadas de gelo das geleiras do pólo norte (Hong *et al.*, 1994). Os teores do metal estiveram cerca de 4 vezes acima dos níveis

originais, entre os anos de 500 a.C. e 300 d.C., sendo que as concentrações de chumbo somente voltaram a tais níveis depois do declínio do Império, mas se elevaram de maneira constante com a mineração ressurgida na Europa (Nriagu, 1996).

Após essa contaminação inicial da crosta terrestre, o período seguinte de grande incremento nas concentrações atmosféricas de chumbo foi o período da Revolução Industrial Européia, nos séculos XVIII e XIX, em que houve grande aumento da poluição atmosférica pelas emissões industriais (Warren, 2000). Desse modo, embora a referida Revolução tenha construído os alicerces para as culturas ocidentais atuais, causou, em contrapartida, um aumento na produção e utilização de chumbo na América do Norte e Europa após 1750 (Patterson *et al.*, 1987). O metal foi causa importante de morbidade e mortalidade durante a Revolução Industrial e o controle formal efetivo da intoxicação dos trabalhadores por chumbo não ocorreu até o estudo pioneiro em saúde ambiental de Ronald Lane em 1949 (Lane, 1949). Posteriormente, agências governamentais de vários países passaram, gradualmente, a assumir a responsabilidade pela implementação de ações diagnósticas e preventivas, que seriam utilizadas para a prevenção da saúde dos trabalhadores industriais. Isto estabeleceu o conceito, o qual se tornou amplamente aceito, de que a intoxicação por chumbo era um risco ocupacional.

O chumbo tetraetila foi descoberto ser um eficaz agente antidetonante por Thomas Midgley em 1921, quando trabalhava para uma pesquisa da “General Motors”, e, assim, passou a ser utilizado como aditivo da gasolina. Este fato causou outro aumento dos níveis de chumbo na atmosfera, e conseqüente acúmulo na crosta terrestre (Warren, 2000). Contudo, devido à sua alta toxicidade, vários pesquisadores, incluindo Midgley, foram intoxicados pelo chumbo, sendo que dezenas deles morreram. Não obstante tais fatos, em 1924, a “Standard Oil de New Jersey” (Esso/Exxon) e a “General Motors” criaram a “Ethyl Gasoline Corporation” para produzir e comercializar o chumbo tetraetila.

Já nos finais dos anos 40 e início dos anos 50, Clair Cameron Patterson acidentalmente descobriu a poluição causada pelo chumbo tetraetila no ambiente, enquanto determinava a idade da Terra. Como tentava medir o teor de chumbo em rochas muito antigas, as leituras foram inexatas, devido ao chumbo do ambiente ter contaminado suas amostras. Ele foi, então, forçado a trabalhar em uma sala limpa para manter suas amostras

livres de contaminação. Depois de chegar a uma estimativa bastante precisa da idade da Terra, voltou suas investigações para o problema da contaminação por chumbo, examinando geleiras de países como a Groenlândia. Percebeu que a contaminação ambiental pelo chumbo datava do tempo em que, aproximadamente, o chumbo tetraetila tinha se tornado amplamente utilizado como um aditivo para combustíveis na gasolina. Devido às suspeitas de poluição causada pelo chumbo tetraetila e consciente dos perigos do chumbo para a saúde, Clair Cameron Patterson foi um dos primeiros oponentes ao seu uso. No entanto, a indústria do chumbo era poderosa e, utilizando-se de suas influências para proteger suas práticas, pressionou os chefes de sua universidade a mantê-lo em silêncio. Ele foi, ainda, excluído do Conselho Nacional de Pesquisa dos E.U.A. de 1971, apesar do fato de ser o principal especialista em chumbo atmosférico (Davidson, 1998).

Em virtude da longa história da toxicidade do chumbo e de extensas publicações (o chumbo é provavelmente a toxina ambiental mais amplamente estudada), qualquer um pensaria que a exposição ao chumbo é controlada e a intoxicação por este metal foi meramente uma ocorrência histórica já devidamente corrigida. Infelizmente, este não é o caso.

Medidas de chumbo implementadas nos E.U.A.

Os trabalhos que provaram que o chumbo é realmente muito tóxico e que interfere irreversivelmente em funções importantes para o desenvolvimento psicomotor de crianças, embora aceitos no meio científico, trouxeram como consequência a perseguição a Herbert Needleman, o pesquisador que propôs que o chumbo utilizado pelas indústrias dos E.U.A. era tóxico a crianças (Needleman, 2005). Isso mostra que, atualmente, mesmo hipóteses lógicas são dificilmente provadas, isto porque a ciência está sujeita a condições sociais.

Pela grande pressão da sociedade civil e pela notória contaminação dos ambientes urbanos de algumas cidades americanas, há atualmente nos E.U.A. um programa nacional para detecção de crianças contaminadas por chumbo. Nesse programa, o sangue é utilizado como marcador de contaminação, e as coletas são realizadas anualmente em todas as crianças pertencentes a grupos de risco naquele país, sendo todas as amostras analisadas em

laboratórios credenciados por um único Centro de referência (Wadsworth Center) (Parsons, 2007, comunicação pessoal).

O chumbo tem uma meia vida de 40 dias no sangue, sendo em seguida depositado principalmente nos ossos e dentes (Smith, 1996). Por esse motivo, coletas anuais podem não refletir o grau de exposição da população, uma vez que o sangue reflete majoritariamente exposições agudas. Entretanto, pelo grande número de coletas (anuais) em todos os indivíduos da população, a probabilidade de se encontrar indivíduos contaminados aumenta nesse sistema implementado nos EUA. No caso de países em que esse sistema não é adotado, a coleta esporádica de sangue de alguns indivíduos de uma população dificilmente refletirá o grau de exposição desta população ao chumbo, especialmente se essas coletas não forem feitas de forma sistemática, baseadas em desenhos epidemiológicos adequados e com intervalos bem definidos.

Para lidar com a ameaça do chumbo à saúde humana, várias políticas e estratégias de redução da emissão de chumbo têm sido preparadas pelas autoridades de proteção ambiental em muitos países e organizações internacionais. Entretanto, em muitos países, a percepção da contaminação por chumbo pela sociedade civil e autoridades de saúde como um problema grave de saúde publica ainda não existe (Shen *et al.*, 1998).

Descrições de contaminações de crianças no Brasil

Apesar das medidas de controle estabelecidas por lei, intoxicações agudas e crônicas por chumbo foram documentadas no Brasil (Paoliello *et al.*, 2002). Em nosso país, há poucos estudos sobre exposição ao chumbo em crianças e, os que existem, resultam de coletas esporádicas e amostras relativamente pequenas de indivíduos (Paoliello & De Capitani, 2007).

Nos últimos anos, vários episódios de contaminação por chumbo, principalmente em crianças, têm surpreendido algumas cidades industrializadas brasileiras (Araujo *et al.*, 1999). Em Santo Amaro da Purificação, BA, pesquisadores detectaram altos níveis de chumbo no sangue de crianças que moravam próximo a uma fundição de chumbo desativada (Carvalho *et al.*, 1985, 2003; Silvany-Neto *et al.*, 1996). Em Bauru, SP, num raio de 1 km ao redor de uma fábrica de baterias, de Freitas *et al.* (2007) encontraram que

37% das crianças avaliadas apresentavam concentração de chumbo no sangue acima de 10 µg/dL. Após a implementação de medidas de controle na área, essa concentração diminuiu em 46%, considerando a reavaliação de 241 crianças com chumbo > 10 µg/dL.

Entretanto, até o momento, ainda não há trabalhos que descrevem o grau de contaminação ao chumbo em crianças de populações aparentemente não expostas ao metal, realizados com amostras de sangue de um grande número de indivíduos.

Gomes *et al.* (2004), analisaram os níveis de chumbo encontrados no esmalte superficial de 2 grupos de pré-escolares de Piracicaba, SP, um residente em uma região industrial e outro residente numa região não industrial e verificaram uma diferença estatisticamente significativa quando os resultados obtidos foram comparados entre os dois grupos. Esses resultados demonstraram que também no Brasil as crianças estão expostas a níveis mais altos de chumbo em alguns ambientes, particularmente em regiões industrializadas de cidades.

Em 2004, determinamos a concentração de chumbo na saliva total e na superfície do esmalte de dentes decíduos *in vivo* de 247 crianças (4-6 anos) de 7 Escolas Municipais de Educação Infantil localizadas em diferentes bairros de Ribeirão Preto, SP (cidade sem histórico de contaminação por chumbo), e de 26 crianças de uma região notoriamente contaminada por chumbo em Bauru, SP, nas imediações da Fábrica de Baterias Ajax. Os resultados desse trabalho indicaram que crianças residentes em regiões contaminadas apresentam cerca de 4 vezes mais chumbo no esmalte (Costa de Almeida *et al.*, 2007) e 3,5 vezes mais chumbo na saliva total (Costa de Almeida *et al.*, 2008 - Apêndice I) quando comparadas com crianças residentes em cidades sem uma fonte de contaminação conhecida. Além disso, verificamos também que mesmo com a amostragem de 20 a 30 crianças por grupo, é possível identificar regiões mais e menos contaminadas em uma cidade, como aconteceu em Ribeirão Preto, SP, onde foi encontrada uma região da cidade (Bairro dos Campos Elíseos) na qual 30% das crianças apresentaram concentrações de chumbo iguais à mediana da concentração descrita para as crianças de Bauru (de Almeida *et al.*, 2008).

Fontes de exposição

As fontes de exposição ao chumbo não são as mesmas em todos os países (Bloch *et al.*, 1998). A exposição ao chumbo pode ocorrer por meio de alimentos, água e poeira contaminados, encanamentos revestidos com chumbo, atividades industriais como mineração e processamento de chumbo, além de fábricas de reciclagem de baterias, cerâmicas e tintas (Lappalainen & Knuuttila, 1979; Lanphear *et al.*, 1998; Warren, 2000; Ryan *et al.*, 2004; Babosa *et al.*, 2005; Nriagu *et al.*, 2006).

No Brasil a indústria produtora de chumbo produz cerca de 0,003% da produção mundial, sendo que nos últimos anos, esse quadro tem sofrido um declínio significativo. Atualmente, os principais consumidores de chumbo no país são os fabricantes de baterias (80%), seguido por óxidos e pigmentos (12%) e setores elétricos e eletrônicos (8%) (Paoliello & De Capitani, 2005).

Toxicocinética do chumbo

A absorção do chumbo se dá pelas vias aéreas superiores, no caso de poluição do ar, ou por ingestão e absorção através do trato gastrointestinal (Calabrese *et al.*, 1996). Quando ocorre absorção gastrointestinal, a porcentagem de absorção é diferente, em se tratando de adultos e crianças. Enquanto os indivíduos adultos absorvem em torno de 10 a 15% e armazenam cerca de 5% do que é absorvido, as crianças absorvem cerca de 41,5% e retêm 38,1% (Ziegler *et al.*, 1978). Associado a isso, as crianças são mais suscetíveis à intoxicação devido ao hábito de levar as mãos e objetos à boca e à elevada taxa respiratória (Lin-Fu, 1973; Bellinger, 2004).

A fração de chumbo que é absorvida depende principalmente da sua forma física e química, particularmente do tamanho da partícula e a solubilidade do componente específico, além de características como idade, estado fisiológico, fatores genéticos e condições nutricionais do indivíduo (Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR, 1999). Em condições sistêmicas alteradas, como em casos de alterações de ferro, cálcio e zinco, a absorção é aumentada (Wright *et al.*, 1998, 1999, 2003; Bradman *et al.*, 2001).

A absorção cutânea dos compostos inorgânicos de chumbo é pequena. Ocorre apenas no caso da pele estar lesada. Por outro lado, os compostos orgânicos, por serem

lipossolúveis, podem ser absorvidos através da pele intacta (Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR, 1999).

Após sua absorção, o chumbo passa a ser distribuído para outros tecidos, através da corrente sanguínea. No sangue, aproximadamente 99% é encontrado nos eritrócitos e apenas 1% permanece no plasma (Schutz *et al.*, 1996). Estudos têm indicado que mais de 80% do chumbo nos eritrócitos está, principalmente, ligado à enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD) (Bergdahl *et al.*, 1997 a).

O metal é então distribuído entre os tecidos moles e mineralizados (Rabinowitz, 1991). O restante que permanece no plasma, como íon livre ou ligado à albumina, difunde-se para o sistema nervoso central (O'Flaherty, 1995).

Em estudos cinéticos com isótopos estabilizados de chumbo, Rabinowits *et al.* (1976) conseguiram desenvolver um modelo clássico envolvendo três compartimentos, que esclarecia a distribuição do chumbo no organismo. No primeiro compartimento, produz-se uma troca rápida entre o sangue, os fluidos biológicos e tecidos moles como fígado, rim e cérebro, que correspondem a 4% da carga corpórea total, a menos que haja uma exposição aguda, com uma meia-vida de um mês. No segundo compartimento, ocorre um intercâmbio médio entre os tecidos moles e os ossos, o qual tem uma troca ativa de um ano. O terceiro constitui um compartimento lento e é formado pelo tecido ósseo, que corresponde a cerca de 94% da carga corpórea de chumbo com uma meia vida de cerca de treze anos. Em crianças, o osso representa 70% da carga corpórea de chumbo (Schroeder & Tipton, 1968; Leggett, 1993), de onde este pode ser mobilizado e contribuir para os níveis do metal no sangue em pessoas anteriormente expostas.

A Figura 1 apresenta um esquema geral da toxicocinética do chumbo.

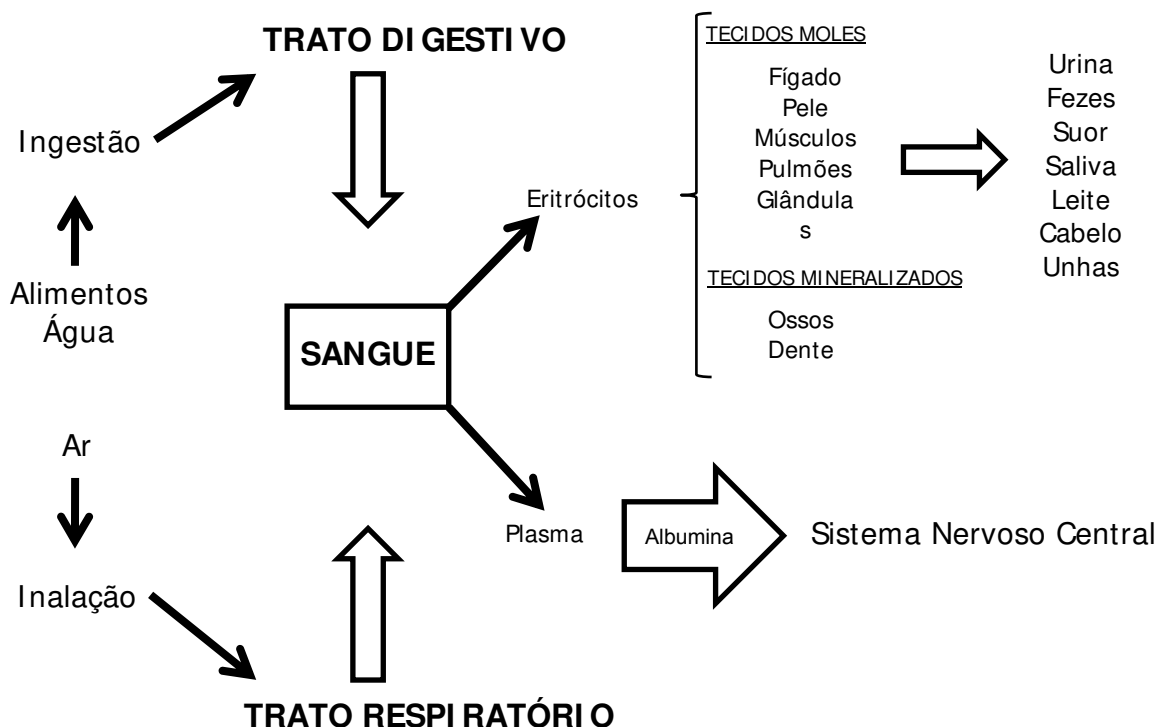


Figura 1 – Toxicocinética do chumbo no organismo.

Efeitos tóxicos do chumbo

O chumbo adversamente afeta vários sistemas, incluindo o nervoso, hematopoiético, renal, cardiovascular, endócrino e esquelético (Goyer, 1995).

Os efeitos neurológicos e hematológicos serão melhores detalhados abaixo.

Efeitos neurológicos

A toxicidade do chumbo gera desde efeitos claros, ou clínicos, até efeitos sutis, ou bioquímicos. Estes últimos envolvem vários sistemas de órgãos e atividades bioquímicas. Nas crianças, os efeitos críticos atingem o sistema nervoso, enquanto que nos adultos com exposição ocupacional excessiva, ou mesmo accidental, apesar do chumbo causar anormalidades no sistema nervoso central (Muldoon *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 2000 a), os cuidados devem ser com a neuropatia periférica. No entanto, os efeitos no sistema nervoso periférico de adultos tendem a ser reversíveis após a exposição ser cessada (Baker *et al.*, 1985), ao passo que os efeitos centrais nas crianças parecem não ser reversíveis (Needleman *et al.*, 1990; Bellinger *et al.*, 1992; Goldman, 1998), talvez porque o chumbo

conduza a perturbações dos processos complexos pelos quais as conexões sinápticas são selecionadas e modificadas (Johnston & Goldstein, 1998).

A intoxicação aguda por chumbo deve ser distinguida da intoxicação crônica. Pacientes com intoxicação aguda apresentam dores de cabeça, hiperexcitação, ataxia, convulsões, coma e até morte. Intoxicações crônicas a níveis não tão elevados de chumbo estão associados a danos neurológicos, como irritabilidade, diminuição de QI, inabilidades de fala, déficits de atenção e distúrbios no desenvolvimento psíquico (Needleman *et al.*, 1979, 1990; Bellinger *et al.*, 1994; Lanphear *et al.*, 2000; Canfield *et al.*, 2003; Bellinger, 2004; Chiodo *et al.*, 2004). Além disso, relatos de sérias patologias de comportamento em crianças com intoxicação por chumbo foram registrados. Comportamentos anti-sociais e de delinquência foram fatores de risco associados mesmo a uma baixa exposição ao chumbo (Needleman *et al.*, 1996; Dietrich *et al.*, 2001). Com o objetivo de determinar se as concentrações de chumbo pré e pós-natal de crianças no passado estavam associadas com detenções no presente, Wright *et al.* (2008), realizaram medidas das concentrações de chumbo pré-natal durante o primeiro ou início do segundo trimestre de gravidez de mulheres que moravam numa região de casas muito antigas em Cincinnati, Ohio. Os níveis de chumbo no sangue das crianças (nascidas entre 1979 e 1984) foram analisados em uma base trimestral e semestral durante 6 anos e meio. As informações do total de prisões e detenções por delitos envolvendo violência foram coletadas junto ao Registro de Justiça Criminal Ohio. Este foi o primeiro estudo prospectivo que demonstrou uma associação entre as concentrações de chumbo pré e pós-natal e comportamento adulto criminoso.

Herbert Needleman foi um dos pioneiros a estudar os efeitos do chumbo na saúde de crianças. Em 1979, realizou um estudo com dentina de dentes decíduos, a fim de documentar os efeitos da exposição ao metal no desenvolvimento intelectual e comportamento destas crianças. Ele relatou que mesmo em concentrações mínimas, particularmente em crianças, o chumbo causa diminuição de QI, inabilidades de fala e atenção e distúrbios no desenvolvimento psíquico (Needleman *et al.*, 1979). Onze anos mais tarde, estes mesmos pesquisadores demonstraram, em um estudo de “follow-up” da mesma população de 1979, que a exposição ao chumbo na infância, mesmo que

assintomática, está associada a déficits no funcionamento do sistema nervoso central que persistem até a adolescência (Needleman *et al.*, 1990).

Em outro estudo de caracterização da longa duração dos efeitos à exposição precoce ao chumbo (Bellinger *et al.*, 1987), crianças foram agrupadas de acordo com a concentração de tal metal no cordão umbilical, e estas foram longitudinalmente seguidas. As crianças do grupo com alto nível de chumbo pré-natal apresentaram menores escores de desenvolvimento cognitivo. Efeitos similares na aprendizagem foram demonstrados em estudos experimentais com primatas, por Gibert & Rice em 1987. Neste trabalho, macacos rhesus receberam chumbo nos primeiros 100 dias de vida, e apresentaram deficiência na aprendizagem quando adolescentes.

O valor aceitável de chumbo no sangue como limite de neurotoxicidade em crianças decaiu significativamente a partir dos anos 70, assim que estudos populacionais mais sofisticados, com amostras maiores e melhores desenhados e analisados foram conduzidos (Schroeder *et al.*, 1985; Dietrich *et al.*, 1987; Fergusson *et al.*, 1988; McMichael *et al.*, 1988). O consenso sobre qual a concentração de chumbo que é tóxica tem mudado durante os anos. O valor limite abaixo do qual o chumbo não apresenta efeitos adversos não foi identificado (Bellinger, 2004, Binns *et al.*, 2007). Em 1991, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA definiu o nível chumbo no sangue de crianças que deve levar a ações de saúde pública em 10 µg/dL (CDC, 1991). Este valor é interpretado erroneamente como sendo um limite, no qual valores < 10 µg/dL são “seguros” e ≥ 10 µg/dL são “tóxicos”, pois, estudos realizados desde 1991 reforçam evidências de que o desenvolvimento físico e mental das crianças pode ser afetado com concentrações de chumbo no sangue abaixo de 10 µg/dL (Binns *et al.*, 2007). De acordo com Bellinger (2004), nenhum valor único pode ser utilizado como limite, separado de um contexto de fatores específicos como idade da exposição e avaliação da concentração de chumbo, duração dos níveis elevados do metal no sangue e características do ambiente no qual a criança é vive.

Possivelmente um dos maiores problemas da exposição a “baixas” doses de chumbo (que seriam aquelas às quais estariam expostas as crianças em que os níveis de chumbo no sangue total medidos estão abaixo de 10 µg/dL) seja realmente não haver forma

fidedigna de quantificar a exposição acumulada a este metal, que pode talvez não ser baixa. Esse problema decorre da ausência de medidas de chumbo em um tecido em que este se acumula ao longo dos anos. O amplo uso de um marcador cumulativo pode ser benéfico do ponto de vista da identificação individual de crianças expostas a maiores quantidades de chumbo, assim como do ponto de vista da possibilidade de realizar estudos mais detalhados sobre os efeitos de chumbo no desenvolvimento intelectual de crianças.

Efeitos hematológicos

O chumbo ligado aos eritrócitos pode interferir na biossíntese do grupamento heme e sua consequência mais conhecida é o aparecimento de anemia hipocrômica nos indivíduos expostos (Schwartz *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 1998; Bergdahl *et al.*, 1999) , ocasionada pela diminuição da formação desse grupamento nos eritroblastos da medula óssea.

A reação inicial da biossíntese do grupamento heme é a condensação de moléculas de glicina com moléculas de succinil-CoA (proveniente do ciclo do ácido cítrico) para formar primeiro intermediário – o ácido δ -aminolevulínico (ALA). A reação ocorre na mitocôndria e se processa na presença da enzima ácido δ -aminolevulínico sintetase (ALAS). No citoplasma, duas moléculas de ALA se condensam, pela ação da enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD), formando o porfobilinogênio (PBG), e, a partir de uma série de reações catalisadas por diferentes enzimas, é formado um núcleo tetra pirrólico no interior da mitocôndria. No estágio final, o ferro bivalente é incorporado na protoporfirina IX, sob a ação da enzima ferroquelase, para formar o grupamento heme (Figura 2), o qual se liga à globina formando assim a hemoglobina (Onalaja & Claudio, 2000; Kelada *et al.*, 2001).

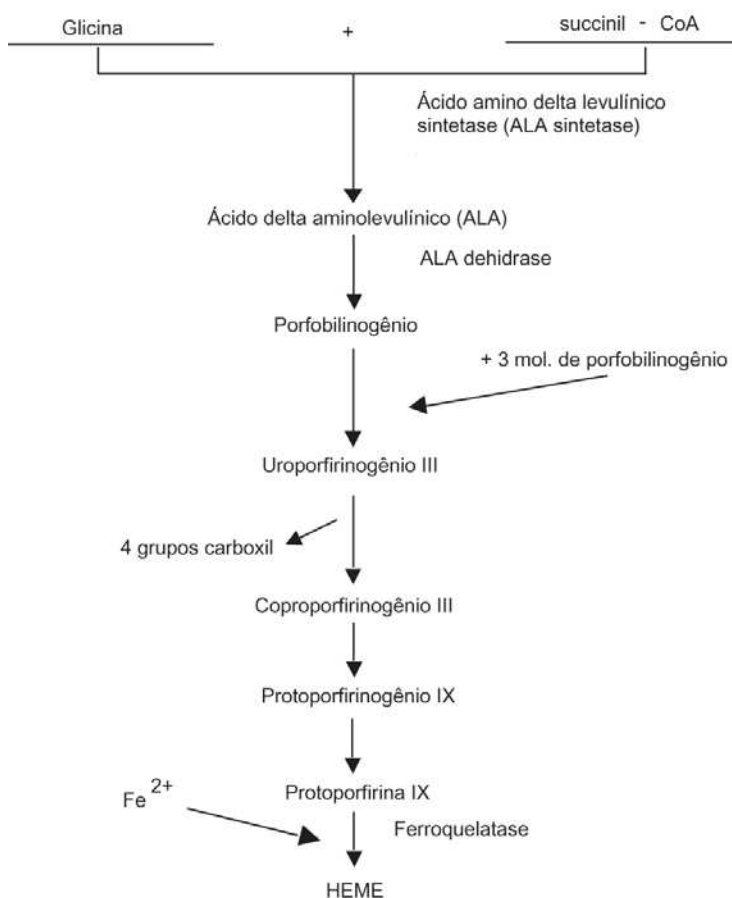


Figura 2 – Esquema da biossíntese do grupamento heme na medula óssea.

O chumbo afeta o sistema hematopoiético pela inibição das enzimas ALAD e ferroquelatase. Essa inibição pode causar elevados níveis do ALA no plasma e urina e de protoporfirinas eritrocitárias livres (FEP) (Wetmur *et al.*, 1991a, b; Bergdahl *et al.*, 1999; Kelada *et al.* 2001). A inibição da ALAD pelo chumbo ocorre devido a uma substituição do íon zinco, que é cofator da enzima, pela ligação do chumbo a um grupamento sulfidríla diretamente no sítio ativo da enzima, inibindo sua ação (Warren *et al.*, 1998; Scinicariello *et al.*, 2007). O chumbo não inibe significativamente a enzima ALAS, como demonstrado em ratos de laboratório (Tomokuni *et al.*, 1991).

É sugerido que a inibição da ALAD inicia-se com níveis de intoxicação por chumbo no sangue em torno de 10 µg/dL. Em concentrações mais elevadas do metal essa

inibição é mais pronunciada, alcançando cerca de 50% e 75% em concentrações de chumbo iguais a 15 µg/dL e 30 µg/dL respectivamente (Astrin *et al.*, 1987; Wetmur *et al.*, 1991a).

O chumbo também inibe a atividade da enzima ferroquelatase, impedindo a incorporação do Fe²⁺ à protoporfirina. Os íons de zinco, presentes em abundância nos reticulócitos, passam a ocupar o lugar do ferro na molécula de protoporfirina, com a conseqüente formação da zinco protoporfirina (ZPP) no lugar do heme. A ZPP liga-se a globina e sua apresentação em níveis elevados nos eritrócitos circulantes constitui um dos sinais da absorção de chumbo, muitas vezes utilizado no diagnóstico da exposição a esse metal (Grandjean & Lintrup, 1978; Harada & Miura, 1984; Zwennis *et al.*, 1990; Sakai, 2000).

A especificidade da ZPP em relação ao chumbo não é total, já que os seus níveis registram igualmente aumento nas situações de deficiência em ferro e em patologias pouco freqüentes (porfiria eritropoiética; anemia hemolítica) (Karacic *et al.*, 1980; Marcus & Schwartz, 1987; Wildt *et al.*, 1987; Sakai, 2000).

De acordo com alguns autores, a anemia não é uma manifestação precoce da intoxicação por chumbo é só evidente quando o nível de chumbo no sangue é significativamente elevado por períodos prolongados (Counter *et al.*, 2000). No entanto, Schwartz *et al.* (1990) mostraram uma diminuição de alguns parâmetros do hematócrito em concentrações de chumbo que variava de 11 a 164 µg/dL, sugerindo que a anemia induzida pelo metal é uma conseqüência clínica e biológica importante da absorção do chumbo, mesmo em níveis mais baixos de exposição.

A anemia causa uma diminuição do número de eritrócitos disponíveis para o acúmulo de chumbo, por isso, a própria anemia pode afetar a concentração de chumbo no sangue (diminuindo-a), enquanto que a concentração de chumbo no plasma permanece inalterada (Bergdahl *et al.*, 1999).

Os níveis de chumbo no plasma/soro de crianças e sua relação com anemia ainda não foram esclarecidos.

Polimorfismos genéticos

A análise de polimorfismos em estudos de exposição a toxinas ambientais está cada vez mais importante (Wetmur *et al.*, 1991a; Onalaja & Claudio, 2000; Kamel *et al.*, 2003; Montenegro *et al.*, 2006 a), pois, muitas vezes, pessoas com diferentes “backgrounds” genéticos apresentam variações nas concentrações de chumbo, por exemplo, em diferentes tecidos. Uma melhor compreensão dos fatores genéticos que influenciam a suscetibilidade à intoxicação pelo chumbo pode ter importante implicação para a saúde pública e iniciativas de intervenção (Wetmur *et al.*, 1991 a).

Polimorfismo da ALAD

A enzima ALAD é uma metaloenzima com cerca de 280 kDa, composta por oito subunidades idênticas e oito átomos de zinco (Tsukamoto *et al.* 1980). Os átomos de zinco são essenciais para a atividade e estabilidade enzimática, sendo que a quelatação destes por EDTA rapidamente inativa a enzima. Sugeriu-se que quatro átomos de zinco são necessários para impedir a oxidação dos grupos sulfidríla no sítio ativo, enquanto os outros quatro presumivelmente unem as subunidades para manter a estabilidade da estrutura homooctamérica (Jaffe *et al.* 1984).

O efeito do chumbo na atividade da ALAD tornou-se um assunto de grande interesse, pois a ALAD está envolvida na síntese do heme e é fortemente inibida pelo chumbo, resultando, assim, no acúmulo do ácido aminolevulínico (ALA) na urina e plasma (Wetmur *et al.*, 1991 a; Onalaja & Claudio, 2000; Kelada *et al.* 2001).

Battistuzzi *et al.*, em 1981, mostraram que a enzima ALAD humana é polimórfica. Posteriormente, o cDNA foi clonado e o gene seqüenciado por Wetmur *et al.*, 1986.

A enzima é codificada por um único gene localizado no cromossomo 9q34 (Potluri *et al.*, 1987). A expressão de dois alelos comuns, designados ALAD1 e ALAD2, resulta em três distintas isozimas, ALAD 1-1, ALAD 1-2, e ALAD 2-2, todas exibindo atividades similares, mas com diferentes cargas (Battistuzzi *et al.*, 1981). Wetmur *et al.* (1991a) mostraram que esse polimorfismo resulta de uma diferença de um único nucleotídeo: a substituição de uma Guanina por uma Citosina na posição 177 da região codificadora do gene ALAD (dbSNP ID: rs1800435), que predizia a substituição de uma asparagina (neutra) por uma lisina (positivamente carregada) no resíduo 59 (K59N) da subunidade da

enzima. Afigura-se que esta substituição altera a carga elétrica da molécula, resultando em uma afinidade maior do ALAD2 para o chumbo, em relação ao ALAD1 (Onalaja & Claudio, 2000).

A prevalência do alelo ALAD2 varia com a raça e etnia. Foi relatado que 9,9% dos Asiáticos (Lee *et al.* 2001) e aproximadamente 20% dos Caucasianos portavam o alelo (Ziemsens *et al.* 1986; Wetmur *et al.* 1991a, b; Onalaja & Claudio 2000; Kelada *et al.*, 2001).

Vários estudos têm sugerido que os indivíduos heterozigotos e homozigotos para o ALAD2 teriam maior concentração de chumbo no sangue e osso, tornando-os mais suscetíveis, tanto aos níveis baixos e crônicos do chumbo quanto aos níveis de exposição aguda. Para testar essa hipótese, os genótipos da ALAD e a concentração de chumbo no sangue foram determinados em indivíduos expostos a baixas ou altas concentrações de chumbo no ambiente (Ziemsens *et al.* 1986; Astrin *et al.* 1987; Wetmur *et al.* 1991b, Fleming *et al.* 1998; Shen *et al.*, 2001; Montenegro *et al.*, 2006 a). Concentrações mais altas de chumbo no plasma e na razão %Pb-plasma/%Pb-sangue foram associadas significativamente com o alelo ALAD2 quando comparadas com o alelo ALAD1 (Montenegro *et al.*, 2006 a).

Embora estes estudos anteriores sugiram que este polimorfismo pode alterar o transporte, o metabolismo e/ou a distribuição do chumbo pelo organismo, não está claro como ele afeta a toxicocinética do chumbo. Alguns autores sugerem que o ALAD2 promove uma ligação mais forte com chumbo do que o ALAD1, o que ocasiona uma maior inativação da enzima ALAD, aumentando o risco de toxicidade nos indivíduos portadores do alelo ALAD2 (Astrin *et al.* 1987; Wetmur *et al.* 1991b). Outros pesquisadores sugerem que a maior capacidade conferida ao ALAD2 de ligação com o chumbo pode conferir resistência aos efeitos nocivos deste metal, pois indivíduos portadores do ALAD2 vão possuir menos chumbo biodisponível (Schwartz *et al.* 1995, 2000b; Sithisarankul *et al.* 1997; Kim *et al.*, 2004; Fleming *et al.* 1998).

Polimorfismo do Gene Receptor da Vitamina D (VDR)

A vitamina D e seus metabólitos ativos (especialmente 1,25-dihidroxitamina D ou calcitriol) estão primariamente envolvidos na manutenção da homeostase do osso e do cálcio (Rezende *et al.*, 2007).

O hormônio da vitamina D circulante no sangue (calcitriol) liga-se aos receptores da vitamina D (VDR) no núcleo das células intestinais. Lá, a alta afinidade dos VDR parece ativar genes que codificam proteínas ligantes de cálcio, tais como calbindina-D, a qual está envolvida no transporte intestinal de cálcio (Wasserman & Fullmer, 1995). O aumento na produção de calbindina-D nas células intestinais resulta em um aumento da absorção de cálcio através do intestino. Devido a naturezas bioquímicas similares, de cátions bivalentes, o cálcio e o chumbo freqüentemente interagem nos mesmos sistemas biológicos. Por esta razão, acredita-se que muitos dos efeitos celulares do chumbo são devido aos seus efeitos sobre a função normal dos sistemas cálcio-dependentes (Pounds, 1984). Embora a relação entre cálcio e chumbo seja complexa, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a captação celular de chumbo aumenta quando o estoque de cálcio é reduzido. Assim, uma dieta deficiente em cálcio contribui para o aumento da absorção e retenção intestinal de chumbo (Fullmer, 1992; Six & Goyer, 1970; Onalaja & Claudio, 2000; Godwin, 2001). Além disso, a calbindina-D possui uma alta afinidade pelo chumbo e pode estar envolvida em seu transporte.

Em seguida, após a absorção de cálcio e chumbo através do intestino, eles são cotransportados para a corrente sangüínea, e, a partir daí, os dois metais podem ser codistribuídos aos tecidos ricos em cálcio, como o osso (Fullmer *et al.*, 1985; Richardt *et al.*, 1986). Por meio deste mecanismo, é possível explicar porque existe um aumento da absorção do chumbo durante uma dieta deficiente em cálcio: a deficiência de cálcio aumenta a produção do hormônio da vitamina D e, conseqüentemente, da síntese de proteínas ligantes de cálcio. Na presença de chumbo, tais proteínas ligar-se-ão a este metal, aumentando seu transporte (Onalaja & Claudio, 2000).

O papel da vitamina D na absorção de cálcio e chumbo está ilustrado na Figura 3.

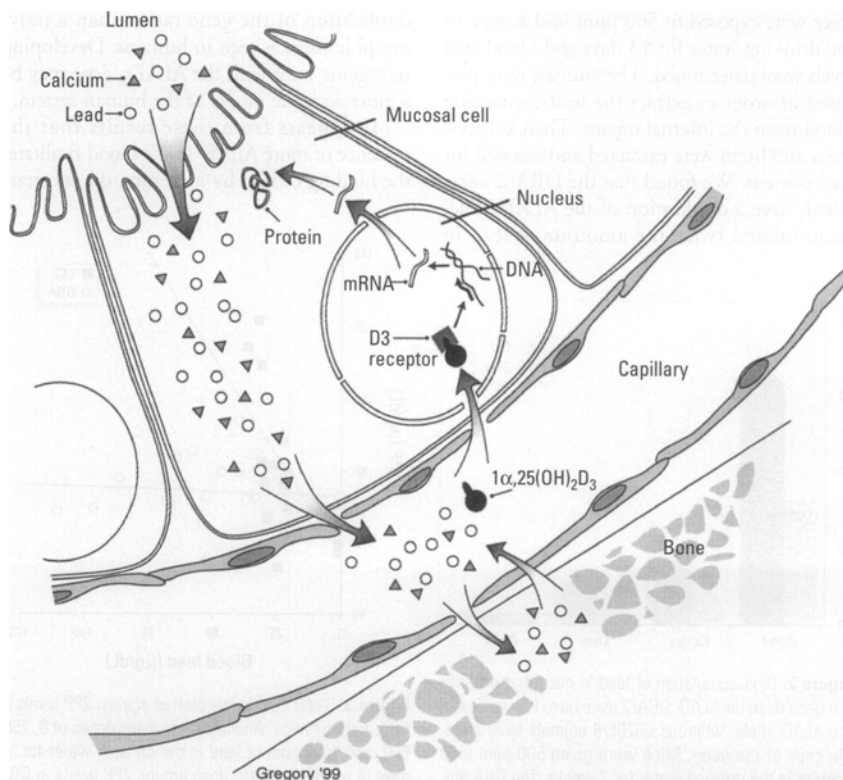


Figura 3 – Possível papel dos receptores da vitamina D na absorção do cálcio e chumbo. Fonte: Onalaja e Claudio, 2000.

Os efeitos produzidos pela vitamina D podem ser afetados por algumas variações genéticas, que foram identificadas no gene VDR. Existem várias formas polimórficas do VDR humano (Uitterlinden *et al.*, 2004). Estas são definidas pelo comprimento do fragmento de restrição polimórfico (RFLP), resultante da clivagem do DNA com diferentes enzimas de restrição. Os polimorfismos definidos pelas enzimas de restrição *BsmI*, *ApaI* e *FokI* resultam em três genótipos denominados bb, aa e ff respectivamente, quando o sítio de restrição está presente; BB, AA e FF, respectivamente, quando está ausente e Bb, Aa e Ff, respectivamente, quando os dois alelos estão presentes. Não existem evidências que indicam que os variantes do gene VDR ocorram com diferentes frequências em diferentes grupos étnicos (Uitterlinden *et al.*, 2004).

Estes polimorfismos têm sido associados às alterações no metabolismo do cálcio e biologia óssea (Valdivielso & Fernandez 2006) e podem afetar a suscetibilidade à intoxicação por chumbo (Onalaja & Claudio, 2000), uma vez que o metal acumula-se no

tecido ósseo durante todos os estágios da remodelação e crescimento ósseo (Rabinowitz 1991; Pounds *et al.* 1991). No entanto, o metal pode retornar à corrente sanguínea como resultado do processo de reabsorção óssea, aumentando, assim, seu nível de concentração no plasma, que é provavelmente o índice mais relevante para a toxicidade do chumbo, por refletir a porção difusível do chumbo em nosso organismo (Barbosa *et al.* 2005).

Ames *et al.* (1999) relataram que o genótipo FF (polimorfismo *FokI*), estava associado com o aumento da densidade mineral óssea e com um aumento de 30-40% na absorção de cálcio em crianças saudáveis de 7 a 12 anos.

Como exposto, há polimorfismos genéticos que modificam as concentrações de chumbo no sangue e osso e poderiam afetar também os níveis do metal encontrados nos dentes (especialmente porque nos dentes, como no osso, esse efeito é cumulativo). Além disso, geneticamente, a população brasileira possui algumas diferenças (Montenegro *et al.*, 2006 b) das populações da Europa e EUA, nas quais foi feita a maioria dos trabalhos de polimorfismos e concentrações de chumbo no sangue e osso (Bergdahl *et al.*, 1999; Haynes *et al.*, 2003; Scinicariello *et al.*, 2007).

A correlação entre os níveis de chumbo no sangue total e plasma/soro com variantes genéticas da ALAD e VDR de crianças ainda não foi esclarecida. Essa relação desses genótipos também nunca foi testada em esmalte dental. Por isso, nosso trabalho visa estudar esses polimorfismos já descritos, em crianças aparentemente não expostas e verificar se eles modificam as concentrações de chumbo no sangue, plasma e no esmalte dental.

Biomarcadores de dose interna

Sangue total:

Considera-se que o chumbo no sangue reflete, principalmente, exposições ambientais recentes ao invés de doses cumulativas (Hu *et al.*, 1998). Assim, no caso de uma exposição ativa ao chumbo, a dosagem sanguínea representa a exposição recente ao metal, pois sua vida biológica no sangue é de aproximadamente 30-40 dias (Rabinowitz, 1991). Isso acontece porque a maior parte do metal vai ser depositada nos tecidos mineralizados, onde permanece por muitos anos (Rabinowitz, 1991; Todd *et al.*, 1996; Ambrose *et al.*,

2000). Caso a exposição cesse ou diminua, os níveis de chumbo no sangue também podem refletir a mobilização do metal do osso de volta à circulação (Gulson *et al.*, 1996). Desta forma, a porcentagem de chumbo proveniente de exposição passada na corrente sanguínea aumenta até que todo seu estoque nos tecidos ósseos se esgote. Este fato tem sido reportado em estudos ocupacionais (Schutz *et al.*, 1987), clínicos (Rabinowitz *et al.*, 1976), entre mulheres grávidas (Gulson *et al.*, 1997) e de variações geográficas (Manton, 1985).

De acordo com Gwiazda *et al.* (2005), a contribuição para o sangue do chumbo presente no osso de crianças expostas pode ser de 90% ou mais. Um estudo realizado em crianças com concentração de chumbo no sangue entre 25 e 29 µg/dL, as quais não foram submetidas à terapia de quelação, mostrou que o tempo requerido para o declínio de tal concentração à níveis abaixo de 10 µg/dL é cerca de 2 anos (Roberts *et al.*, 2001).

Apesar de muitos estudos relatarem associações significativas entre concentração de chumbo no sangue e conseqüentes efeitos na saúde, alguns deles apresentam correlações estatisticamente fracas e a magnitude dos efeitos relativamente baixa. De acordo com Hu *et al.* (1998), isto pode ocorrer devido a alguns fatores: 1) as relações envolvidas serem biologicamente fracas ou experimentadas por um segmento pequeno da população estudada; 2) estas relações serem biologicamente irrelevantes e encontradas em decorrência dos fatores de confusão não controlados; ou 3) o chumbo no sangue não ser um marcador de exposição ou dose suficientemente sensível aos órgãos alvo.

Tendo em vista a cinética de distribuição do chumbo no organismo, não é possível fazer uma diferenciação entre exposição crônica a baixas concentrações e exposição aguda com base em apenas uma medida de chumbo no sangue (Hu *et al.*, 1998). Além disso, a exposição crônica ao chumbo na primeira infância pode ser camuflada pela “diluição” dos efeitos durante períodos de rápido crescimento ósseo em crianças e adolescentes, e pode não ser detectada por uma única medida de chumbo no sangue (Barbosa *et al.*, 2005).

Plasma/soro:

Após entrar no plasma, a maior quantidade do metal (cerca de 99%) retorna aos eritrócitos (Manton & Cook, 1984). Experimentos *in vitro* indicam um equilíbrio muito rápido do metal entre o plasma e as células eritrocitárias (Simons, 1993). O chumbo que

permanece no plasma vai se ligar às proteínas (principalmente albumina), ou permanecer na forma difusível (Koh *et al.*, 2003). As concentrações de chumbo encontradas no plasma são da ordem de um único µg/L, ou menos (Bergdahl *et al.*, 2006).

De um ponto de vista fisiológico, a concentração de chumbo no plasma representa o índice mais relevante de exposição, distribuição e risco à saúde, se comparado com o chumbo no sangue total, pois a fração plasmática está em continuidade com o líquido intersticial dos tecidos (Barbosa *et al.*, 2005).

No entanto, problemas analíticos que ocorrem devido a baixas concentrações do chumbo no plasma são as principais razões pelas quais essa medida não é utilizada. A determinação de chumbo no plasma é mais cara e geralmente menos precisa do que a análise do sangue total (Bergdah *et al.*, 2006). O desenvolvimento e uso de instrumentos analíticos mais sensíveis, especialmente a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICPMS), tem resultado em determinações de chumbo no plasma com limites de detecção muito menores e com melhor precisão (Manton *et al.*, 2001; Barbosa et a., 2005). No entanto, é difícil verificar a precisão das análises de chumbo em plasma, uma vez que não existem programas de comparações interlaboratoriais (Bergdahl & Skerfving, 2008).

A análise do chumbo no plasma/soro é particularmente relevante no presente trabalho porque provavelmente é esta fração que está em contato com o esmalte dental ao longo de sua fase de mineralização (ainda dentro das criptas ósseas) e também aquela que está disponível nas glândulas salivares para formar a saliva. Assim, os dados de chumbo no plasma poderão permitir correlações importantes entre chumbo no esmalte e plasma, e saliva e plasma.

De acordo com Manton et al. (2001) parece não haver diferença na concentração de chumbo no plasma e soro. No entanto, os termos não podem ser utilizados de forma indiscriminada. Neste trabalho utilizaremos o termo soro para o fluido obtido pela centrifugação do sangue sem a utilização de qualquer anticoagulante, independentemente se a coagulação ocorreu.

Saliva:

Normalmente, o chumbo é analisado no sangue total com o objetivo de monitoramento da exposição em populações humanas. No entanto, coleta de sangue é um procedimento invasivo que provoca desconforto, especialmente em crianças (Barbosa *et al.*, 2006).

Desse modo, a saliva tem sido proposta por alguns autores como um possível biomarcador de exposição ao chumbo (Silbergeld, 1993; Koh *et al.*, 2003; Nriagu *et al.*, 2006) por ser um procedimento não invasivo, de fácil coleta e custos mais baixos. Além disso, alguns autores acreditam que o chumbo na saliva, que é formada pelo transporte ativo de água e íons do plasma (Humphrey & Williamson, 2001), seja a excreção direta da fração do metal não ligado a proteínas do plasma (P'an, 1981; Omokhodion & Crockford, 1991; Barbosa *et al.*, 2006), que é provavelmente o índice mais relevante de sua toxicidade, por refletir a porção que é difusível em nosso organismo.

Apesar da idéia da utilização da saliva para determinação de chumbo ser atraente, existem algumas desvantagens como, por exemplo, grande variação na sua concentração de íons ao longo do dia, mudanças de seu fluxo antes, durante e após as refeições e falta de materiais de referência certificados. As variações também dependem da maneira como a saliva é coletada, se estimulada (ou não) e do nível nutricional e hormonal de cada indivíduo (Barbosa *et al.*, 2006). Ademais, não existe valor de limite biológico conhecido para chumbo na saliva (Silbergeld, 1993, Koh *et al.*, 2003, Barbosa *et al.*, 2006).

Não existem estudos conclusivos sobre qual saliva seria o melhor marcador para a exposição ao chumbo, assim, este é um assunto que merece mais atenção.

Dentes:

Muitos autores têm enfatizado as vantagens da utilização dos dentes para determinação de chumbo (Brudevold & Steadman, 1956; Altshuller *et al.*, 1962; Needleman *et al.*, 1972, 1979; Brudevold *et al.*, 1975, 1977; Attramadal & Jonsen, 1976; Fosse & Justesen, 1978; Grobler *et al.*, 1985; Mackie *et al.*, 1977; Fergusson & Purchase, 1987; Gulson, 1996; Budd *et al.*, 1998; Bloch *et al.*, 1998; Tvinnereim *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2004; Costa de Almeida *et al.*, 2007; de Almeida *et al.*, 2008).

A história da deposição do chumbo é importante, principalmente, para estudos dos efeitos da contaminação crônica do metal na saúde. No entanto, a maior parte dos estudos que utiliza medidas de chumbo em dentes obtém os dados a partir de dentes inteiros extraídos, que possuem desvantagens por serem compostos por diferentes tecidos calcificados, com constituição, desenvolvimento e conseqüentemente, com concentrações de chumbo diferentes (Purchase & Fergusson, 1986; Gulson, 1996).

Outra desvantagem importante é o fato de os dados serem obtidos, geralmente, apenas de crianças com idade superior a 6 anos, período em que, normalmente, os dentes começam a esfoliar. Tal limitação não permite o uso dos dentes decíduos para avaliar uma exposição constante ao chumbo, que poderia prejudicar o sistema nervoso em desenvolvimento de uma criança com menos de 6 anos (Gomes *et al.*, 2004). Além disso, a comparação entre os estudos que realizaram medidas de chumbo em dentes também é difícil devido à ampla diferença na idade dos sujeitos avaliados e o uso de diferentes tipos de dentes que possuem diferentes concentrações de chumbo (Rabinowitz *et al.*, 1991; Tvinnereim *et al.*, 1997). Alguns autores relatam que a concentração do chumbo varia entre incisivos, caninos e molares, apresentando um gradiente que decresce dos incisivos para os molares (Mackie *et al.*, 1977; Paterson *et al.*, 1988; Tvinnereim *et al.*, 2000; Karahalil *et al.*, 2007). Grandjean *et al.* (1984, 1986) e Smith *et al.* (1983) não encontraram diferenças nas concentrações de chumbo presentes em dentes contralaterais.

A dentina e o esmalte formados antes e após o nascimento podem ser identificados por meio da linha neonatal. Esta linha é um achado histológico que, normalmente, está presente em todos os dentes decíduos e, ocasionalmente, em primeiros molares permanentes. Por meio de sua visualização pela microscopia de luz polarizada podemos utilizá-la para identificação de regiões do esmalte e da dentina depositadas nos períodos pré e pós- natal (Weber & Eisenmann, 1971). Assim, a análise de dentes decíduos esfoliados pode fornecer dados importantes sobre a história da contaminação por chumbo desde a vida intra-uterina (Rabinowitz *et al.*, 1993; Arora *et al.*, 2006).

Dentina

Como a dentina é relativamente estável, ou seja, apresenta uma remodelação muito menor que o osso (Steenhout, 1982) ela registra a história de exposição ao chumbo desde sua mineralização (Rabinowitz, 1991). Devido ao acúmulo preferencial do chumbo em tecidos calcificados, a concentração do metal na dentina de dentes decíduos tem sido utilizada como um indicador da exposição ambiental crônica durante a infância (Bellinger *et al.*, 1987, Gulson, 1996, Gulson & Gillings, 1997; Needleman *et al.*, 1974, 1979, 1990; Needleman & Bellinger, 1991), e tem sido correlacionada significativamente com deficiências no desenvolvimento neurológico e função cognitiva (Needleman *et al.*, 1979; Rabinowitz *et al.*, 1991; Bellinger *et al.*, 1992; Lanphear *et al.*, 2000; Canfield *et al.*, 2003; Chiodo *et al.*, 2004; Surkan *et al.*, 2007). Needleman *et al.* (1979) enfatizou o uso inadequado da concentração de chumbo no sangue como um marcador da exposição cumulativa e sugeriu que a utilização do chumbo no sangue pode explicar as discrepantes conclusões de estudos anteriores, os quais o chumbo não foi associado com prejuízos neuropsicológico. De acordo com Purchase & Fergusson (1986), a dentina de dentes permanentes pode ser o melhor material para estimar a carga corpórea de chumbo.

Os trabalhos mais citados até hoje, nos quais se comprovou a associação entre exposição a maiores níveis de chumbo no passado com diminuição de QI, inabilidades de fala e atenção e distúrbios no desenvolvimento psíquico, utilizaram dentina de dentes decíduos como tecido marcador da exposição a chumbo (Needleman *et al.*, 1972, 1974, 1979). A incorporação de chumbo à hidroxiapatita da dentina acontece como reflexo dos níveis de chumbo no sangue durante sua mineralização (Rabinowitz *et al.*, 1993). Mesmo depois da erupção dental, a dentina continua sendo depositada, mas em ritmo mais lento. Assim, ela é um indicador da exposição ao chumbo durante toda a vida do indivíduo (Rabinowitz, 1991; Shapiro *et al.*, 1973). Por isso, um acúmulo de chumbo relacionado à idade foi demonstrado na dentina, mas não no esmalte (Lappalainen & Knuuttila, 1982).

Esmalte

Existe uma variação muito grande, descrita na literatura, entre as concentrações de chumbo no esmalte dentário (Shapiro *et al.*, 1972; Fergusson *et al.*, 1987; Gil *et al.*, 1994; Arora *et al.*, 2006), que vai de 1,7 até 4,900 ppm (Brudevold e Steadman, 1956). Estudos

experimentais com animais mostraram evidências de que o chumbo possui uma distribuição espacial heterogênea no dente, com uma maior concentração na superfície do esmalte (Arora *et al.* 2005).

Embora dados acerca da concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos sejam escassos, uma vez que poucos trabalhos utilizaram este modelo como amostra (Gomes *et al.*, 2004; Costa de Almeida *et al.*, 2007; de Almeida *et al.*, 2008), alguns autores consideram o esmalte dentário promissor para se detectar contaminações precoces pelo chumbo (Ericson 2001; Uryu *et al.* 2003; Rinderknecht *et al.* 2005; Costa de Almeida *et al.*, 2007), particularmente quando se tem em vista que as amostras de esmalte superficial são facilmente coletadas pela técnica da microbiópsia de esmalte.

A microbiópsia é um procedimento de ataque ácido, que utiliza solução de HCl a 1,6 mol.L⁻¹ em glicerol 70% (v/v). Quando a solução é preparada apropriadamente, (com reagentes ultrapuros) e o procedimento é realizado cuidadosamente, esta técnica permite a obtenção de amostras não contaminadas da superfície do esmalte em volume adequado para a determinação de fósforo, cálcio e chumbo. E o mais importante, é que o procedimento leva apenas 20 segundos e pode ser feito in vivo, sem a necessidade de coleta e secção dos dentes decíduos.

A primeira descrição da microbiópsia de esmalte para determinar chumbo foi feita em 1975, por Brudevold *et al.*, que utilizaram esta técnica para determinar chumbo em dentes permanentes extraídos. Este método foi utilizado, posteriormente, em vários estudos in vivo em dentes permanentes (Cleymaet *et al.*, 1991 a,b,c,d,e). Recentemente, algumas modificações foram feitas à técnica original para adaptá-la aos dentes decíduos (Gomes *et al.*, 2004), e com isso, permitir a coleta de dados de exposição ao chumbo em populações de crianças de 4 a 6 anos, com o objetivo do monitoramento de populações. No entanto, alguns detalhes sobre a técnica da microbiópsia, que são cruciais para sua ampla utilização na detecção de crianças expostas ao chumbo, ainda não tinham sido estudados até o momento. O estudo de Costa de Almeida *et al.* (enviado para publicação – Apêndice 2) estudou a morfologia da microbiópsia de esmalte por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura e por Microscopia de Luz Polarizada.

Uma importante desvantagem da técnica da microbiópsia é que devido o acúmulo de chumbo ainda não estar estabelecido para o esmalte, apenas microbiópsias de mesma profundidade podem ser comparadas entre si (Gomes *et al.*, 2004). Outra questão relacionada com a incorporação de chumbo pelo esmalte é se essa incorporação reflete uma incorporação pré-eruptiva, ou seja, a exposição da matriz de esmalte ao plasma durante o estágio de maturação da amelogênese, e a quantidade de chumbo disponível no plasma, ou uma incorporação pós-eruptiva, ou seja, a exposição do esmalte superficial à saliva, e a quantidade de chumbo disponível na saliva. Trabalhos recentes mostram que a primeira hipótese é, biologicamente, a mais aceita (Arora *et al.*, 2005; Arora *et al.*, 2006; Costa de Almeida *et al.*, 2008).

A concentração de chumbo no esmalte dental decíduo é influenciada consideravelmente pelo grau de exposição ao chumbo no ambiente. Estudos que utilizaram a técnica da microbiópsia para obter uma amostra de esmalte superficial em dentes permanentes (Cleymaet *et al.*, 1991a) e decíduos (Gomes *et al.*, 2004) mostraram que as concentrações de chumbo são mais altas em crianças que residem em áreas urbanas ou industriais do que em aquelas que residem em áreas suburbanas, rurais ou não industriais. Conclusões similares foram relatadas em estudos utilizando dentes inteiros (Stewart, 1974; Steenhout & Pourtois, 1981; Noren *et al.*, 1987) e dentina (Shapiro *et al.*, 1972; Needleman *et al.*, 1972, 1974; Grobler *et al.*, 1985). A relação entre o nível de poluição ambiental e a concentração de chumbo nos dentes também foi demonstrada pela comparação de dentes de sítios arqueológicos e contemporâneos (Budd *et al.*, 1998).

Em um trabalho anterior (Costa de Almeida *et al.*, 2007), mostramos que o esmalte de dentes decíduos de crianças residentes em regiões contaminadas apresenta cerca de 4 vezes mais chumbo do que o esmalte de crianças residentes em cidades sem uma fonte de contaminação conhecida, o que sugere que este tecido é um bom marcador da contaminação ambiental. Posteriormente (de Almeida *et al.*, 2008), demonstramos, também, que o esmalte decíduo pode ser usado para identificar crianças e ambientes expostos a níveis mais elevados de chumbo.

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Determinar e correlacionar a concentração de chumbo de crianças residentes no Bairro Campos Elíseos de Ribeirão Preto, nos seguintes biomarcadores de dose interna: em duas microbiópsias sucessivas em esmalte de um dente decíduo e um dente permanente, na saliva total, submandibular/sublingual e parótida, no sangue total e no soro;
- 2) Comparar a concentração de chumbo encontrada nos diferentes biomarcadores de acordo com a presença ou ausência de anemia;
- 3) Comparar a influência dos polimorfismos da ALAD e VDR nos níveis de chumbo nos fluidos e dentes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra e local da pesquisa

Neste estudo foram incluídas um total de 444 crianças, com idades entre 6 e 8 anos, sendo 199 meninos (45%) e 245 (55%) meninas, que moram no bairro dos Campos Elíseos em Ribeirão Preto, SP. Este bairro foi escolhido porque, em um estudo anterior, os maiores níveis de chumbo foram identificados em uma Escola Municipal de Educação Infantil (EMEI) pertencente a este bairro (de Almeida *et al.*, 2008). Na Figura 4, essa escola aparece como a de número 5.

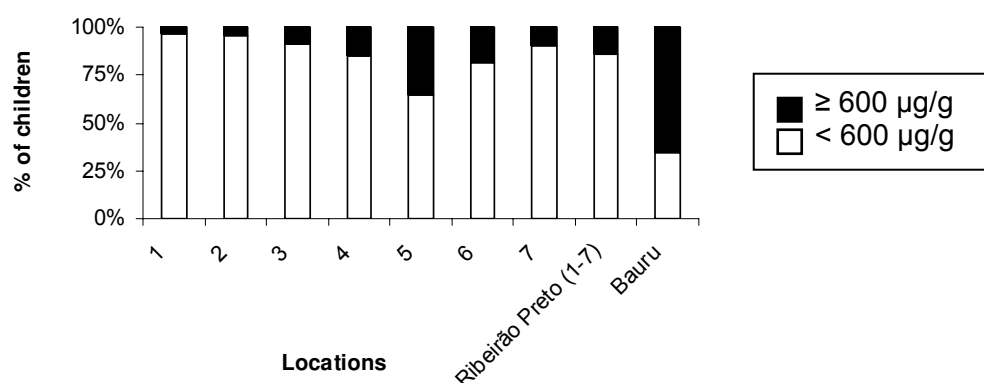


Figura 4 - Distribuição de crianças (%) de acordo com os níveis de chumbo ($\geq 600 \mu\text{g/g}$ ou $< 600 \mu\text{g/g}$). Fonte: de Almeida *et al.*, 2008.

O número mínimo de participantes (250 indivíduos) foi estimado com base em estudo prévio, no qual houve a prevalência de 30% de crianças contaminadas por chumbo em concentração $\geq 600 \mu\text{g/g}$, que foi a mediana encontrada numa população sabidamente contaminada pelo metal (de Almeida *et al.*, 2008). Assim, diante do pressuposto de que correlações com baixos níveis de chumbo pudessem ser muito fracas ou inexistentes, queríamos garantir que pelo menos cerca de 50 crianças apresentassem níveis de chumbo acima de $600 \mu\text{g/g}$, para que obtivéssemos um número mínimo para a estatística. Esta amostra mínima foi calculada, também, prevendo uma perda de 10% por motivos técnicos de laboratório. Na realidade, após a análise dos primeiros 180 indivíduos, verificamos que a prevalência de crianças com chumbo acima de $600 \mu\text{g/dL}$ era inferior a 10%, razão por que tentamos chegar próximo a 500 indivíduos.

Para iniciar a pesquisa nas escolas, autorizações da Secretaria de Saúde Municipal, Secretaria de Educação Municipal e Diretoria de Ensino foram obtidas.

Participaram deste estudo quatro escolas presentes no bairro, sendo que duas delas eram municipais (EMEFEM Dom Luiz do Amaral Mousinho, CEMEI Virgílio Salata) e duas estaduais (EE Dom Alberto José Gonçalves e EE Antônio Diederichsen).

Foram realizadas reuniões com pais ou responsáveis dos alunos para explicações sobre a pesquisa e obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido.

As coletas foram feitas no consultório odontológico presente em cada escola.

Aspectos éticos

Por se tratar de um trabalho com seres humanos, a proposta deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo número 2006.1.797.58.5), segundo a Resolução 196/96 de 10 de novembro de 1996 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Materiais

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza analítica.

Os tubos para centrifuga (tipo eppendorf - Axygen Scientific, Inc., Union City, USA), ponteiras, pipetas de Pasteur e coletores de saliva foram previamente deixados em solução de ácido nítrico 10% durante 24 horas. Em seguida, esse material recebeu 5 banhos com água MILI-Q e foi seco em capela de fluxo laminar classe 100. Todo esse procedimento foi realizado dentro de uma sala branca classe 10000. Tal limpeza tinha o objetivo de descontaminação do material para o chumbo.

Coleta das amostras

Sangue:

Antes da coleta de sangue, a pele de cada indivíduo foi limpa com uma solução de álcool 70%. Foram coletados aproximadamente 5 mL de sangue venoso de cada criança, e essa quantidade foi distribuída em diferentes tubos para coleta a vácuo:

- 1 mL em tubo Vacutainer® (trace metals free, BD) com EDTA para a dosagem de chumbo no sangue total;

- 2 mL em tubo Vacutainer® (trace metals free, BD) sem qualquer anticoagulante para a dosagem de chumbo no soro;

- 2 mL em tubo Vacutainer® com EDTA para as avaliações hematológicas.

As amostras de sangue colocadas no tubo sem anticoagulante foram imediatamente centrifugadas (800xg durante 6 minutos à temperatura ambiente) com o intuito de separar o soro do sangue total e, assim, evitar a transferência do chumbo dos eritrócitos. A fração de soro foi pipetada em eppendorf (2 mL) e imediatamente congelada à -20°C até sua análise. Schutz *et al.* (1996) sugeriram que a utilização do EDTA como anticoagulante pode causar falsos resultados elevados de chumbo no soro, devido à extração do chumbo dos eritrócitos.

As amostras de soro foram examinadas a olho nu, para verificação da hemólise e foram divididas em 3 grupos: nenhuma, ligeira (sem qualquer coloração vermelha óbvia) ou com óbvia contaminação pelos eritrócitos. As amostras com ligeira coloração avermelhada foram mantidas no estudo e 21 amostras, que apresentaram óbvia contaminação pelos eritrócitos e foram excluídas de todas as análises de dados.

Saliva:

Foram coletadas 3 tipos de saliva: saliva total, saliva das glândulas submandibular/sublingual e saliva da glândula parótida:

Após uma lavagem da boca da criança, aproximadamente 4 mL de saliva total não estimulada foram coletados em um tubo Falcon de 50 mL (trace metal free, BD). Estes tubos foram centrifugados (15000g durante 5 minutos à temperatura ambiente) e o sobrenadante recolhido e aliquotado em tubos eppendorfs (2 mL) .

A saliva proveniente das glândulas submandibular e sublingual (a qual chamaremos de saliva sub) foi coletada após isolamento relativo com rolos de algodão (para evitar que a saliva secretada pela glândula parótida se misturasse à saliva secretada pelas glândulas submandibular e sublingual). A saliva sub foi coletada utilizando pipeta de Pasteur e aliquotada em eppendorf (2 mL).

A saliva proveniente da glândula parótida foi coletada utilizando o Coletor de Carlson–Crittenden modificado. Esse coletor consiste em um dispositivo com uma câmara interna e externa (Navazesh, 1993). Na câmara interna é acoplado um tubo plástico que conduz a saliva a um eppendorf (2 mL). Na câmara externa é acoplado um tubo plástico conectado a um dispositivo que faz sucção e gera um vácuo (Figura 5). Depois, algumas gotas de limão foram colocadas na língua do paciente para estimular a secreção da saliva pela glândula parótida.

Durante o decorrer do estudo, verificamos que as concentrações de chumbo eram muito mais altas na saliva total do que nos outros tipos de saliva, provavelmente devido a contaminação por componentes como, por exemplo, restos alimentares. Por isso, essa saliva parou de ser coletada.

As amostras foram armazenadas à -20°C até suas análises.

Tanto as amostras de sangue quanto as amostras de saliva de cada indivíduo foram coletadas na mesma hora.

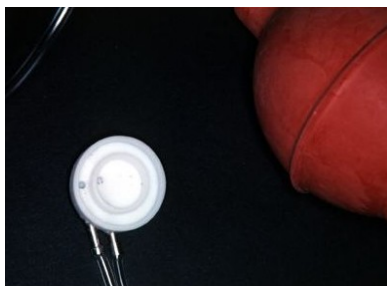


Figura 5: Coletor de Carlson–Crittenden modificado.

Esmalte dental:

Foram realizadas 4 microbiópsias em esmalte dental de cada criança, sendo 2 microbiópsias sucessivas em incisivo central superior permanente direito (dente 11, e na ausência deste, o 21), e 2 microbiópsias sucessivas em canino superior decíduo direito (dente 53, e na ausência deste, o 63). Na ausência de dentes permanentes, a microbiópsia foi realizada apenas em decíduo e vice-versa. A técnica utilizada foi a de Brudevold *et al.* (1975) adaptada por Gomes *et al.* (2004). Resumidamente, os dentes foram submetidos à profilaxia profissional com escova de Robinson, em baixa-rotação (Figura 6A), seguindo-se lavagem e secagem com ar e, em seguida, isolados relativamente com roletes de algodão.

Em seguida, uma fita adesiva (fita mágica, 810 Scotch® - 3M) com uma perfuração de diâmetro 1,6 mm foi firmemente aderida à porção central da superfície vestibular do dente, demarcando o local da biópsia. Nesta demarcação foram depositados, com uma micropipeta automática, 5 µl da solução de HCl a 1,6 mol.L⁻¹ em glicerol 70% (v/v), e agitado suavemente com a ponta do pipetador durante 20 segundos (Figura 6B). A solução da biópsia foi aspirada e transferida a um tubo eppendorf (2 mL) contendo 200 µl de água MILLI-Q (Figura 6C), sendo aplicados, após, por 10 segundos, 5 µl de solução de glicerol a 70% na demarcação, os quais também foram aspirados e adicionados à solução de biópsia presente no tubo de coleta. Finalizando este procedimento, a fita adesiva foi removida, o dente lavado com água durante 30 segundos, seco com jatos de ar e isolado novamente para receber aplicação de flúor neutro em gel (Figura 6D). O controle das biópsias foi obtido por meio de *Blanks* e por biópsias controle na superfície da bancada ou sobre as tampas dos suportes para ponteira (Figura 6E), a fim de verificar a contaminação pelo chumbo no ambiente de trabalho durante os procedimentos.

As amostras foram divididas em duas metades (de 105 µl cada), sendo uma utilizada para a dosagem de fósforo e outra para a dosagem do chumbo, e armazenadas à -20°C até suas análises.

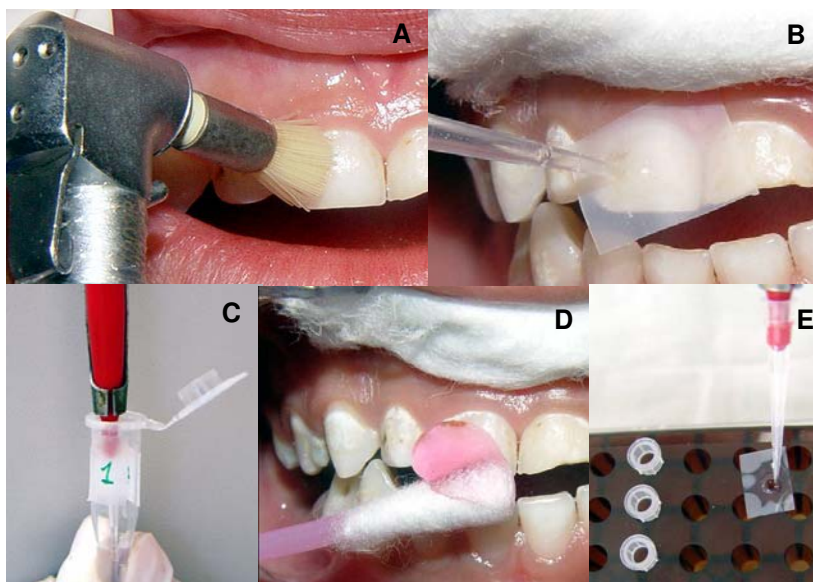


Figura 6 – Técnica da microbiópsia de esmalte. **A** - Profilaxia com escova de Robinson; **B** - Aplicação da solução ácida; **C** - Transferência da solução para o tubo de coleta; **D** - Aplicação tópica de flúor neutro e **E** - Biópsia controle.

Análises químicas

Determinação de fósforo

As concentrações de fósforo presentes nas amostras foram determinadas pelo método colorimétrico de Fiske & Subbarow (1925), cujo princípio é que o fósforo dos fosfatos minerais é transformado em fosfomolibdato, o qual é, em seguida, reduzido pelo ácido alfa-amino-naftol sulfônico a um produto de cor azul, cuja intensidade de coloração é proporcional ao teor de fósforo inorgânico presente na amostra. A determinação das concentrações de fósforo foi realizada em triplicata. A variação entre as triplicatas foram de 0,2 a 6,3%. A reação consistiu de 30µl de amostra, 220 µl de água deionizada e 50 µl da solução de ácido molíbdico (molibdato de amônio a 2,5% (p/v) em 4N H₂SO₄), que foram cuidadosamente vortexados. Após 10 minutos, 20 µl do agente redutor foram adicionados à mistura e vortexados novamente. O agente redutor consiste em uma mistura em pó preparado com 1-Amino-2-Naphthol-4-Sulfônica Acid, sulfito de sódio e bissulfito de sódio na proporção 1:6:6. Minutos antes de usar, é misturado em água (2,5% (w/v)).

Após 20 minutos, absorvância foi medida a 660 nm. O aparelho foi calibrado com padrões que apresentavam concentrações conhecidas de fósforo, que foram de: 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml e 8 µg/ml, utilizadas para a realização da curva de calibração.

O conteúdo de fósforo de cada amostra de microbiópsia foi utilizado para calcular a quantidade de esmalte removida (g) e a profundidade de microbiópsia (µm). Sabendo-se que o esmalte humano é formado de cristais de hidroxiapatita, o qual contém 17,4% de P (Lazzari, 1976) e 37,1% de Ca (Brudevold *et al.*, 1956) em peso, e que o esmalte possui uma densidade de 2,95 g/cm³ (Weidmann *et al.*, 1967), a profundidade foi, então, calculada com base na fórmula do volume do cilindro – figura geométrica que se assemelha à camada do esmalte removido. A profundidade equivale, nesta figura, à altura do cilindro e foi deduzida pela expressão abaixo:

$$v = B \cdot h \quad (1)$$

$$h = v / B \quad (1')$$

$$d = m / v \quad (2)$$

$$v = m / d \quad (2')$$

Substituindo-se 2' em 1', tem-se:

$$h = m / B \cdot d \quad (3)$$

$$B = \pi \cdot r^2 \quad (4)$$

Substituindo-se 4 em 3 encontra-se:

$$h = m / \pi \cdot r^2 \cdot d$$

Sendo:

v= volume do cilindro

B= área da base do cilindro

h= altura do cilindro (profundidade da biópsia)

d= densidade do esmalte (2,95 g/cm³)

m= massa do esmalte

r= raio da biópsia

$$\pi = 3,14$$

A concentração de chumbo foi expressa em relação à massa de esmalte obtida para cada microbiópsia (µg/g).

Determinação de chumbo

As análises de chumbo foram realizadas pelo Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As concentrações de chumbo nas amostras de sangue total, plasma, salivas e microbiópsias de esmalte foram determinadas pela técnica da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICPMS) (Perkin Elmer Elan DRC II), de acordo com o método proposto por Barbosa *et al.* (2006). Resumidamente, os 200 µl de sangue e 200 µl de soro foram diluídos na proporção de 1:50 e 1:10, respectivamente, com uma solução contendo 0,005% Triton X-100 em 0,5% (v/v) HNO₃. As amostras de saliva e microbiópsia foram diluídas em solução de ácido nítrico 2% na proporção de 1:20.

O limite de detecção do método foi de 0,03 µg/L e 0,02 µg/L para o soro e saliva respectivamente.

Parâmetros hematológicos e parâmetros férricos:

As avaliações hematológicas foram realizadas pela Profa. Dra. Ana Maria de Souza do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A partir da utilização do contador de células Micros – ABX, o número global de eritrócitos e a concentração de hemoglobina foram determinados, com o objetivo de detectar crianças com anemia, ou seja, com valor de hemoglobina abaixo de 11,5 g/dL (valor de referência: 11,0 - 15,0 g/dL, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 2001).

Para detecção de hemoglobinas variantes e quantificação de Hb A2 e Hb F, foi realizado o HPLC (Keren *et al.*, 2008), com o uso do equipamento Variant II da Bio-Rad, e o “ β -talassemia Short Program”.

A ferritina sérica foi determinada pelo método de imunoquimioluminescência (Rohner *et al.*, 2005), utilizando o kit Ferritin Immulite – DPC, England, com o equipamento Immulite 1 - DPC, England, e tinha o objetivo de verificar o *status* férrico e se a anemia presente decorria de deficiência de ferro (anemia ferropriva). O valor de referência de ferritina para crianças é $> 15,0$ ng/dL (OMS, 2001).

Polimorfismos genéticos

Os pacientes realizam um bochecho com 3 mL de solução de sucrose 3% durante 1 min. Cada bochecho foi coletado em um tubo pra centrífuga (tipo Falcon) de 50 mL. Com uma haste de algodão, a mucosa da bochecha foi raspada e essa haste adicionada ao tubo. Das células epiteliais contidas nessa solução, o DNA foi extraído por meio da técnica de extração utilizando Acetato de Amônio (Aidar & Line, 2007).

Devido à problemas durante a coleta dos bochechos, ou durante a extração do DNA, apenas 280 amostras foram utilizadas para as genotipagens.

Polimorfismo Alad

Um ensaio baseado na reação da cadeia polimerase (PCR) foi usado para determinar os genótipos para o polimorfismo Alad, utilizando os primers: 5'-AGACAGACATTAGCTCAGTA-3' e 5'-GGCAAAGACCACGTCCATTC-3' (Wetmur *et*

al., 1991b). A reação de PCR foi realizada em um volume de 25 µl contendo 0,5 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, o tampão de PCR 1X fornecido pela Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; 10 mM Tris-HCl, pH 8,8, 50 mM KCl), 2,0 mM MgCl₂, e 2,5 U de DNA Taq polimerase (Biosystems). As condições de corrida foram: predesnaturação à 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30s, anelamento à 61°C por 30s e extensão à 72°C por 1min. Finalmente, extensão foi conduzida à 72°C por 4 min. Os produtos amplificados foram digeridos overnight com *MspI* à 37°C, produzindo somente um fragmento de 582 pb para o genótipo ALAD 1-1, fragmentos de 582 pb e 511 pb para o ADAL 1-2 e somente um fragmento de 511 pb para o ALAD 2-2. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e visualizados por coloração de prata.

Polimorfismo BsmI (rs 1544410)

Um ensaio baseado na reação da cadeia polimerase (PCR) foi usado para determinar os genótipos para o polimorfismo *BsmI* no intron 8 usando os primers 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' e 5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG-3', como descrito por Schwartz *et al.* (2000 b). A reação de PCR foi realizada em um volume de 25 µl que incluiu, aproximadamente, 500 ng de DNA genômico, 0,5 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, o tampão de PCR 1X fornecido pela Invitrogen Corporation (10 mM Tris-HCl, pH 8,8, 50 mM KCl), 2,0 mM MgCl₂, e 2,5 U de DNA Taq polimerase (Biosystems, Curitiba, Brasil). As condições de corrida foram: predesnaturação à 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30s, anelamento à 67°C por 30s e extensão à 72°C por 1 min. O fragmento resultante de 825 pb foi digerido com *BsmI* (New England Biolabs) por 2 h à 65°C, produzindo fragmentos de 825 pb para o “alelo selvagem” (alelo “B”), ou 650 pb e 175 pb no caso do variante polimórfico (alelo “b”). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e visualizados por coloração de prata.

Polimorfismo Apal (rs 7975232)

Para a detecção do polimorfismo *Apal* no intron 8, os primers 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3' e 5'-CAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3' foram utilizados no PCR (Curran *et al.*, 1999). A reação de PCR foi realizada em um volume de 25 µl contendo 0,25 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, o tampão de PCR 1X fornecido pela Invitrogen Corporation (10 mM Tris-HCl, pH 8,8, 50 mM KCl), 2,0 mM MgCl₂, e 2,5 U de DNA Taq polimerase (Biosystems). As condições de corrida foram: predesnaturação à 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 min, anelamento à 68°C por 1 min e extensão à 72°C por 1 min. Finalmente a extensão foi conduzida à 72°C por 7 min. Os produtos amplificados foram digeridos com *Apal* (Fermentas Life Sciences) por 2h à 37°C, produzindo fragmentos de 740 pb para o “alelo selvagem” (alelo “A”), ou 515 pb e 225 pb no caso do variante polimórfico (alelo “b”). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e visualizados por coloração de prata.

Polimorfismo FokI (rs 10735810)

Os genótipos para o polimorfismo *FokI* no exon 2 foram determinados por PCR usando os primers: 5'-GATGCCAGCTGGCCCTGGCACTG-3' e 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3' (Curran *et al.*, 1999). A reação de PCR foi realizada em um volume de 25 µl contendo 0,20 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, o tampão de PCR 1X fornecido pela Invitrogen Corporation (10 mM Tris-HCl, pH 8,8, 50 mM KCl), 2,0 mM MgCl₂, e 2,5 U de DNA Taq polimerase (Biosystems). As condições de corrida foram: predesnaturação à 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 min, anelamento à 69°C por 30s e extensão à 72°C por 30s. Finalmente, a extensão foi conduzida à 72°C por 3 min. Os produtos amplificados foram digeridos com *FokI* (Fermentas Life Sciences) por 3 h à 55°C, produzindo fragmentos de 272 pb para o “alelo selvagem” (alelo “F”), ou 198 pb e 74 pb no caso do variante polimórfico (alelo “f”). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e visualizados por coloração de prata.

Análise estatística

A normalidade da distribuição de todas variáveis contínuas foram analisadas, com o objetivo de selecionar o melhor método estatístico. Visto que a distribuição da concentração de chumbo não foi normal, utilizamos o teste não paramétrico de Mann Whitney para fazer todas as comparações de concentração de chumbo nos fluidos e esmalte dental. Valores de chumbo abaixo do limite de detecção (LD) foram eliminados da análise dos dados.

Devido o grande número de amostras com quantidades muito baixas de chumbo, próximas ao limite inferior em que o grau de incerteza da dosagem aumenta, algumas comparações foram realizadas excluindo as amostras do primeiro quartil de concentração de chumbo (acima de 58,8 µg/g para a primeira e acima de 13,8 µg/g para a segunda microbiópsia em decíduos e acima de 165,1 µg/g para a primeira e acima de 53,4 µg/g para a segunda microbiópsia em permanentes).

Para a análise das correlações, a concentração de chumbo no sangue, soro e esmalte dental foram transformadas em $\log_{10}$, com o objetivo de normalizar os dados, e o coeficiente de correlação de Pearson (r , p) foi calculado. Para a realização dessas análises, as crianças foram agrupadas, de acordo com a concentração de chumbo no sangue, em < 4 µg/dL e ≥ 4 µg/dL e de acordo com a concentração de chumbo no esmalte, em < 400 µg/g e ≥ 400 µg/g.

O nível de significância utilizado em cada uma das estatísticas foi de 0,05 e a análise estatística foi realizada com o Programa Graph Pad Prism (Versão 3.0).

4 RESULTADOS

4.1 Concentração de chumbo no sangue

A concentração de chumbo no sangue total foi analisada em 444 crianças, sendo que 199 (45%) eram meninos e 245 (55%) meninas. Esta concentração variou de 0,2 µg/dL a 9,4 µg/dL e teve como a mediana 2,1 µg/dL. Nenhuma criança apresentou nível de chumbo no sangue ≥ 10 µg/dL e 10 % delas (n=44) exibiram chumbo $\geq 4,0$ µg/dL. A figura 7 mostra a distribuição das crianças de acordo com o chumbo no sangue.

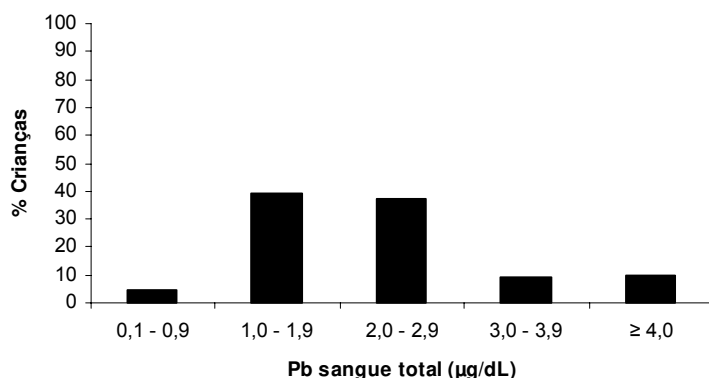
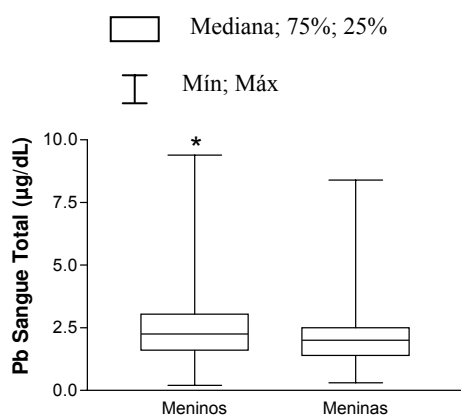


Figura 7: Distribuição da concentração de chumbo no sangue (µg/dL) nas crianças analisadas em Ribeirão Preto, SP, 2008 (n=444).

Quando separamos a concentração de chumbo por sexo, verificamos que a mediana foi maior para os meninos (2,3 µg/dL) do que para as meninas (2,0 µg/dL), sendo que essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,0003$) (Figura 8).



* $p=0,003$

Figura 8: Concentração de chumbo no sangue (µg/dL) de 199 meninos e 245 meninas de Ribeirão Preto, SP, 2008 (n=444).

4.2 Concentração de chumbo no soro

Vinte e uma amostras foram excluídas do estudo devido a óbvia contaminação pelo chumbo presente nos eritrócitos, verificada visualmente por meio da cor avermelhada do soro. A mediana da concentração de chumbo foi 0,4 µg/L e os níveis variaram de < Limite de Detecção (LD) (< 0,03 µg/L; n= 193) a 2,6 µg/L. As amostras < LD foram excluídas. Figura 9 mostra a distribuição das crianças de acordo com o chumbo no soro.

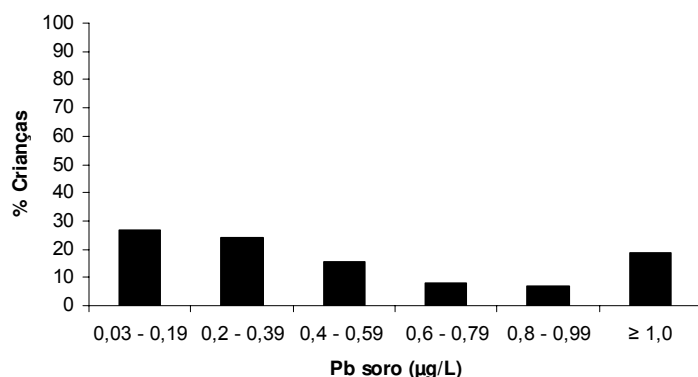


Figura 9: Distribuição da concentração de chumbo no soro (µg/L) nas crianças analisadas em Ribeirão Preto, SP, 2008 (n=230).

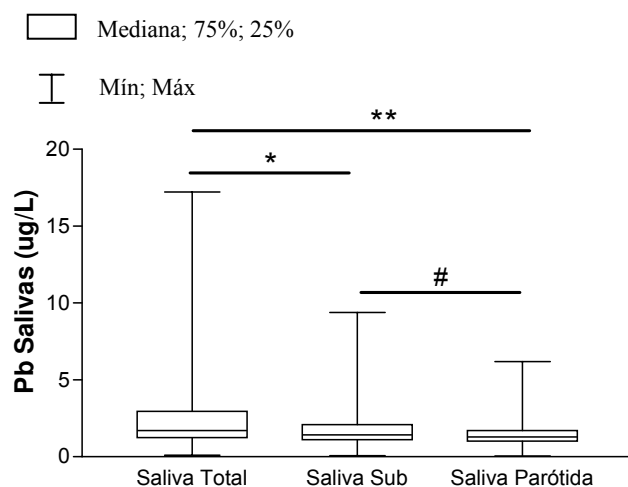
4.3 Concentração de chumbo nas salivas

A concentração de chumbo foi analisada em 255 amostras de saliva total e 444 amostras de saliva sub e parótida. Durante o decorrer do estudo, verificamos que as concentrações de chumbo eram muito mais altas na saliva total do que nos outros tipos de saliva, provavelmente devido a contaminação por componentes como, por exemplo, restos alimentares. Por isso, essa saliva parou de ser coletada, o que explica o menor número de amostra.

Os níveis de chumbo variaram de 0,1 µg/L a 17,2 µg/L, com mediana de 1,7 µg/L para a saliva total; < LD (< 0,02 µg/L, n= 31) a 9,4 µg/L, com mediana de 1,4 µg/L para a saliva sub; e < LD (n= 80) a 6,2 µg/L, como mediana de 1,3 µg/L para a saliva parótida.

Houve uma diferença estatisticamente significativa quando a quantidade de chumbo entre as salivas total e sub ($p < 0,0001$), total e parótida ($p < 0,0001$) e sub e parótida ($p = 0,017$) foram comparadas. A Figura 10 mostra a mediana e concentrações mínimas e máximas de chumbo nos diferentes tipos de saliva dos mesmos indivíduos.

Foram testadas as correlações de chumbo entre as 3 salivas. Os coeficientes de correlação foram: $r = 0,22$, $p = 0,0009$, entre saliva total e sub; $r = 0,24$; $p < 0,0001$, entre saliva total e parótida e $r = 0,49$; $p < 0,0001$, entre saliva sub e parótida (dados não mostrados).



*; ** $p < 0,0001$; # $p = 0,017$

Figura 10: Concentração de chumbo nas salivas (n=255) (µg/L): total, sub e parótida, Ribeirão Preto, SP, 2008.

4.4 Concentração de chumbo no esmalte dental e profundidade de microbiópsia

A mediana da profundidade de microbiópsia encontrada para os dentes decíduos foi de 3,1 µm (variação, 0,4 a 10,0) e 3,9 µm (variação, 0,2 a 11,4) para a primeira e segunda microbiópsias, respectivamente. Para os permanentes, a mediana foi de 2,9 µm (variação, 0,1 a 11,6) e 3,1 µm (0,2 a 11,0) para a primeira e segunda microbiópsias, respectivamente. Uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada apenas nos dentes decíduos, entre as profundidades da primeira e segunda microbiópsias.

A mediana da concentração de chumbo para os dentes decíduos foi de 109,3 µg/g na primeira microbiópsia e 45,0 µg/g na segunda. Para os permanentes a mediana foi de 308,3 µg/g para a primeira e 99,7 µg/g para a segunda microbiópsia.

A porcentagem de crianças com valores de chumbo ≥ 400 µg/g em cada microbiópsia sucessiva foi de 9% (n= 35) e 3% (n= 12) para a primeira e segunda

microbiópsias nos decíduos, respectivamente, e 33% (n= 92) e 7% (n= 18) para a primeira e segunda microbiópsias nos permanentes.

As figuras 11 e 12 exibem a distribuição das crianças no eixo x, permitindo a melhor visualização da concentração de chumbo no esmalte no eixo y, nos dentes decíduos e permanentes, respectivamente.

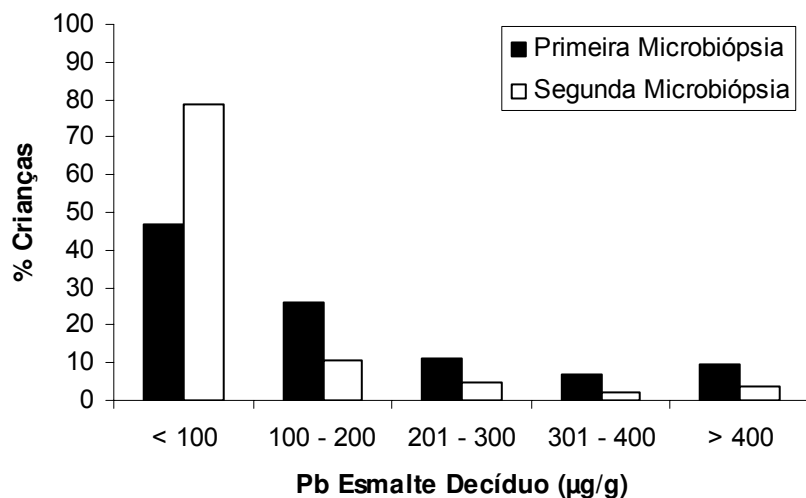


Figura 11: Distribuição da concentração de chumbo na primeira (n=395) e segunda (n=387) microbiópsias em esmalte dental de dentes decíduos (µg/g), Ribeirão Preto, SP, 2008.

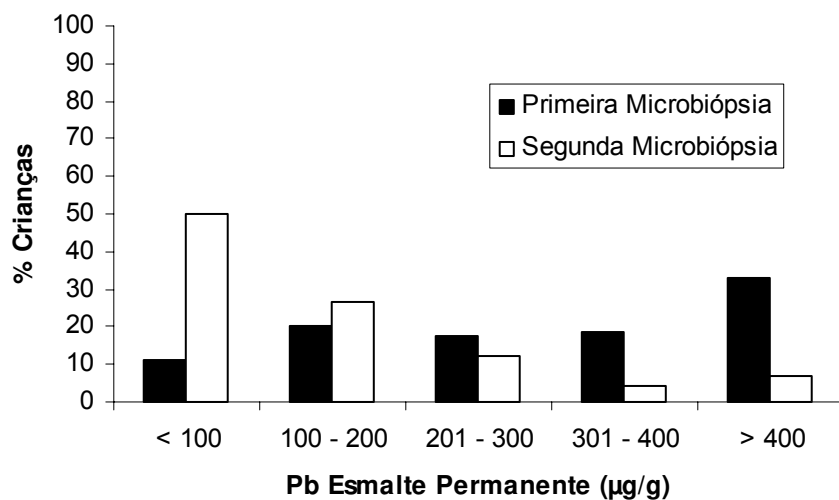
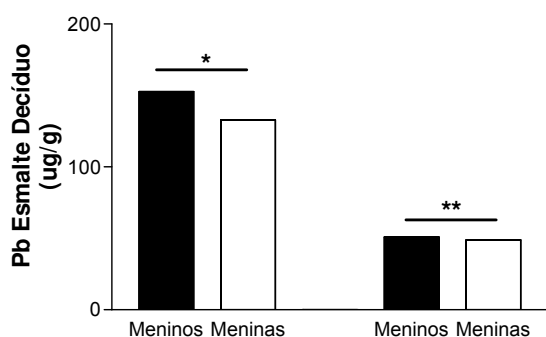


Figura 12: Distribuição da concentração de chumbo na primeira (n=279) e segunda (n=261) microbiópsias em esmalte dental de dentes permanentes (µg/g), Ribeirão Preto, SP, 2008.

Quando separamos a concentração de chumbo presente no esmalte dental por sexo, verificamos que não há diferença entre os sexos quanto à concentração de chumbo quando todas as amostras são incluídas na análise ($p= 0,62$ e $p= 0,56$ para primeira e segunda microbiópsias respectivamente, em decíduos e $p= 0,13$ e $p= 0,70$ para primeira e segunda microbiópsias, em permanentes).

Quando comparamos as amostras, excluindo as concentrações de chumbo do primeiro quartil, o resultado foi uma diferença estatisticamente significativa da concentração de chumbo entre os sexos para a primeira ($p= 0,01$), e para a segunda ($p= 0,06$) microbiópsia em dentes decíduos (figura 13) e para os dentes permanentes, não houve diferença estatisticamente significativa ($p= 0,17$ para a primeira e $p= 0,09$ para a segunda microbiópsia) (figura 14).



* $p= 0,01$; ** $p= 0,06$

Figura 13: Média e desvio padrão da concentração de chumbo no esmalte dental decíduo ($\mu\text{g/g}$) de acordo com o sexo, nas microbiópsias com valores de chumbo dos 3º e 4º quartis, Ribeirão Preto, SP, 2008.

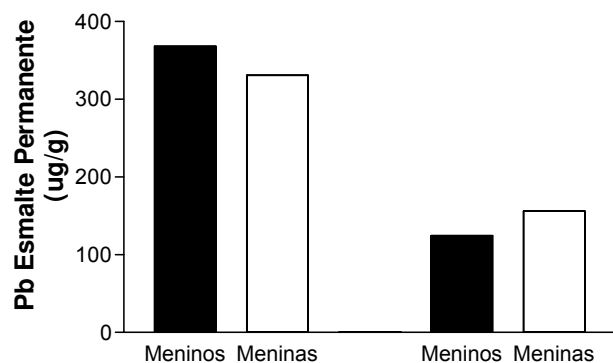


Figura 14: Média e desvio padrão da concentração de chumbo no esmalte dental permanente ($\mu\text{g/g}$) de acordo com o sexo, nas microbiópsias com valores de chumbo dos 3º e 4º quartis, Ribeirão Preto, SP, 2008.

As concentrações de chumbo foram diferentes entre as microbiópsias. Os dentes permanentes apresentaram maior quantidade de chumbo no esmalte dental quando comparados com os decíduos, tanto na primeira quanto na segunda microbiópsias. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

A concentração de chumbo na primeira microbiópsia, tanto para os decíduos quanto para os permanentes, foi, respectivamente, 2,5 e 3,1 vezes maior do que na segunda. Em ambos os grupos de dentes, quando os níveis de chumbo da primeira microbiópsia foram comparados com os da segunda, a diferença também foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). A presença de um gradiente de concentração do metal, que decresce a partir da superfície do esmalte em direção ao seu interior, é a razão desta diferença.

A profundidade de microbiópsia é um parâmetro importante quando a utilizamos para determinação dos níveis de chumbo no esmalte dental, em função do gradiente de concentração citado acima. As figuras 15 e 16 apresentam o valor do $\log_{10}$ da concentração de chumbo *versus* a profundidade de microbiópsia nos dentes decíduos e permanentes, respectivamente. Para os dentes decíduos, a análise da correlação de Pearson revelou um coeficiente de -0,41 ($p < 0,0001$) para a primeira microbiópsia e -0,54 ($p < 0,0001$) para a segunda. Para os permanentes, o coeficiente de correlação foi de -0,49 ($p < 0,0001$) para a primeira e -0,55 ($p < 0,0001$) para a segunda microbiópsia.

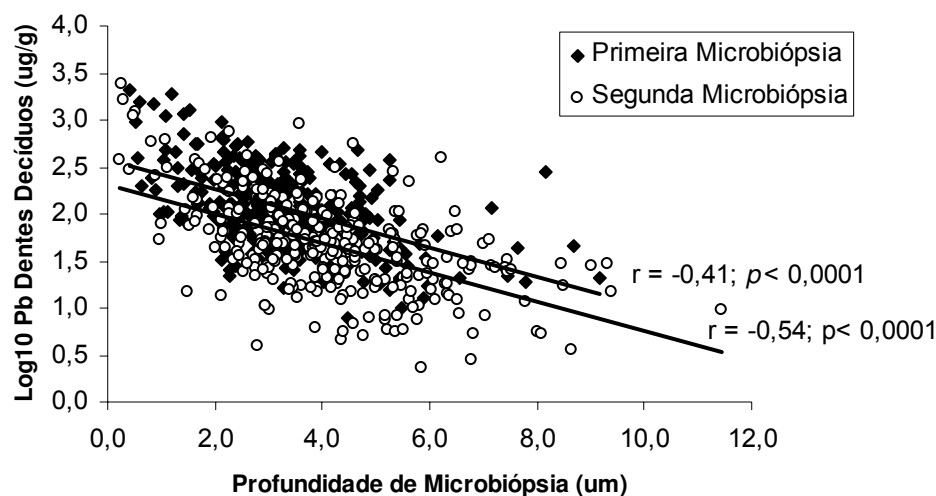


Figura 15: $\log_{10}$ da concentração de chumbo *versus* profundidade de microbiópsia na primeira ($n = 395$) e segunda ($n = 387$) microbiópsias em dentes decíduos, Ribeirão Preto, SP, 2008.

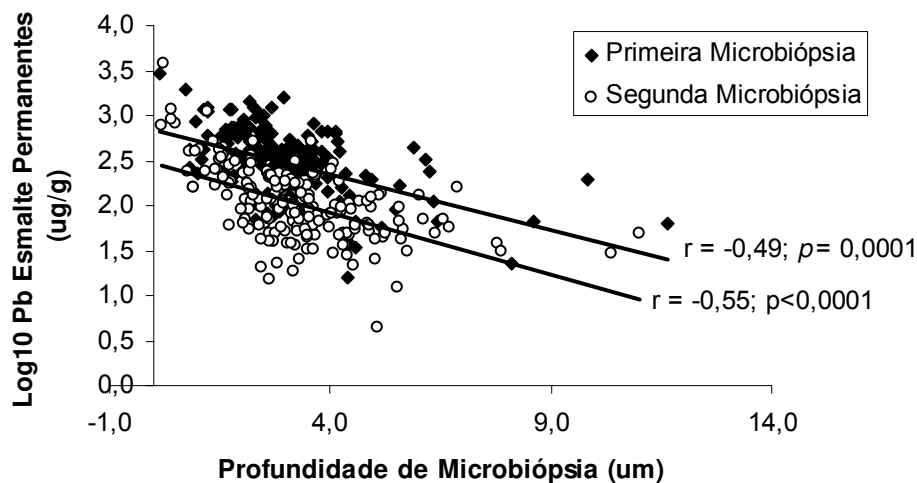


Figura 16: Log₁₀ da concentração de chumbo *versus* profundidade de microbiópsia na primeira (n=279) e segunda (n=261) microbiópsias em dentes permanentes, Ribeirão Preto, SP, 2008.

A concentração de chumbo na primeira microbiópsia se correlaciona positivamente com a concentração do metal na segunda microbiópsia. O coeficiente de correlação de Pearson foi 0,64 ($p < 0,0001$) e 0,53 ($p < 0,0001$), para os decíduos e permanentes, respectivamente (figura 17).

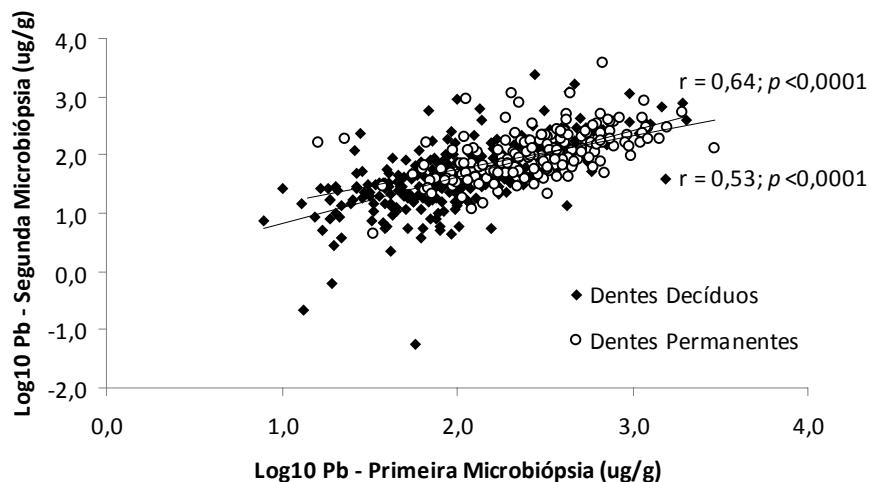


Figura 17 Log₁₀ da concentração de chumbo na primeira microbiópsia *versus* Log₁₀ da concentração de chumbo segunda microbiópsia nos dentes decíduos (n= 387) e permanentes (n=271), Ribeirão Preto, SP, 2008.

A correlação entre as concentrações de chumbo nos dentes decíduos e permanentes mostrou os seguintes coeficientes de correlação: 0,36 ($p < 0,0001$) e 0,43 ($p < 0,0001$) para correlação entre a primeira microbiópsia do decíduo e primeira do permanente, e segunda microbiópsia do decíduo com a segunda do permanente, respectivamente. As correlações entre a primeira microbiópsia do dente decíduo e segunda microbiópsia do permanente e, segunda microbiópsia do decíduo e primeira do permanente também foram averiguadas. Os coeficientes de correlação foram, respectivamente 0,34 ($p < 0,0001$) e 0,28 (0,0005).

4.5 Correlações

4.5.1 Correlação entre sangue e soro

Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre o chumbo no sangue e chumbo no soro, para o grupo de crianças $< 4 \mu\text{g/dL}$ ($r = -0,07$; $p = 0,31$), o mesmo ocorrendo para o grupo de crianças que apresentou chumbo no sangue total $\geq 4 \mu\text{g/dL}$ ($r = -0,14$; $p = 0,45$), como mostra a figura 18.

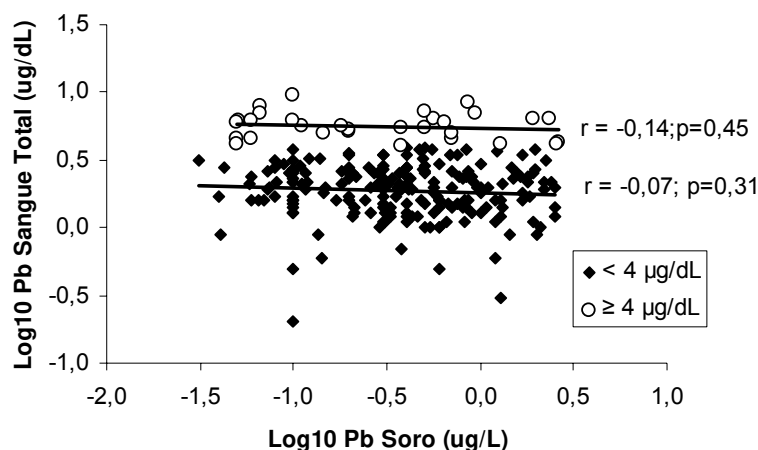


Figura 18: Log₁₀ da concentração de chumbo no sangue total *versus* Log₁₀ da concentração de chumbo no soro, em relação aos grupos $< 4 \mu\text{g/dL}$ ($n = 194$) e $\geq 4 \mu\text{g/dL}$ ($n = 36$), Ribeirão Preto, SP, 2008.

4.5.2 Correlação entre sangue/ soro e salivas

Quando correlacionamos a concentração de chumbo no sangue total *versus* sua concentração nos 3 tipos de saliva no grupo de crianças $< 4 \mu\text{g/dL}$, encontramos uma

correlação fraca e não significativa, o que é mostrado na figura 19. O coeficiente de correlação de Pearson foi 0,06 ($p=0,38$) para a saliva total, 0,004 ($p=0,94$) para a saliva sub e 0,05 ($p=0,42$) para a saliva parótida.

Para o grupo de crianças $\geq 4 \mu\text{g/dL}$, a correlação entre a concentração de chumbo no sangue e as salivas total, sub e parótida também foi fraca, com coeficiente de correlação de Pearson, respectivamente, de -0,18 ($p=0,41$); 0,09 ($p=0,62$) e 0,20 ($p=0,26$).

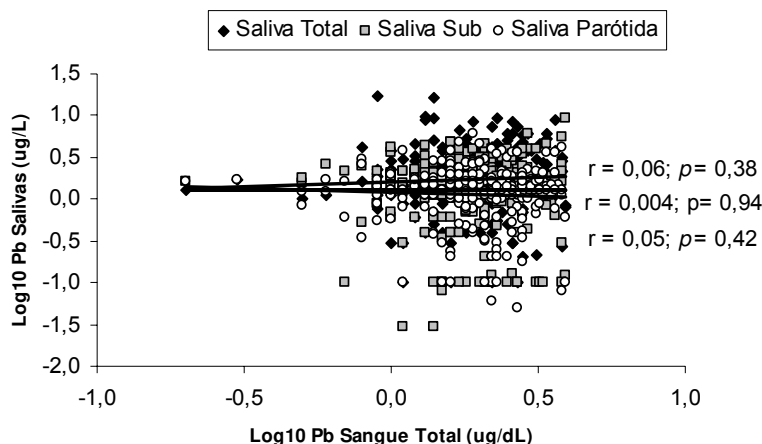


Figura 19: Log₁₀ da concentração de chumbo no sangue total *versus* Log₁₀ da concentração de chumbo nas salivas total, sub e parótida, em relação ao grupo $< 4 \mu\text{g/dL}$, Ribeirão Preto, SP, 2008.

Pelo fato de alguns autores afirmarem que o chumbo na saliva é a excreção direta da fração do metal não ligado a proteínas do plasma (Omokhodion & Crockford, 1991; Barbosa *et al.*, 2005), realizamos a correlação entre chumbo no soro e chumbo nas diferentes salivas.

A concentração de chumbo no soro *versus* sua concentração nas salivas total, sub e parótida, no grupo de crianças $< 4 \mu\text{g/dL}$, apresentou uma correlação fraca (figura 20). O coeficiente de correlação de Pearson foi 0,07 ($p=0,40$) para a saliva total; 0,14 ($p=0,07$) para a saliva sub e 0,16 ($p=0,06$) para a saliva parótida.

Para o grupo de crianças $\geq 4 \mu\text{g/dL}$, houve uma correlação positiva, porém fraca e não significativa entre a concentração de chumbo no sangue e salivas total ($r=0,21$; $p=0,35$), sub ($r=0,20$; $p=0,31$) e parótida ($r=0,25$; $p=0,22$).

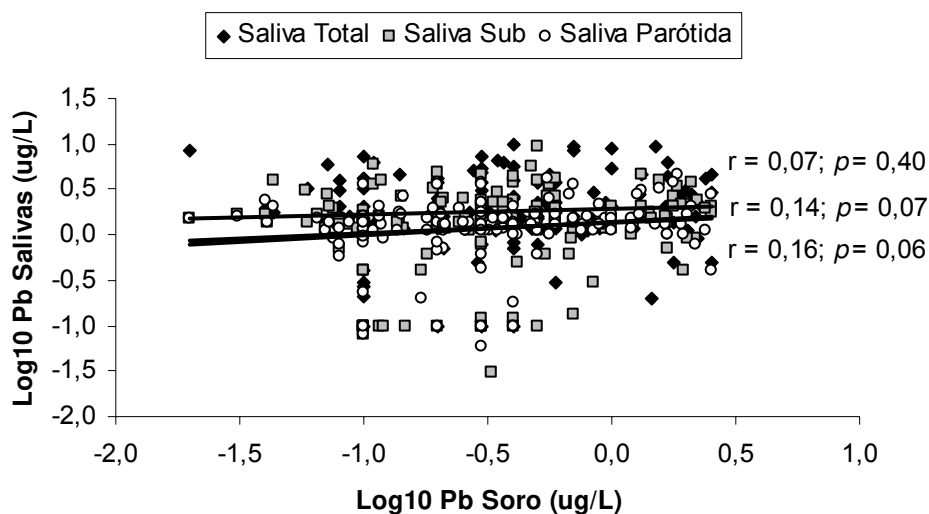


Figura 20: Log₁₀ da concentração de chumbo no soro *versus* Log₁₀ da concentração de chumbo nas salivas total, sub e parótida, em relação ao grupo < 4 µg/dL, Ribeirão Preto, SP, 2008.

4.5.3 Correlação entre sangue total e esmalte

Quando correlacionamos a concentração de chumbo no sangue total *versus* sua concentração no esmalte dental decíduo e permanente, das crianças de ambos os grupos (< 4 µg/dL e ≥ 4 µg/dL), encontramos uma correlação fraca e não significativa, o que é mostrado nas figuras 21 e 22.

Para os decíduos, os coeficientes de correlação de Pearson foram 0,03 ($p=0,43$) para o grupo < 4 µg/dL e 0,17 ($p=0,20$) para o grupo ≥ 4 µg/dL. Para os permanentes, os coeficientes de correlação de Pearson foram 0,02 ($p=0,69$) para o grupo < 4 µg/dL e 0,06 ($p=0,72$) para o grupo ≥ 4 µg/dL.

A correlação entre a concentração de chumbo no sangue e no esmalte decíduo e permanente, de crianças que apresentaram chumbo ≥ 400 µg/g no esmalte, mostrou um coeficiente de correlação de -0,09 ($p=0,59$) e 0,09 ($p=0,44$), respectivamente.

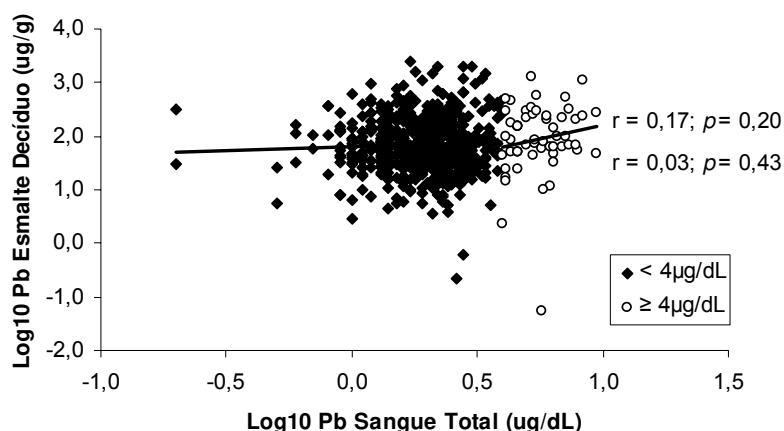


Figura 21: Log₁₀ da concentração de chumbo no sangue total *versus* Log₁₀ da concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos, em relação aos dois grupos ($\geq 4 \mu\text{g/dL}$ e $\geq 4 \mu\text{g/dL}$), Ribeirão Preto, SP, 2008.

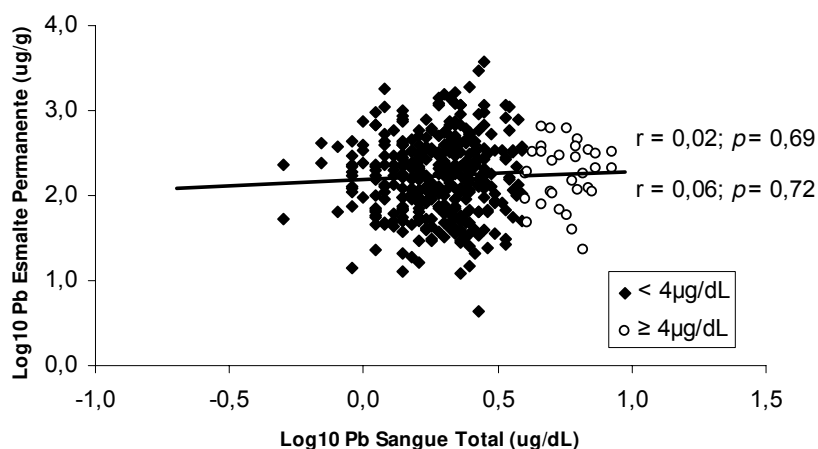


Figura 22: Log₁₀ da concentração de chumbo no sangue total *versus* Log₁₀ da concentração de chumbo no esmalte de dentes permanentes, em relação aos dois grupos ($\geq 4 \mu\text{g/dL}$ e $\geq 4 \mu\text{g/dL}$), Ribeirão Preto, SP, 2008.

4.5.4 Correlação entre soro/salivas e esmalte

Quando correlacionamos a concentração de chumbo entre esmalte dental e soro, para os decíduos, os coeficientes de correlação de Pearson foram 0,22 ($p < 0,0001$) para o grupo $< 4 \mu\text{g/dL}$ e 0,19 ($p = 0,16$) para o grupo $\geq 4 \mu\text{g/dL}$ (figura 23). Para os permanentes, os coeficientes de correlação foram 0,27 ($p < 0,0001$) para o grupo $< 4 \mu\text{g/dL}$ e -0,13 ($p = 0,48$) para o grupo $\geq 4 \mu\text{g/dL}$ (figura 24).

A correlação entre a concentração de chumbo no soro e no esmalte decíduo e permanente, de crianças que apresentaram chumbo $\geq 400 \mu\text{g/g}$ no esmalte, mostrou uma correlação positiva e significativa, com coeficiente de correlação de 0,65 ($p < 0,0001$) e 0,51 ($p < 0,0001$), respectivamente (figura 25).

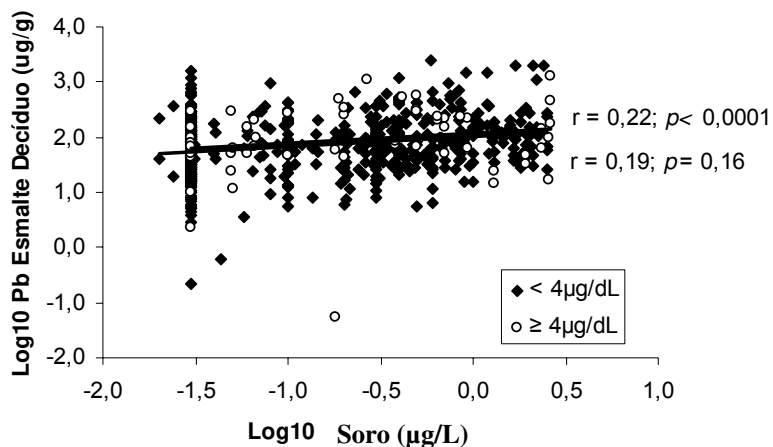


Figura 23: Log₁₀ da concentração de chumbo no soro *versus* Log₁₀ da concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos, em relação aos dois grupos ($\geq 4 \mu\text{g/dL}$ e $\geq 4 \mu\text{g/dL}$), Ribeirão Preto, SP, 2008.

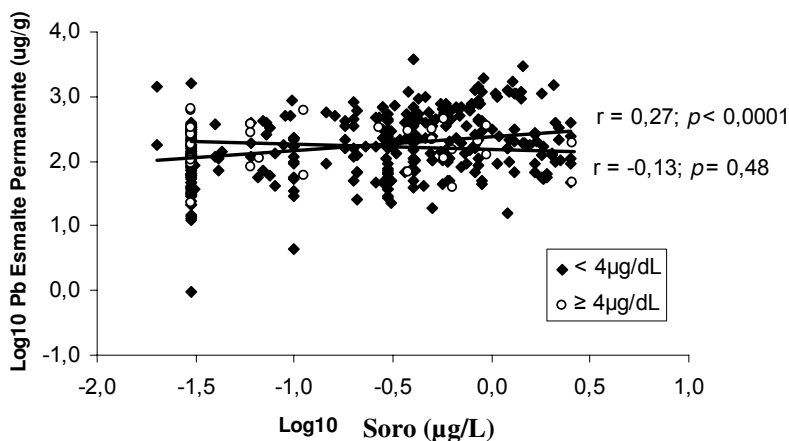


Figura 24: Log₁₀ da concentração de chumbo no sangue total *versus* Log₁₀ da concentração de chumbo no esmalte de dentes permanentes, em relação aos dois grupos ($\geq 4 \mu\text{g/dL}$ e $\geq 4 \mu\text{g/dL}$), Ribeirão Preto, SP, 2008.

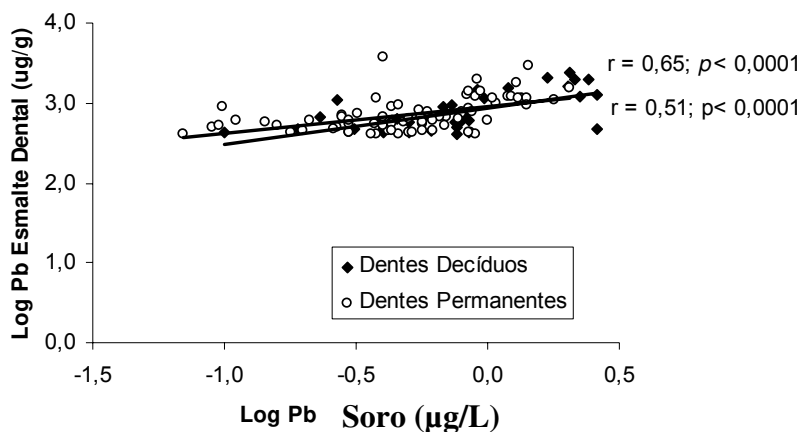


Figura 25: Log₁₀ da concentração de chumbo no soro *versus* Log₁₀ da concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos (n=39) e permanentes (n=75), utilizando apenas amostras com chumbo no esmalte ≥ 400 µg/g, Ribeirão Preto, SP, 2008.

A correlação negativa entre a concentração de chumbo no esmalte e na saliva total mostrou-se fraca e sem significância, com coeficiente de correlação de -0,04 ($p = 0,36$) e -0,09 ($p = 0,11$) para os decíduos e permanentes, respectivamente (figura 26). O mesmo aconteceu para as salivas sub e parótida, as quais apresentaram coeficientes de correlação de Pearson, respectivamente, de -0,06 ($p = 0,14$) e -0,04 ($p = 0,50$) para os decíduos, e -0,09 ($p = 0,10$) e 0,02 ($p = 0,67$) para os permanentes (figuras 27 e 28).

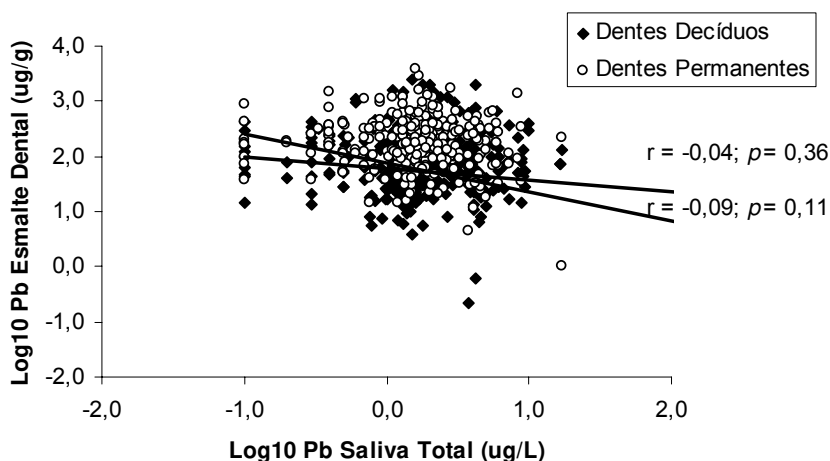


Figura 26: Log₁₀ da concentração de chumbo na saliva total *versus* Log₁₀ da concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos e permanentes, Ribeirão Preto, SP, 2008.

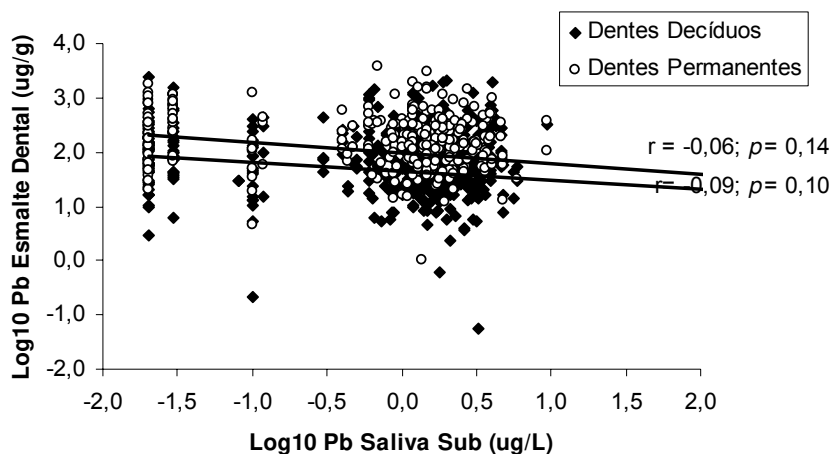


Figura 27: Log₁₀ da concentração de chumbo na saliva sub *versus* Log₁₀ da concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos e permanentes, Ribeirão Preto, SP, 2008.

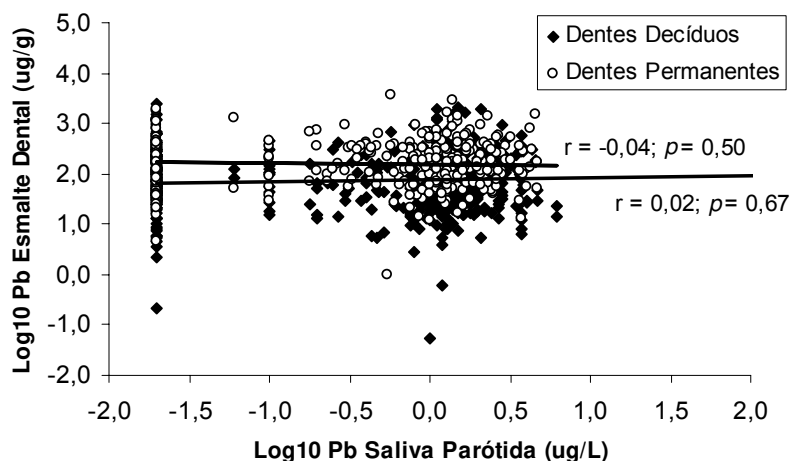


Figura 28: Log₁₀ da concentração de chumbo na saliva parótida *versus* Log₁₀ da concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos e permanentes, Ribeirão Preto, SP, 2008.

A correlação entre a concentração de chumbo nas salivas no esmalte decíduo e permanente, de crianças que apresentaram chumbo $\geq 400 \mu\text{g/g}$ no esmalte, mostrou correlações fracas e não significantes. As salivas total, sub e parótida apresentaram, respectivamente, coeficientes de correlação de: 0,22 ($p = 0,23$); 0,06 ($p = 0,73$) e 0,07 ($p = 0,70$) para os dentes decíduos e -0,04 ($p = 0,78$); -0,06 ($p = 0,66$) e 0,12 ($p = 0,35$) para os permanentes.

4.6 Parâmetros hematológicos

Cento e duas crianças (23%) apresentaram anemia, ou seja, valor de hemoglobina abaixo de 11,5 g/dL (valor de referência: 11,5 - 15,0 g/dL, segundo a OMS, 2001). A concentração de ferritina sérica foi utilizada para verificar a deficiência de ferro. O valor de referência deste parâmetro para crianças (OMS, 2001) é $> 15,0$ ng/dL.

Das crianças com anemia, dezenove (18%) apresentaram níveis de ferritina abaixo desse valor (anemia ferropriva), dezesseis (16%) apresentaram hemoglobinopatia (traço talassêmico para β talassemia) e sessenta e sete (66%) não tinham uma etiologia conhecida para o valor baixo de hemoglobina. Além disso, onze crianças exibiram valores de hemoglobina $> 11,5$ g/dL, mas apresentaram deficiência de ferro (ferritina $< 15,0$ ng/dL).

As crianças com anemia de etiologia conhecida foram excluídas das comparações. Estudos demonstram que o status nutricional afeta a absorção de chumbo, a qual é maior quando há deficiência de ferro, por isso, as crianças sem valores de hemoglobina $< 11,5$ g/dL, mas com ferritina $< 15,0$ ng/dL, também foram excluídas das comparações.

Não houve diferença na concentração de hemoglobina entre os sexos ($p= 0,47$). A média (desvio padrão) da concentração de hemoglobina nas meninas e nos meninos foi de 11,9 g/dL ($\pm 0,78$) e 12,0 g/dL ($\pm 1,12$), respectivamente.

A concentração de chumbo nos diferentes fluidos e no esmalte dental decíduo e permanente foi maior no grupo de crianças com anemia do que no grupo sem anemia. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. A tabela 3 sumariza os dados da mediana da concentração de chumbo nos diferentes fluidos e esmalte de crianças com anemia e sem anemia.

Tabela 3 – Mediana da concentração de chumbo no sangue total, soro e esmalte dental decíduo e permanente de crianças com e sem anemia, Ribeirão Preto, 2008.

	Anemia	Sem anemia	<i>p</i>
Sangue Total (µg/dL)	2,1	1,9	0,56
Soro (µg/L)	0,09	0,07	0,63
1ª MD* (µg/g)	130,8	101,5	0,10
2ª MD** (µg/g)	52,1	43,2	0,09
1ª MP† (µg/g)	339,7	306,8	0,36
2ª MP†† (µg/g)	107,7	98,6	0,64

* Primeira Microbiópsia em esmalte decíduo; ** Segunda Microbiópsia em esmalte decíduo; † Primeira Microbiópsia em esmalte permanente; †† Segunda Microbiópsia em esmalte permanente.

4.7 Polimorfismos genéticos

ALAD

As crianças apresentaram a seguinte distribuição para os genótipos do polimorfismo da ALAD: 242 sujeitos com o genótipo ALAD 1-1 (86%), 38 com o genótipo ALAD 1-2 (14%) e nenhum com o genótipo ALAD 2-2 (0%).

Sujeitos com o genótipo ALAD 1-1 mostram somente um fragmento de 582 pb e sujeitos com o genótipo ALAD 1-2 mostraram fragmentos de 582 pb e 511 pb (Figura 29).

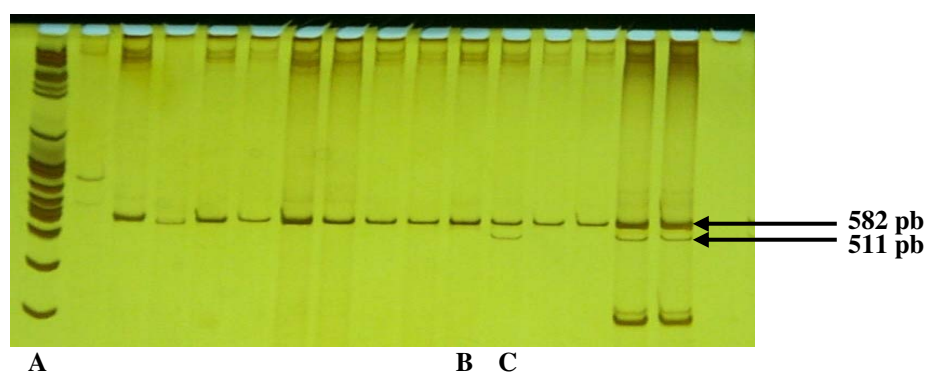


Figura 29: Genótipos do polimorfismo da ALAD. Lanes A, B e C: Padrão DNA de 100 pb (“Ladder”), Genótipo ALAD 1-1 e ALAD 1-2, respectivamente.

A tabela 4 apresenta as medianas e concentrações mínimas e máximas do chumbo presente nos biomarcadores de dose interna estudados, além dos parâmetros de células sangüíneas, em relação ao polimorfismo da ALAD.

Houve uma tendência da concentração de chumbo ser maior nos indivíduos com o genótipo ALAD 1-2 em todos os parâmetros analisados, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Tabela 4 – Comparação entre as medianas das concentrações de hemoglobina e concentrações de chumbo no sangue, soro e esmalte dental entre os genótipos do polimorfismo da ALAD, Ribeirão Preto, 2008.

	ALAD 1-1	ALAD 1-2	<i>p</i>
	n= 242	n= 38	
Sangue Total (µg/L)	2,1	2,2	0,50
Soro (µg/L)	0,24	0,25	0,81
Hemoglobina (g/dL)	12,0	12,2	0,50
Esmalte Decíduo (µg/g)	56,0	82,9	0,08
Esmalte Permanente (µg/g)	220,3	253,2	0,70

VDR

As tabelas 5, 6 e 7 apresentam a mediana e as concentrações mínimas e máximas de chumbo presentes nos biomarcadores de dose interna estudados, além dos valores de hemoglobina, em relação aos polimorfismos *BsmI*, *ApaI* e *FokI*, respectivamente.

As seguintes distribuições para os genótipos dos polimorfismos de gene receptor da Vitamina D foram encontradas nos 280 indivíduos de que se tinha DNA:

1) ***BsmI***: 54 sujeitos com o genótipo BB (19%), 123 com o genótipo Bb (44%) e 103 com o genótipo bb (37%). As crianças o genótipo BB mostraram somente um fragmento de 825 pb, com o genótipo Bb, fragmentos de 825 pb, 650 pb e 175 pb e com o genótipo bb,

fragmentos de 650 pb e 175 pb (Figura 30). Geralmente, os fragmentos de 175 pb saem do gel durante sua corrida.

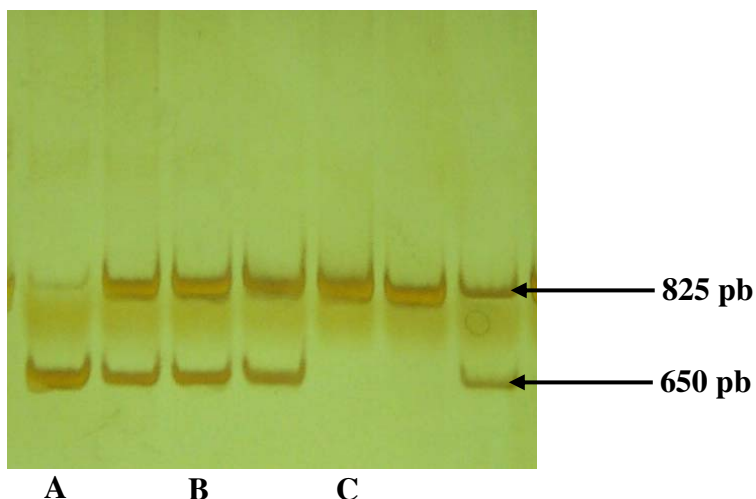


Figura 30: Genótipos do polimorfismo do *BsmI*. Lanes A, B e C: Genótipo aa; Aa e AA, respectivamente.

Tabela 5 – Comparação entre as medianas das concentrações de hemoglobina e concentrações de chumbo no sangue, soro e esmalte dental entre os genótipos do polimorfismo *BsmI*, Ribeirão Preto, 2008.

	BB	Bb	bb	
	n= 54	n= 123	n= 103	p
Sangue Total (µg/L)	2,6	2,4	2,1	0,24
Soro (µg/L)	0,20	0,27	0,20	0,29
Hemoglobina (g/dL)	12,2	12,0	12,0	0,53
Esmalte Decíduo (µg/g)	55,9	59,5	49,1	0,52
Esmalte Permanente (µg/g)	169,8	134,3	116,3	0,42

2) *ApalI*: 96 sujeitos com o genótipo AA (34%), 124 com o genótipo Aa (44%) e 60 com o genótipo aa (22%). As crianças o genótipo AA apresentam somente um fragmento de 740 pb, com o genótipo Aa, fragmentos de 740 pb, 515 pb e 225 pb e com o genótipo b,

fragmentos de 515 pb e 225 pb (Figura 31). Geralmente, os fragmentos de 225 pb saem do gel durante sua corrida.

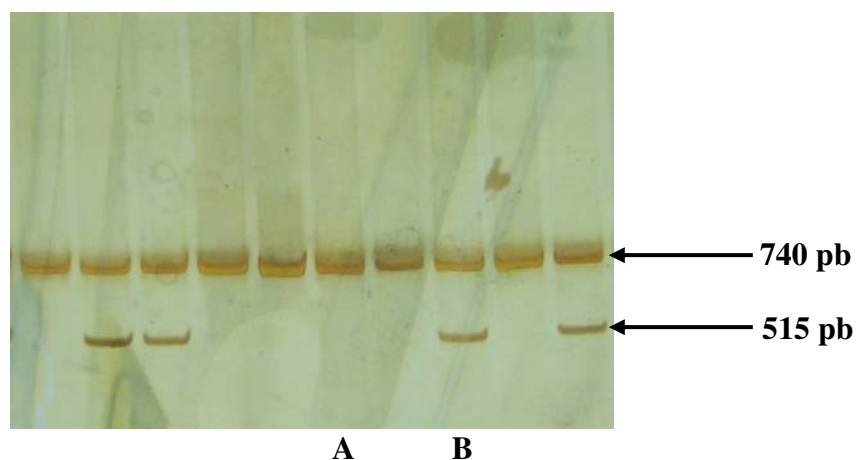


Figura 31: Genótipos do polimorfismo do *Apal*. Lanes A e B: Genótipo AA e Aa, respectivamente.

Tabela 6 – Comparação entre as medianas das concentrações de hemoglobina e concentrações de chumbo no sangue, soro e esmalte dental entre os genótipos do polimorfismo *Apal*, Ribeirão Preto, 2008.

	AA n= 96	Aa n=124	aa n=60	<i>p</i>
Sangue Total (µg/L)	2,6	2,4	2,2	0,24
Soro (µg/L)	0,19	0,28	0,17	0,57
Hemoglobina (g/dL)	12,0	12,3	12,1	0,76
Esmalte Decíduo (µg/g)	57,8	67,8	49,1	0,09
Esmalte Permanente (µg/g)	178,2	134,6	97,7	0,22

2) **FokI**: 100 sujeitos com o genótipo FF (36%), 147 com o genótipo Ff (52%) e 33 com o genótipo ff (12%). As crianças o genótipo FF mostraram somente um fragmento de 272 pb, com o genótipo Ff, fragmentos de 272 pb, 198 pb e 74 pb e com o genótipo ff, fragmentos de 198 pb e 74 pb (Figura 32).

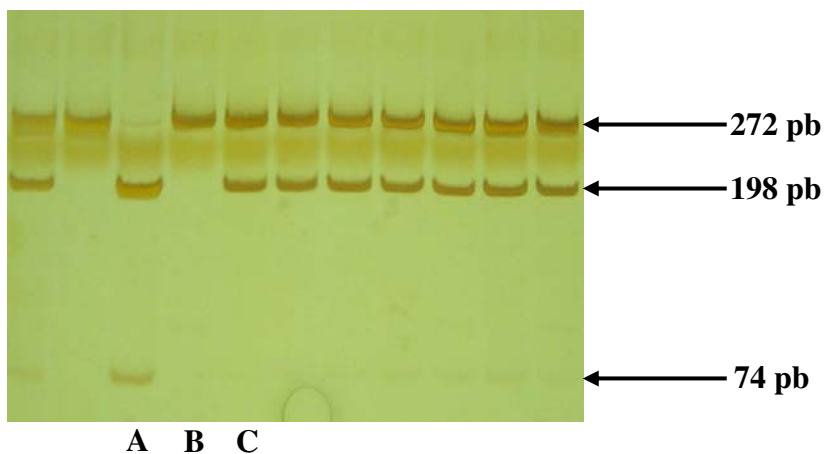


Figura 32: Genótipos do polimorfismo do *FokI*. Lanes A, B e C: Genótipo ff, FF e Ff, respectivamente.

Tabela 7 – Comparação entre as medianas das concentrações de hemoglobina e concentrações de chumbo no sangue, soro e esmalte dental entre os genótipos do polimorfismo *FokI* nos grupos $< 4 \mu\text{g/dL}$ e $\geq 4 \mu\text{g/dL}$, Ribeirão Preto, 2008.

	FF	Ff	ff	
	n= 100	n=147	n=33	<i>p</i>
Sangue Total ($\mu\text{g/L}$)	2,5	2,4	2,1	0,60
Soro ($\mu\text{g/L}$)	0,23	0,26	0,15	0,58
Hemoglobina (g/dL)	12,0	12,0	11,9	0,99
Esmalte Decíduo ($\mu\text{g/g}$)	63,8	55,4	46,9	0,24
Esmalte Permanente ($\mu\text{g/g}$)	173,7	126,9	82,5	0,23

5 DISCUSSÃO

5.1 Sangue e Soro

Este foi o primeiro estudo que determinou e correlacionou a concentração de chumbo em diferentes biomarcadores de dose interna em crianças não expostas. Nas amostras de sangue total, 100% das crianças apresentaram concentrações de chumbo abaixo do limite recomendado pelo CDC (1991), que é de 10 µg/dL. Do total, 10% delas exibiram níveis de chumbo entre 4,0 e 9,4 µg/dL.

Estudos realizados desde 1991 reforçam evidências de que o desenvolvimento físico e mental das crianças pode ser afetado quando elas apresentam concentrações de chumbo no sangue abaixo de 10 µg/dL (Binns *et al.*, 2008). Bellinger *et al.*, (1992) mostraram que entre crianças que apresentaram uma média de chumbo no sangue igual a 7 µg/dL aos 2 anos de idade, uma associação inversa significativa foi encontrada entre concentrações de chumbo no sangue e diminuição cognitiva e déficits na performance escolar aos 10 anos de idade, demonstrando também a persistência dos efeitos adversos do chumbo. Entre 4853 crianças com idades entre 6 e 16 anos (NHANES - National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000), o chumbo no sangue foi inversamente associado com 4 medidas da função cognitiva, mesmo quando a amostra estava restrita às crianças com concentrações menores que 5 µg/dL. (Lanphear *et al.*, 2000). Em subgrupos de 101 crianças, as quais possuíam concentração de chumbo no sangue < 10 µg/dL aos 6, 12, 18, 24, 36, 48 e 60 meses de idade, Canfield *et al.* (2003) encontraram uma associação significativa entre tal concentração e diminuição de QI nas idades de 3 e 5 anos. Chiodo *et al.* (2004) também reportaram uma associação inversa significativa entre função neuropsicológica e concentração do chumbo no sangue < 10 µg/dL. Surkan *et al.* (2007) avaliaram a associação entre níveis de concentração menores que 10 µg/dL e um amplo espectro de habilidades cognitivas de 534 crianças com idades entre 6-10 anos. Suas análises confirmaram estudos anteriores de que os níveis sanguíneos de chumbo <10 µg/dL estariam relacionados a uma cognição comprometida, especialmente ligada à atenção espacial e funções de execução.

De 2002 a 2004, um grupo de estudo do “CDC Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention” (ACCLPP) revisou a literatura científica relacionada aos

efeitos adversos para a saúde associados com concentração de chumbo no sangue < 10ug/dL. No relatório de 2005, o grupo concluiu que existia uma associação inversa entre concentração de chumbo no sangue e função cognitiva, com nenhuma evidência de uma associação mais fraca em populações com baixos níveis de chumbo no sangue (CDC, 2005).

Estes estudos sugerem que há uma necessidade de expandir o conhecimento a respeito da toxicidade do chumbo e também, de reconsiderar se as diretrizes atuais fornecem proteção adequada para crianças suscetíveis à intoxicação pelo metal.

Encontramos que a concentração de chumbo no sangue estava associada com o sexo, sendo mais alta em meninos do que em meninas. Esta maior concentração no sexo masculino é freqüentemente descrita na literatura para crianças da mesma faixa etária estudada (Roels *et al.*, 1980; Cleymaet *et al.*, 1991 c; Trepka *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1998; Paoliello *et al.*, 2002). Isto acontece, provavelmente, porque os meninos estão mais propensos a brincar fora de casa do que as meninas, o que os expõe mais à poeira.

Uma questão importante é o fato de termos conseguido tido a adesão de apenas metade das crianças (46%). Esse é um viés que pode ter levado a resultados diferentes da realidade de escolares de 6-8 anos matriculados nas escolas públicas do bairro Campos Elíseos de Ribeirão Preto. Como a criança somente podia participar do estudo mediante a assinatura do termo de consentimento pelos pais ou um responsável, e ainda assim a criança deveria permitir livremente a coleta de sangue (que era o único procedimento incômodo), somente os pais mais participativos, que foram às reuniões feitas nas escolas e cientes da importância do estudo permitiram a participação dos filhos. Além disso, os dados mostram uma exposição indevida na população de 6-8 anos, em região sem contaminação descrita, o que merece estudos mais aprofundados, principalmente na população de 1-3 anos, época em que as crianças apresentam as maiores concentrações de chumbo no sangue (Bellinger, 2004).

Em relação à concentração de chumbo no plasma, os estudos apresentam resultados variados (Everson & Patterson, 1980). Este fato deve-se, principalmente, aos métodos de coleta e de determinação de chumbo inapropriados. No entanto, a utilização de instrumentos analíticos mais sensíveis, especialmente a espectrometria de massa com

plasma indutivamente acoplado (ICPMS), tem resultado em determinações de chumbo no plasma com limites de detecção muito menores e com melhor precisão (Barbosa et al., 2005).

Resultados baseados na metodologia com ICPMS, Schutz *et al.* (1996) e Bergdahl *et al.* (1999) mostraram níveis de chumbo no plasma de 0,15 (variação de 0,1 a 0,3) $\mu\text{g/L}$ em adultos não expostos e 0,21 (variação de 0,14 a 0,38) $\mu\text{g/L}$, em crianças não expostas, o que está de acordo com os dados do presente estudo, no qual as concentrações de chumbo no soro variaram de $< 0,03$ a 2,6 $\mu\text{g/L}$, com mediana de 0,4 $\mu\text{g/L}$. Na literatura, há poucos trabalhos que determinaram chumbo no plasma de crianças, especialmente em crianças não expostas.

Em crianças expostas, Rosen *et al.* (1974) relataram concentrações de chumbo no plasma que variavam de 10 a 70 $\mu\text{g/L}$, e não encontraram correlação entre chumbo no plasma e chumbo no sangue, o qual variou de 20,0 a 136,0 $\mu\text{g/dL}$. Cavalleri *et al.* (1978) mostraram uma correlação entre chumbo no plasma (média= 6,2 $\mu\text{g/L}$) de 75 recém-nascidos (média da concentração de chumbo no sangue = 25,4 $\mu\text{g/dL}$) e os níveis de chumbo no plasma de suas mães, mas nenhuma correlação foi encontrada com a quantidade do metal nas hemácias.

Nossos resultados também não encontraram correlação entre concentração de chumbo no sangue e soro, nem para as crianças com chumbo no sangue $< 4 \mu\text{g/L}$ ($r = -0,07$; $p = 0,31$; $n = 194$), nem para aquelas com níveis $\geq 4 \mu\text{g/L}$ ($r = -0,14$; $p = 0,45$; $n = 36$). Talvez, se tivéssemos uma maior quantidade de crianças com concentrações mais altas de chumbo no sangue, a correlação fosse mais forte e significativa. Estes dados corroboram os estudos citados acima, apesar da grande diferença entre os valores da concentração de chumbo no plasma encontrados nesses estudos anteriores e os valores que encontramos no nosso, que são bem mais baixos. Em contrapartida, em um estudo envolvendo crianças expostas e não expostas, Bergdahl *et al.* (1999) encontraram uma correlação não-linear entre chumbo no sangue e chumbo no plasma: a razão Pb-sangue/Pb-plasma diminuía com o aumento do chumbo no plasma. Em adultos, essa mesma relação não-linear foi demonstrada em análises do chumbo no sangue total e plasma de trabalhadores expostos (Schutz *et al.*, 1996; Bergdahl *et al.*, 1997 b). Estes autores mostraram uma estreita e exponencial relação

entre os dois, na qual a porcentagem de chumbo presente no plasma aumentava com níveis crescentes de chumbo no sangue. Uma possível explicação para este aumento pode ser a saturação progressiva dos sítios de ligação com maior afinidade para chumbo nos eritrócitos, como por exemplo, a ALAD. Mantoan & Cook, (1984) também encontraram uma correlação curvilínea entre chumbo no soro e chumbo no sangue de adultos. No entanto, as concentrações de chumbo no plasma foram muito mais altas.

Essas concentrações relativamente mais altas do chumbo no plasma, relatadas na maioria dos estudos anteriores, podem ter outras explicações além dos problemas analíticos, como por exemplo, alto grau de hemólise ou mesmo contaminação das amostras (Schutz *et al.*, 1996).

Smith *et al.* (1998) mostraram que a contaminação exógena, a escolha do tubo de coleta e do anticoagulante e a presença de hemólise são fatores que contribuem significativamente para a variabilidade e viés nos resultados. De acordo com os autores, a hemólise pode levar a um aumento significativo da concentração de chumbo no plasma. Portanto, no presente estudo, as amostras de sangue, ao serem coletadas, eram imediatamente centrifugadas, para evitar a transferência do chumbo presentes nos eritrócitos para o soro. Além disso, amostras de plasma com óbvia contaminação pelos eritrócitos foram excluídas das análises dos dados. As amostras com ligeira coloração avermelhada foram mantidas, pois, de acordo com Schutz *et al.* (1996), amostras com ligeira coloração avermelhada não apresentaram concentrações de chumbo no plasma e sangue significativamente diferentes daquelas sem nenhuma hemólise visível.

A cinética da concentração do chumbo no plasma ainda não está bem caracterizada como está no sangue. Algumas variáveis, como por exemplo, o *status* nutricional da criança, podem afetar a relação Pb-plasma /Pb-sangue (Bergdahl *et al.*, 1999). Além disso, a escassez de trabalhos dificulta a comparação entre os estudos.

5.2 Saliva

Apesar de algumas desvantagens, como ausência de material de referência certificado e grande variação do fluxo salivar durante o dia, a saliva tem sido proposta por

alguns autores como um possível biomarcador de exposição ao chumbo (Silbergeld, 1993; Koh *et al.*, 2003; Nriagu *et al.*, 2006).

A especificação do método de coleta de saliva é importante, uma vez que variações na concentração de chumbo também dependem do modo de como a ela é coletada. No estudo de Brodeur *et al.* (1983), os sujeitos lavavam a boca com solução de ácido cítrico 3% para estimular o fluxo salivar antes da coleta. No método utilizado por Fung *et al.* (1975) e por Gonzalez *et al.* (1997), a criança mastigava um chiclete sem açúcar, também para estimular o fluxo. A saliva parótida foi coletada nos trabalhos de DiGregorio *et al.* (1974) e Barbosa *et al.* (2006) e a saliva total não estimulada foi utilizada por Cleymaet *et al.*, (1991 d), Koh *et al.* (2003), Wilhelm *et al.* (2002), Nriagu *et al.* (2006) e Costa de Almeida *et al.* (2008). No presente estudo, foram utilizadas saliva total e salivas coletadas das glândulas submandibular/sublingual e parótida.

De acordo com DiGregorio *et al.* (1974), a saliva total, a qual representa as secreções das glândulas menores e maiores, apesar de ser a mais utilizada na maioria dos trabalhos, contem elementos não salivares, como células epiteliais descamadas e restos alimentares. Além disso, ela é mais suscetível a variações no fluxo salivar e contaminação durante sua coleta, o que poderia explicar, em nosso trabalho, sua maior concentração de chumbo quando comparada com as salivas sub e parótida ($p=0,0001$). Apesar da mediana da concentração de chumbo na saliva total ter sido baixa (1,7 µg/L), sua variação foi grande, de 0,1 a 17,0 µg/L. Por este fato, ela parou de ser coletada após as dosagens iniciais.

A concentração de chumbo na saliva varia muito entre estudos. Os trabalhos mais antigos apresentaram concentrações de chumbo muito altas na saliva, como por exemplo, 34 µg/L para saliva da parótida (DiGregorio *et al.*, 1974) e 44 µg/L e 55 µg/L para saliva total (Brudevold *et al.*, 1977 e P'an, 1981, respectivamente). Koh *et al.* (2003) atribuíram essa alta concentração do metal na saliva como decorrente da contaminação durante a coleta ou processamento das amostras.

Outros valores encontrados em estudos recentes, que são consistentes com nossos resultados, incluem: 7,7 µg/L na saliva total (Koh *et al.*, 2003) e 0,85 µg/L na saliva parótida de adultos expostos (Barbosa *et al.*, 2006); 2,4 µg/L na saliva total de adultos não expostos (Nriagu *et al.*, 2006); 1,64 e 5,85 µg/L na saliva total de crianças não expostas e

expostas, respectivamente (Costa de Almeida *et al.*, 2008) e um estudo em que 89% das amostras apresentaram chumbo abaixo do limite de detecção (1,5 µg/L) em crianças não expostas (Wilhelm *et al.*, 2002).

Nós mostramos, em um recente estudo (Costa de Almeida *et al.*, 2008), uma relação entre chumbo na saliva total e contaminação ambiental, visto que as concentrações de chumbo na saliva de crianças residentes em uma região notoriamente contaminada eram 3,5 vezes mais altas do que na saliva de crianças de uma cidade aparentemente não contaminada.

As correlações relatadas na literatura entre chumbo na saliva e no sangue e/ou plasma têm sido discordantes. Em estudo com adultos expostos ao metal, P'an (1981) encontrou uma boa correlação entre chumbo no sangue e saliva ($r=0,72$), ao contrário de Koh *et al.* (2003) e Barbosa *et al.* (2006), que mostraram uma fraca correlação entre chumbo na saliva e sangue ($r=0,41$ e $r=0,27$; respectivamente). Esses últimos, ainda reportaram uma fraca correlação entre chumbo na saliva e plasma ($r=0,28$). Em indivíduos não expostos, as correlações encontradas entre chumbo na saliva e sangue foram fracas. DiGregorio *et al.* (1974) e Omokhdion e Cockford (1991) exibiram, respectivamente, um coeficiente de correlação de 0,13 e -0,18. Nossos resultados não encontraram correlação entre concentração de chumbo no sangue e salivas total, sub e parótida, tanto para o grupo < 4 µg/L, quanto no grupo ≥ 4 µg/L. Como os estudos citados acima foram realizados em adultos, suas comparações com o atual trabalho não são possíveis.

Em um estudo realizado em crianças expostas com idades entre 7 e 12 anos, Cleymaet *et al.* (1991 d) coletaram sangue em intervalos regulares de 6 meses, durante 6 anos. A saliva total foi coletada apenas uma vez, 1 ano antes do término das coletas. A correlação entre a única medida de concentração de chumbo na saliva foi testada com todas as medidas de chumbo no sangue coletadas durante os 6 anos, e só houve correlação no período de sua coleta.

Para melhor explorar a relação entre chumbo na saliva e chumbo no sangue, um de nossos estudos anteriores (Costa de Almeida *et al.*, 2008) examinou se existia correlação entre chumbo na saliva total e sangue de crianças moradoras nas proximidades de uma região contaminada por uma fábrica de baterias, com base em dados de chumbo no sangue,

obtidos nas avaliações periódicas das crianças pelo Sistema de Vigilância Epidemiológica. Para essa correlação, duas dosagens de sangue foram utilizadas: uma antes e outra após a implementação de medidas de controle ambiental na região. Os coeficientes de correlação encontrados foram de 0,76 e 0,03 entre a concentração de chumbo na saliva e no sangue antes e depois das medidas de controle, respectivamente. As quantidades de chumbo no sangue dessas crianças, antes das medidas de remediação, eram mais altas do que as concentrações encontradas nas crianças do atual estudo. Após essas medidas entrarem em vigor, os níveis de chumbo no sangue diminuíram a níveis comparáveis com os encontrados no presente trabalho, assim como sua correlação com a concentração na saliva.

Essas correlações fracas entre concentração de chumbo no sangue e saliva podem ser um indicativo de que muitos fatores moderam a excreção do chumbo na saliva, bem como as relações biocinéticas (Nriagu *et al.*, 2006). Os principais fatores fisiológicos que afetam a razão Pb-saliva/Pb-sangue incluem a composição da saliva (principalmente o conteúdo de proteínas que podem se combinar ao chumbo) e a taxa patofisiológica de fluxo salivar, a qual pode ser influenciada pela idade, medicação, stress e ritmo circadiano (Jusko & Milsap, 1993). De acordo com Koh *et al.* (2003), podem existir diferentes taxas de excreção do chumbo na saliva, conforme as diferentes concentrações do metal no sangue.

As relações de transporte e cinética entre chumbo no sangue e saliva têm sido exploradas em alguns estudos com animais. Depois de repetidas injeções intraperitoneais de acetato de chumbo em ratos, as concentrações do metal encontradas nas salivas submandibular/sublingual e parótida foram de 50% e 22% da concentração de chumbo do sangue, respectivamente (Ghazi-Khansari *et al.*, 1997). Tal concentração foi altamente correlacionada com o chumbo nas salivas sub ($r=0,78$) e parótida ($r=0,93$). Mobarak & P'an (1984) observaram, também após repetidas injeções intraperitoneais de acetato de chumbo em ratos, que a concentração de chumbo na saliva era cerca de 5% da concentração no sangue total e 61% da concentração no plasma. A concentração de chumbo na saliva total dos ratos foi significativamente correlacionada com as concentrações, tanto no sangue ($r=0,78$) como no plasma ($r=0,80$), além disso, o chumbo também estava presente no tecido da glândula submandibular.

Os estudos sugerem que o chumbo no sangue total consiste em 2 grupos - uma fração ligada à proteínas nos eritrócitos e uma fração difusível no plasma (Cleymaet *et al.*, 1991 d, Koh *et al.*, 2003). Visto que a saliva é formada por transporte ativo de água e íons do plasma (Humphrey & Williamson, 2001), alguns autores sugerem que ela seja a excreção direta da fração do metal não ligado a proteínas do plasma (P'an, 1981; Omokhodion & Crockford, 1991). No entanto, nossos resultados, não encontraram correlação entre concentração de chumbo soro e salivas total, sub e parótida, tanto para o grupo $< 4 \mu\text{g/L}$, quanto no grupo $\geq 4 \mu\text{g/L}$. Talvez, essa ausência de correlação seja devido a baixa concentração de chumbo em que as crianças estão expostas, mesmo no grupo $\geq 4 \mu\text{g/L}$. Não existem outros trabalhos que correlacionam a concentração de chumbo na saliva e soro/plasma de crianças.

5.3 Esmalte Dental

A maioria dos estudos que utiliza medidas de chumbo em dentes obtém os dados a partir de dentes inteiros extraídos. No entanto, a quantidade de chumbo presente nos diferentes dentes não é uniforme. Alguns autores relatam que a concentração do chumbo varia entre incisivos, caninos e molares, apresentando um gradiente que decresce dos incisivos para os molares (Mackie *et al.*, 1977; Paterson *et al.*, 1988; Tvinnereim *et al.*, 2000; Karahalil *et al.*, 2007). Tendo em vista esse padrão de concentração de chumbo inconsistente entre os tipos de dentes, o que torna complicado as comparações entre os dados de diferentes estudos, optamos por utilizar somente um tipo de dente para os decíduos (canino superior direito) e permanentes (incisivo central superior direito).

Grandjean *et al.* (1984, 1986) e Smith *et al.* (1983) não encontraram diferenças nas concentrações de chumbo presentes em dentes contralaterais, por isso, na impossibilidade de se usar os dentes anteriormente escolhidos, devido a sua ausência, ou presença de cárie vestibular, o dente contralateral foi utilizado.

Outro fator que torna difícil a comparação entre os estudos em dentes é a utilização de diferentes porções do dente, isto é, alguns utilizam o dente inteiro ou apenas a dentina coronária ou radicular, outros, ainda, utilizam esmalte total ou, então, a superfície

do esmalte. Esses tecidos possuem composições diferentes e consequentemente, quantidades diferentes de chumbo (Purchase & Fergusson, 1986).

Poucos estudos utilizaram a microbiópsia de esmalte *in vivo* como amostra para dosagem de chumbo tanto em dentes permanentes (Brudevold *et al.*, 1975; Cleymaet *et al.*, 1991 a, b, c, d), quanto em decíduos (Gomes *et al.*, 2004; Costa de Almeida *et al.*, 2007; de Almeida *et al.*, 2008). Além disso, a maioria dos estudos que a utilizaram limitou-se à realização de uma única microbiópsia, o que dificulta ainda mais as comparações. A realização dessa técnica é fácil, não causa desconforto para a criança e é mais simples do que a coleta de amostras de dentina de dentes esfoliados.

Em um trabalho enviado para publicação (Costa de Almeida *et al.*), nós estudamos a morfologia das microbiópsias, por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Luz Polarizada, e verificamos que a microbiópsia não desmineraliza o esmalte em profundidade. Além disso, pela análise da birrefringência do esmalte, pôde ser demonstrado que nenhuma perda mineral ocorre no esmalte devido ao procedimento do ataque ácido. Esses achados mostram que a microbiópsia não é um procedimento invasivo.

A profundidade de microbiópsia é um parâmetro importante para a determinação de chumbo no esmalte, pois existe um gradiente de concentração de chumbo, que decresce a partir da superfície do esmalte em direção ao seu interior. No presente estudo, esse gradiente pôde ser observado em duas situações: quando comparamos a concentração de chumbo na primeira microbiópsia, tanto em decíduos quanto em permanentes, com a segunda sucessiva, a qual sempre apresentou menor quantidade de chumbo; e quando correlacionamos a concentração de chumbo com a profundidade de microbiópsia, que forneceu uma correlação negativa e significativa. Assim como no presente estudo, esse gradiente também foi descrito por vários autores para dentes permanentes (Brudevold *et al.*, 1975, 1977; Purchase & Fergusson, 1986; Cleymaet *et al.*, 1991 a, b, c, d) e dentes decíduos (Gomes *et al.*, 2004; Costa de Almeida *et al.*, 2007). Com isso, apenas microbiópsias de profundidades similares podem ser comparadas, uma das desvantagens da utilização desta técnica, pois a variação da profundidade é difícil de ser controlada, mesmo quando o procedimento é realizado por um mesmo indivíduo e todos os outros fatores referentes à

técnica são controlados. Diferenças na temperatura ambiente, evaporação da solução ácida e maior resistência do dente são alguns fatores que podem afetar a profundidade de microbiópsia (Cleymaet *et al.*, 1991 d).

Uma importante correlação foi demonstrada entre a primeira e a segunda microbiópsias em decíduos ($r= 0,64$) e permanentes ($r= 0,53$), concordando com os resultados de Cleymaet *et al.* (1991 a), que encontraram um coeficiente de correlação de 0,74 entre as duas microbiópsias sucessivas realizadas em dentes permanentes *in vivo*. No entanto, de acordo com os autores, a segunda microbiópsia forneceu resultados de concentração de chumbo mais confiáveis. Gomes *et al.* (2004) afirmaram que as microbiópsias mais profundas também mostraram resultados mais consistentes da concentração de chumbo, devido à grande variabilidade dos níveis de chumbo na superfície do esmalte.

A mediana da concentração de chumbo encontrada na primeira microbiópsia dos dentes decíduos (109,3 $\mu\text{g/g}$) foi mais baixa quando comparada com aquelas obtidas em um estudo anterior, em uma profundidade semelhante (286,2 $\mu\text{g/g}$ para a região não industrial e 457,3 $\mu\text{g/g}$ para a região industrial de Piracicaba, SP; Gomes *et al.*, 2004). A mediana da segunda microbiópsia no dente decíduo (45,9 $\mu\text{g/g}$), por sua vez, foi comparável à concentração de chumbo, encontrada nesse mesmo estudo, em uma profundidade também semelhante (quarto quartil de profundidade), em relação à região não industrial (42,0 $\mu\text{g/g}$), mas não em relação à região industrial (118,9 $\mu\text{g/g}$).

O trabalho anterior de nosso grupo, o qual sugere que o esmalte dental é um bom marcador para exposição passada ao chumbo, revelou uma mediana de concentração de chumbo 206 $\mu\text{g/g}$, para as 247 crianças que participaram do estudo em Ribeirão Preto, SP. Quando as crianças foram separadas de acordo com o bairro em que moravam, os valores de mediana variaram de 127 $\mu\text{g/g}$ a 337 $\mu\text{g/g}$, os quais foram mais altos, mas também comparáveis com os da primeira microbiópsia em decíduos do atual estudo. O mesmo estudo mostrou um valor muito alto (786 $\mu\text{g/g}$) de concentração do metal na superfície do esmalte decíduo para as crianças residentes em uma região contaminada (nas proximidades de uma fábrica de baterias, no município de Bauru, SP).

No trabalho seguinte (de Almeida *et al.*, 2008), o qual deu origem à presente pesquisa, quando as amostras de esmalte mais superficiais (1,9 a 3,18 μm ; valor do primeiro quartil de profundidade) foram excluídas das análises, verificou-se um *plateau* de concentração de chumbo na subsuperfície do esmalte das crianças da região contaminada (ao redor de 600 $\mu\text{g/g}$). Ainda neste estudo, as medianas da concentração de chumbo da subsuperfície do esmalte dos grupos de crianças presentes em cada região de Ribeirão Preto foram reanalisadas, e verificou-se que 30% delas, em um determinado bairro (Campos Elíseos), apresentavam chumbo na subsuperfície do esmalte $\geq 600 \mu\text{g/g}$. Esse achado não se repetiu nos nossos resultados atuais. Apenas 7% ($n= 28$) das crianças apresentaram concentração de chumbo $\geq 600 \mu\text{g/g}$ nos dentes decíduos. Ainda, quando excluímos as amostras com microbiópsias mais superficiais (do primeiro quartil de profundidade), esse número diminuiu para 3% ($n= 12$). Isto pode ser explicado pelo fato de que, como a pesquisa anterior incluía apenas dados de chumbo no esmalte (coletados pelo procedimento da microbiópsia, que é indolor e não invasivo), o consentimento dos pais para a participação das crianças era maior (cerca de 90%). Entretanto, como a pesquisa atual envolvia, além das microbiópsias, a coleta de sangue, muitos pais (cerca de 50%) não consentiam a participação das crianças, por medo ou desinformação. Talvez, esse tenha sido o motivo da menor quantidade de crianças com chumbo $\geq 600 \mu\text{g/g}$. Por causa dessa pequena quantidade de crianças com esse valor concentração, algumas correlações foram feitas utilizando como ponto de corte 400 $\mu\text{g/g}$ de chumbo no esmalte e não 600 $\mu\text{g/g}$.

Os resultados de chumbo na superfície do esmalte permanente (primeira microbiópsia, mediana= 308,3; para uma profundidade média de 2,9 μm) foram de 2,5 a 8 vezes mais baixos do que de outros estudos que também utilizaram microbiópsia em esmalte permanente. No trabalho de Brudevold *et al.* (1975), a concentração de chumbo encontrada, para uma profundidade similar, foi de 1250 $\mu\text{g/g}$. Já Cleymaet *et al.* (1991 d) encontraram uma mediana de 1066 $\mu\text{g/g}$ em uma região industrializada da Bélgica, e, interessante, a mediana encontrada na superfície do esmalte de dentes permanentes de crianças do Kenya, onde baixas concentrações de chumbo ambiental foram encontradas, foi de 145 $\mu\text{g/g}$, a qual é comparável com as concentrações no esmalte decíduo. As concentrações de chumbo exibidas por Cleymaet *et al.* (1991 b) foram de 2480 $\mu\text{g/g}$ e 995

µg/g para crianças com 7 anos de idade residentes a 2000 m e 500 m, respectivamente, de uma fábrica de metal. Em outro estudo dos mesmos autores (Cleymaet *et al.*, 1991 a), duas microbiópsias sucessivas no mesmo dente permanente foram realizadas e as concentrações encontradas foram de 1125,5 µg/g e 276,8 µg/g para a primeira e segunda microbiópsias, respectivamente. Essa concentração da segunda microbiópsia é apenas comparável com a concentração encontrada na nossa primeira, mas não na nossa segunda microbiópsia em esmalte permanente (99,7 µg/g). A média de profundidade de cada microbiópsia foi semelhante à média encontrada em nosso estudo.

Estas concentrações desiguais entre chumbo no esmalte de dentes decíduos e permanentes também é relatada por outros autores (Anttila, 1987) e pode ser explicada devido às diferenças no tempo necessário para a conclusão do estágio de maturação da amelogenese nas duas dentições (Costa de Almeida *et al.*, 2007). Durante o estágio de maturação, grande parte dos íons é incorporada ao esmalte, através de sua superfície, por um processo que dura poucos meses nos dentes decíduos, e anos nos permanentes (Smith, 1998). Esse período mais longo de maturação é, provavelmente, a causa da maior incorporação de chumbo ao esmalte permanente (Brudevold & Steadman, 1956; Brudevold *et al.*, 1975; Purchase & Fergusson, 1986). Se o chumbo acumulado tiver sido acumulado durante o período pré-eruptivo, como a fase de maturação é muito mais curta nos decíduos (da vida intra-uterina e até os 6 meses), do que nos permanentes, esses períodos distintos (nos quais a criança está sujeita a diferentes fontes de exposição a chumbo) explicariam a fraca correlação entre a quantidade de chumbo na superfície do esmalte dos decíduos e permanentes.

Em relação ao sexo, quando comparamos as concentrações de chumbo nas primeiras e segundas microbiópsias de decíduos e permanentes de todas as amostras, apesar de observarmos uma diferença (uma maior concentração do metal no esmalte dos meninos, assim como no sangue), ela não foi estatisticamente significativa. No entanto, quando comparamos as amostras, excluindo as concentrações de chumbo do primeiro quartil, o resultado foi uma diferença estatisticamente significativa da concentração de chumbo entre os sexos, tanto para a primeira como para a segunda microbiópsias em dentes decíduos, mas não para os permanentes. A maioria das comparações das concentrações de chumbo

entre os sexos, existentes na literatura, foi realizada com base em dados de dentes inteiros. Bu-Olayan & Thomas (1999) encontraram diferença estatisticamente significativa, entre o sexo feminino e masculino, na concentração de chumbo de dentes decíduos inteiros, que era de 2,84 $\mu\text{g/g}$ nos meninos e 2,42 $\mu\text{g/g}$ nas meninas. No entanto, outros estudos não encontraram diferença em dentes permanentes (Lappalainen & Knuuttila, 1981; Steenhout & Pourtois, 1981), nem em decíduos (Mackie *et al.*, 1977; Delves *et al.*, 1982). O único estudo que comparou as concentrações de chumbo na superfície do esmalte de dentes permanentes, também não encontrou diferenças entre os sexos (Cleymaet *et al.*, 1991 a).

Uma das maiores controvérsias a respeito dos níveis de chumbo na superfície do esmalte dental é se o metal acumulado nos primeiros micrometros é incorporado após a erupção do dente, devido aos processos de des- e remineralização, ou apenas em sua fase pré-eruptiva, durante o estágio de maturação da amelogênese.

Brudevold & Steadman, em 1956, estudaram a concentração e distribuição do chumbo no esmalte a partir de dentes com diferentes idades, agrupados em: dentes não irrompidos, parcialmente e completamente formados; e dentes irrompidos. Verificaram, então, que a quantidade do metal na superfície do esmalte dental foi maior nos dentes irrompidos em relação aos não irrompidos. Além disso, concentrações mais baixas foram encontradas nos dentes parcialmente formados, quando comparados com aqueles completamente formados. Já grupo de dentes irrompidos, a concentração de chumbo foi mais alta naqueles mais antigos em relação aos mais jovens. Os autores sugerem, então, que quantidades razoáveis de tal metal são incorporadas ao esmalte antes de sua erupção, mas, as altas concentrações encontradas nos dentes mais antigos irrompidos indicam que também existe uma aquisição pós-eruptiva de chumbo.

Com base na microbiópsia de esmalte, Cleymaet *et al.* (1991 b) analisaram a concentração de chumbo em grupos de crianças com diferentes idades e sugeriram que a incorporação pós-eruptiva do chumbo no esmalte pode acontecer em regiões contaminadas, enquanto que em áreas de baixa exposição ao metal este ganho pós-eruptivo é desprezível. Brudevold *et al.* (1977) também determinaram a concentração de chumbo no esmalte superficial de crianças com diferentes idades (10 anos e 12 anos) e verificaram que a

concentração de chumbo foi maior, em média de 130 µg/g, nas crianças mais novas, o que pode ser um indicativo de que o chumbo não é incorporado pelo meio bucal.

Trabalhos recentes em animais mostram que a incorporação de chumbo ao esmalte acontece no período pré-eruptivo. Arora *et al.* (2005) avaliaram a distribuição espacial do chumbo no esmalte dental de ratos. Todos os dentes analisados não eram irrompidos, portanto, sem contato direto com a saliva. Os autores encontraram grandes quantidades do metal na camada superficial do esmalte, mais do que em seu interior, o que demonstra sua incorporação pré-eruptiva. Arora *et al.* (2006) quantificaram a distribuição intracelular de chumbo e zinco durante o estágio inicial de maturação da amelogênese, utilizando microfluorescência de raio x produzida por um feixe de luz Sincrotron. Enquanto que o chumbo não pôde ser detectado nos ameloblastos, um pico de sua concentração foi observado na margem do esmalte em mineralização.

Em nosso estudo, a ausência de correlação entre as concentrações de chumbo nos 3 tipos de saliva analisados e no esmalte dental, tanto nos dentes decíduos quanto nos permanentes, também sugere a incorporação pré-eruptiva do chumbo ao esmalte, pois o chumbo presente na saliva provavelmente reflete a exposição recente. Esses dados vão ao encontro dos resultados de nosso trabalho prévio (Costa de Almeida *et al.*, 2008), em que não existiu correlação entre as concentrações de chumbo no esmalte superficial de dentes decíduos e na saliva total, de crianças residentes em duas regiões, uma exposta ($r=0,15$) e outra aparentemente não exposta ($r=0,38$) ao chumbo, e contrariam os resultados de Nriagu *et al.* (2006), os quais afirmaram que a saliva pode ser uma via importante do acúmulo de chumbo no esmalte.

Se o chumbo é acumulado no esmalte durante o período pré-eruptivo, como nós acreditamos, não é surpreendente que não tenhamos encontrado correlação entre sua concentração no sangue total e no esmalte de decíduos e permanentes, nas crianças de ambos os grupos ($<4\text{ µg/dL}$ e $\geq 4\text{ µg/dL}$), pois a concentração de chumbo no sangue reflete exposições recentes ao metal. Rinderknecht *et al.* (2005), utilizando isótopos de chumbo, analisaram a deposição pré e pós-natal do metal em esmalte de ratos e verificaram que sua concentração no esmalte reflete os níveis do metal no sangue durante o período da amelogênese. No estudo de Cleymaet *et al.* (1991 c), em que o sangue de crianças expostas

com idades entre 7 e 12 anos foi coletado em intervalos regulares de 6 meses, durante 6 anos, amostras de esmalte de incisivo central permanente foram obtidas, por meio da microbiópsia, 1 única vez, quando as crianças tinham 9,5 anos. A correlação entre essa única medida de concentração de chumbo no esmalte foi testada com todas as medidas do metal no sangue coletadas durante os 6 anos, e, alcançou significância quando o chumbo no esmalte foi correlacionado com o sangue coletado na época em que a criança tinha 7,5 anos.

Este foi o primeiro trabalho a descrever a correlação entre concentração de chumbo no soro/plasma e na superfície do esmalte. Quando correlacionamos tais concentrações, utilizando todos os dados das concentrações do metal no esmalte, nenhuma correlação foi encontrada, tanto para os dentes decíduos quanto para os permanentes, em ambos os grupos ($< 4 \mu\text{g/dL}$ e $\geq 4 \mu\text{g/dL}$). Surpreendentemente, quando incluímos nas análises apenas as concentrações de chumbo no esmalte $\geq 400 \mu\text{g/g}$, uma correlação forte, positiva e significativa foi alcançada, tanto nos decíduos quanto nos permanentes.

Assim como o osso, o esmalte dental reflete a quantidade de chumbo acumulada no passado (Altshuller *et al.*, 1962), e, de acordo com alguns autores (Hu *et al.*, 1998), a fração do chumbo no plasma fornece melhores informações do metal nos ossos, quando comparada com sua fração no sangue total. Cake *et al.* (1996) determinaram as concentrações de chumbo no soro, sangue total, tibia (osso cortical) e calcâneo (osso trabecular) de 49 trabalhadores expostos e concluíram que as concentrações de chumbo no soro se correlacionaram mais fortemente com os níveis do metal em ambos os ossos, quando comparadas com tais concentrações no sangue. Nossos resultados podem indicar que quando a criança é exposta a concentrações mais altas de chumbo, semelhantemente ao que ocorre com o osso, o soro/plasma também pode refletir a concentração de chumbo ao qual o esmalte foi exposto durante seu período de maturação.

Além disso, alguns estudos sugerem que os níveis de chumbo no plasma podem variar substancialmente, sem variações correspondentes em sua concentração no sangue total. Por exemplo, Hernandez-Avila *et al.* (1998) analisaram a concentração de chumbo no plasma, sangue total e ossos (patela e tibia) de adultos expostos na Cidade do México e verificaram que o chumbo variou entre 0,27% e 0,7% na razão plasma/sangue total. Na

análise multivariada, a concentração de chumbo no osso influenciou a concentração do metal no plasma, independente de seu efeito no sangue total. De acordo com O'Flaherty (1995), pelo menos algumas variações nas medidas de chumbo no plasma, em uma concentração específica de chumbo no sangue total, deve ser devidas a diferentes características interindividuais.

5.4 Anemia

Apesar de termos encontrado uma concentração de chumbo um pouco mais alta nos indivíduos com anemia, é improvável que as concentrações de chumbo às quais os indivíduos deste estudo estavam expostos fossem capazes de causar uma diminuição dos níveis de hemoglobina.

De acordo com Counter *et al.* (2000), o limiar da concentração de chumbo no sangue para que ocorresse uma diminuição dos níveis de hemoglobina em crianças seria em torno de 40 µg/dL. No entanto, alguns autores sugerem que a inibição da ALAD, com conseqüente diminuição da concentração de hemoglobina, inicia-se com níveis de chumbo no sangue em torno de 10 µg/dL (Astrin *et al.*, 1987; Wetmur *et al.*, 1991 a). Piomelli *et al.* (1982) afirmaram que a elevação de protoporfirinas eritrocitárias livres, as quais são um marcador da interferência na biossíntese do heme, inicia-se a uma concentração de chumbo no sangue de 15 µg/dL, em crianças. Schwartz *et al.* (1990) mostraram uma relação negativa e não-linear de dose-resposta entre concentração de chumbo no sangue e hematócrito de crianças com concentração de chumbo próxima a 25 µg/dL, sendo esta relação dependente da idade (mais forte em crianças mais novas).

Rahman *et al.* (2002) compararam a concentração de chumbo no sangue e em dentes decíduos inteiros com a concentração de hemoglobina de crianças com idades entre 6 e 10 anos de uma região altamente exposta ao chumbo. Esse estudo mostrou uma associação negativa significativa ($p= 0,007$) entre concentração de chumbo no sangue e concentração de hemoglobina. Ainda, os autores afirmaram que o dente não é um marcador sensível dos efeitos adversos do chumbo na concentração de hemoglobina, pois, embora a concentração de chumbo nos dentes tenha sido negativamente associada com a concentração de hemoglobina, esta não foi estatisticamente significativa ($p= 0,35$). No

entanto, os níveis de chumbo aos quais as crianças desse estudo estavam expostas eram altos, com média de concentração do metal no sangue 16,0 µg/dL, 8 vezes mais alto do que a mediana encontrada em nosso trabalho.

Vários estudos (Barton *et al.*, 1978; Yip *et al.*, 1981; Clark *et al.*, 1988; Hammad *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 1999, 2003) demonstram que o status nutricional afeta a absorção de chumbo, a qual é maior quando há deficiência de ferro. Bergdahl *et al.* (1999) encontraram uma associação negativa entre concentração de hemoglobina e chumbo no sangue e plasma de crianças não expostas. Esses autores atribuíram essa associação a um efeito dos níveis de hemoglobina na concentração de chumbo no sangue e plasma, provavelmente via aumento da absorção de chumbo a níveis baixos do *status* férrico. No estudo de Schwartz *et al.* (1990), como os dados de deficiência de ferro das crianças não foram obtidos, também pode ter havido uma interferência desta deficiência em alguns dos efeitos do chumbo observados no hematócrito.

Apesar de termos excluído das análises as amostras com concentração de ferritina < 15,0 ng/dL, pelo fato da ferritina ser uma proteína de fase aguda, seus níveis podem ficar aumentados durante quadros infecciosos. Assim, algumas crianças com deficiência de ferro podem ter apresentado valores de ferritina > 15,0 ng/dL. Como tal fator não foi controlado, isso talvez explique a maior concentração de chumbo nas crianças com anemia.

5.5 Polimorfismos genéticos

A suscetibilidade aos efeitos tóxicos do chumbo, nas crianças, não é influenciada apenas pela idade, duração e intensidade da exposição ao chumbo presente no ambiente, mas também por parâmetros genéticos. Este foi o primeiro trabalho que relacionou a distribuição dos genótipos da ALAD com a concentração de chumbo no soro e esmalte dental de crianças, além da concentração de chumbo no sangue.

Nossos dados mostraram que o polimorfismo da ALAD não afetou a concentração de chumbo no sangue. Embora estes dados confirmem achados anteriores, os quais não encontraram associação entre os genótipos da ALAD e os níveis do metal no sangue em adultos (Schwartz *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004; Montenegro *et al.*, 2006) e crianças (Chen *et al.*, 2008), outros estudos têm sugerido que indivíduos com o alelo

ALAD2 teria maiores concentrações de chumbo no sangue do que aqueles sem o alelo, aumentando assim sua suscetibilidade à toxicidade do metal (Ziemsens et al., 1986; Astrin et al., 1987; Wetmur et al., 1991b; Shen et al., 2001; Perez-Bravo et al., 2004). Em nosso estudo, a concentração de chumbo no sangue variou de 0,2 a 9,4 µg/dL, com mediana de 2,1 µg/dL, níveis mais baixos do que os encontrados por esses autores. É possível que os variantes da ALAD afetem significativamente a concentração de chumbo no sangue apenas em indivíduos expostos a médias ou altas concentrações do metal.

Em relação ao chumbo no soro, também não encontramos diferenças em sua concentração associada aos diferentes genótipos da ALAD. O chumbo no plasma pode ser um índice mais relevante da exposição, distribuição e riscos à saúde associados ao chumbo. Além disso, os efeitos tóxicos estão principalmente associados com o chumbo no plasma, o qual reflete a fração difusível do metal na circulação (Schutz et al., 1996). Fleming et al. (1998) encontraram elevados níveis de chumbo no soro de 70 trabalhadores expostos os quais expressavam o alelo ALAD2. Esses achados foram associados com a diminuição da transferência do chumbo do sangue para o osso nos indivíduos portadores do alelo ALAD2, e sugerem que o polimorfismo genético da ALAD afeta o metabolismo e a distribuição do chumbo para os órgãos alvo. Montenegro et al. (2006) também encontraram uma maior concentração de chumbo no plasma de indivíduos com os genótipos ALAD 1-2/2-2 quando comparados com indivíduos ALAD 1-1. Além disso, devido a razão chumbo-plasma/chumbo-sangue também ter sido maior nos sujeitos portadores do alelo ALAD1, os autores sugerem que pessoas com ALAD 1-2/2-2 são mais suscetíveis aos riscos associados com a exposição ao chumbo.

Não existem trabalhos na literatura que avaliaram as associações entre as concentrações de chumbo no esmalte dental entre os diferentes genótipos da ALAD. No entanto, para o osso, alguns estudos suportam a hipótese de que esses genótipos modificam a cinética do chumbo neste tecido (Smith et al., 1995; Fleming et al., 1998; Schwartz et al., 2000b). Bellinger et al. (1994) relacionaram a concentração de chumbo nos ossos (tíbia e patela) e na dentina de dentes decíduos com o polimorfismo da ALAD. Os indivíduos com o genótipo ALAD 1-2 tenderam a ter menores concentrações do metal na dentina do que indivíduos ALAD 1-1, com média de 8,0 versus 14,1 µg/g, respectivamente. Além disso,

enquanto nenhum dos indivíduos ALAD 1-2 apresentou concentração de chumbo na tíbia acima de 6 µg/g, 19% dos ALAD 1-1 apresentaram concentração superior a essa. O oposto ocorreu com as concentrações de chumbo na patela. Todos os sujeitos ALAD 1-2 apresentaram níveis do metal superior a 6 µg/g versus 43% dos ALAD 1-1.

Hu et al. (2001) sugeriram que o alelo ALAD2 está relacionado com a diminuição da captação de chumbo no osso cortical e aumento de sua mobilização no osso trabecular. Nesse trabalho, quando a concentração de chumbo na patela estava > 60 µg/g, os níveis do metal no sangue de indivíduos portadores do alelo ALAD2 eram muito mais altos do que naqueles sem o referido alelo. Contudo, quando as concentrações estavam < 40 µg/g, o oposto ocorria, sujeitos com o ALAD1 possuíam maiores quantidades de chumbo no sangue que os portadores do ALAD2.

Controversamente, Bergdahl et al. (1997) investigaram o efeito modulador do polimorfismo da ALAD tanto nos níveis de chumbo do sangue quanto do osso de trabalhadores expostos ao metal. Em média, a concentração do chumbo no sangue total dos trabalhadores foi em torno de 20-30 µg/dL. No entanto, os autores não encontraram associação significativa entre os genótipos da ALAD e a concentração de chumbo no sangue e osso entre os 89 indivíduos. No mesmo estudo, os autores também examinaram 34 trabalhadores não expostos, nos quais a mediana de chumbo no sangue foi de 4 µg/dL, e também não encontraram diferenças nas concentrações do metal no sangue entre os indivíduos ALAD 1-1 e ALAD 1-2.

Como não existem dados na literatura que avaliaram as concentrações de chumbo no soro/plasma e chumbo no esmalte dental com as variantes da ALAD em crianças, as comparações entre os estudos torna-se difícil. A ausência de associação entre chumbo no soro e os genótipos, também pode ser explicada por uma grande quantidade de amostras com concentração de chumbo muito baixa, sendo que 193 amostras (46%) apresentaram-se abaixo do limite de detecção. O mesmo se aplica para a ausência de associação entre chumbo no esmalte de dentes decíduos e permanentes e os diferentes genótipos da ALAD.

Sem dúvida um estudo com crianças expostas ao chumbo no ambiente precisa ser feito, para que se possa avaliar o efeito deste polimorfismo no sangue, plasma, saliva e esmalte.

Recentemente, mais ênfase tem sido dada ao papel do polimorfismo do receptor da Vitamina D (VDR) na modulação dos níveis de chumbo no compartimento ósseo. Devido aos efeitos destes polimorfismos sobre a mineralização óssea, espera-se que estes variantes genéticos também possam influenciar o acúmulo de chumbo no osso (Onalaja e Cláudio, 2000). Como esses polimorfismos genéticos podem modificar as concentrações de chumbo no osso, eles também poderiam afetar os níveis do metal nos dentes, pois, assim como no osso, esse efeito é cumulativo. No entanto, este foi o primeiro trabalho que associou os diferentes genótipos dos polimorfismos do VDR (*BsmI*, *ApaI* e *FokI*) com concentrações de chumbo no soro e esmalte dental, além de sangue, em crianças.

Nossos resultados mostraram que as crianças com os genótipos bb (*BsmI*), aa (*ApaI*) e ff (*FokI*) apresentaram menor concentração do chumbo no sangue, soro e esmalte, tanto de decíduos quanto de permanentes, do que as crianças com os outros grupos de genótipos. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Assim como para a ALAD, talvez, se tivéssemos um número maior de crianças com concentrações mais altas de chumbo, as diferenças encontradas fossem significantes.

Esses resultados, embora não estatisticamente significantes, confirmam dados de estudos anteriores, os quais encontraram que indivíduos com genótipo bb (*BsmI*) ou ff (*FokI*) apresentaram concentrações mais baixas de chumbo no sangue do que sujeitos com os outros grupos de genótipos. Rezende et al. (2008) analisaram a relação entre 3 polimorfismos (*BsmI*, *ApaI* e *FokI*) do VDR e a concentração de chumbo no sangue total e plasma de 150 adultos ambientalmente expostos ao chumbo. A média da concentração de chumbo no sangue e plasma dos trabalhadores era de 7,3 µg/dL e 0,53 µg/L, respectivamente. Este trabalho mostrou que sujeitos com os genótipos bb (*BsmI*) ou ff (*FokI*) possuem menores quantidades de chumbo no sangue total do que os sujeitos com outros grupos de genótipos. Além disso, assim como nosso trabalho, os sujeitos com os genótipos aa (*ApaI*) ou ff apresentaram menores quantidades de chumbo no plasma do que os sujeitos de outros grupos de genótipos. Haynes et al. (2003) avaliaram a associação entre a concentração de chumbo no sangue e o polimorfismo *FokI* em crianças não expostas e encontraram que as crianças com o genótipo ff apresentaram as concentrações mais baixas de chumbo no sangue.

Uitterlinden et al. (2004) sugeriram que o alelo f (*FokI*) está associado a um VDR menos ativo. De acordo com Onalaja e Claudio (2000), as informações a respeito da funcionalidade dos outros 2 polimorfismos estudados (*BsmI* e *ApaI*) ainda permanecem incertas. No entanto, a concentração de chumbo no osso é aparentemente mais baixa em indivíduos com o genótipo bb para o polimorfismo *BsmI*.

Os trabalhos de Fullmer, (1992) e Zmuda et al. (2000), sugeriram que a presença do genótipo BB (*BsmI*) poderia estar associada com uma menor função do receptor, sendo então, relacionado com a captação de chumbo ou suscetibilidade à sua toxicidade. Schwartz et al. (2000b), com o intuito de abordar o papel do genótipo do VDR no acúmulo de chumbo no osso, determinaram sua concentração em um grupo de trabalhadores expostos, e encontraram que os níveis de chumbo na tíbia eram mais altos em indivíduos com o genótipo BB, intermediários nos heterozigotos e mais baixo nos homozigotos bb. Theppeang et al. (2004) encontraram uma concentração de chumbo significativamente mais alta na patela de trabalhadores expostos portadores do alelo B, para o polimorfismo *BsmI*.

Esses achados estão de acordo com nossos resultados, os quais mostram que as crianças com o genótipo bb tendem a possuir concentrações mais baixas de chumbo no esmalte dental do que sujeitos com os outros genótipos, apesar desse resultado não ser estatisticamente significativo.

6 CONCLUSÃO

As concentrações de chumbo encontradas nos diferentes marcadores de dose interna, na amostra de 444 crianças de 6-8 anos residentes no Bairro Campos Elíseos de Ribeirão Preto, SP, tiveram como mediana: 2,1 µg/dL no sangue total; 0,4 µg/L no soro; 1,7 µg/L na saliva total; 1,4 µg/L na saliva sub; 1,3 µg/L na saliva parótida; 109,3 µg/g na primeira microbiópsia em um dente decíduo; 45,9 µg/g na segunda microbiópsia deste mesmo dente decíduo; 308,3 µg/g na primeira microbiópsia em um dente permanente e 99,7 µg/g na segunda microbiópsia deste mesmo dente permanente.

Não houve correlação entre concentração de chumbo no esmalte e sua concentração nos diferentes tipos de saliva e sangue total. Não houve correlação entre concentração de chumbo no sangue total e sua concentração nos diferentes tipos de saliva, sendo o mesmo válido para soro e os diferentes tipos de saliva. Foi encontrada uma correlação entre a concentração de chumbo no soro e no esmalte dental ($r = 0,65$; $p < 0,0001$, para o dente decíduo e $0,51$; $p < 0,0001$, para o dente permanente), somente nas crianças que foram mais expostas ambientalmente ao metal (supondo que as crianças com concentrações de chumbo ≥ 400 µg/g são as mais expostas).

Não houve diferença nas concentrações de chumbo nos diferentes marcadores entre crianças com e sem anemia.

Neste estudo, os polimorfismos da ALAD e VDR não influenciaram a concentração de chumbo no sangue, soro, salivas e esmalte.

Estes resultados de concentrações de chumbo nos diferentes marcadores mostraram uma exposição ao chumbo indevida na população de 6-8 anos, residente no bairro dos Campos Elíseos (Ribeirão Preto, SP), com 10% das crianças com concentração de chumbo no sangue entre 4,0 e 9,4 µg/dL.

Estudos sobre as fontes de exposição ao chumbo no Brasil em áreas sem contaminação descrita são necessários, assim como dados de concentrações deste metal no sangue total de crianças mais jovens.

REFERÊNCIAS*

1. Adams WG, Geva J, Coffman J, Palfrey S, Bauchner. Anemia and elevated lead levels in underimmunized inner-city children. *Pediatrics*. 1998; 101(3): E6.
2. Agency Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1999) Toxicological profile for lead. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, July.
3. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007; 18(2): 148-52.
4. Altshuller LF, Halak DB, Landing BH, Kehoe RA. Deciduous teeth as an index of body burden of lead. *J Pediatr*. 1962. 60: p. 224-9.
5. Ambrose TM, Al-Lozi M, Scott MG. Bone lead concentrations assessed by in vivo X-ray fluorescence. *Clin Chem*. 2000; 46(8 Pt 1): 1171-8.
6. Ames SK, Ellis KJ, Gunn SK, Copeland KC, Abrams SA. Vitamin D receptor gene FokI polymorphism predicts calcium absorption and bone mineral density in children. *J Bone Miner Res*. 1999; 14(5): 740-6.
7. Anttila A. Lead content of deciduous tooth enamel from a high-radon area. *Acta Odontol Scand*. 1987; 45(4): 283-8.
8. Araujo UC, Pivetta FR, Moreira JC. Occupational lead exposure assessment: a proposal for a strategy to monitor prevention of clinical and subclinical effects. *Cad Saude Publica*. 1999; 15(1): 123-31.
9. Arora M, Chan SW, Ryan CG, Kennedy BJ, Walker DM. Spatial distribution of lead in enamel and coronal dentine of wistar rats. *Biol Trace Elem Res*. 2005; 105(1-3): 159-70.
10. Arora M, Kennedy BJ, Elhlou S, Pearson NJ, Walker DM, Bayl P, Chan SW. Spatial distribution of lead in human primary teeth as a biomarker of pre- and neonatal lead exposure. *Sci Total Environ*. 2006; 371(1-3): 55-62.
11. 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.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos e, conformidade com o Mediline.

12. Attramadal A, Jonsen J. The content of lead, cadmium, zinc and copper in deciduous and permanent human teeth. *Acta Odontol Scand.* 1976; 34(3): 127-31.
13. Baker EL, White RF, Pothier LJ, Berkey CS, Dinse GE, Travers PH, Harley JP, Feldman RG. Occupational lead neurotoxicity: improvement in behavioural effects after reduction of exposure. *Br J Ind Med.* 1985; 42(8): 507-16.
14. Barbosa F Jr, Corrêa Rodrigues MH, Buzalaf MR, Krug FJ, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Evaluation of the use of salivary lead levels as a surrogate of blood lead or plasma lead levels in lead exposed subjects. *Arch Toxicol.* 2006; 80(10): 633-7.
15. 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.
16. Barton JC, Conrad ME, Nuby S, Harrison L. Effects of iron on the absorption and retention of lead. *J Lab Clin Med.* 1978; 92(4): 536-47.
17. Battistuzzi G, Petrucci R, Silvagni L, Urbani FR, Caiola S. delta-Aminolevulinate dehydrase: a new genetic polymorphism in man. *Ann Hum Genet.* 1981, 45(Pt 3): 223-9.
18. Bellinger D, Hu H, Titlebaum L, Needleman HL. Attentional correlates of dentin and bone lead levels in adolescents. *Arch Environ Health.* 1994; 49(2): 98-105.
19. Bellinger D, et al., Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N Engl J Med,* 1987. 316(17): p. 1037-43.
20. Bellinger DC. Lead. *Pediatrics.* 2004; 113(4 Suppl): 1016-22.
21. Bellinger DC, Stiles KM, Needleman HL. Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: a long-term follow-up study. *Pediatrics.* 1992; 90(6): 855-61.
22. 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.
23. Bergdahl IA, Grubb A, Schütz A, Desnick RJ, Wetmur JG, Sassa S, Skerfving S. Lead binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. *Pharmacol Toxicol.* 1997a; 81(4): 153-8.
24. Bergdahl IA, Schütz A, Gerhardsson L, Jensen A, Skerfving S. Lead concentrations in human plasma, urine and whole blood. *Scand J Work Environ Health.* 1997b; 23(5): 359-63.

25. Bergdahl IA, Skerfving S. Biomonitoring of lead exposure-alternatives to blood. *J Toxicol Environ Health A*. 2008; 71(18): 1235-43.
26. Bergdahl IA, Vahter M, Counter SA, Schütz A, Buchanan LH, Ortega F, Laurell G, Skerfving S. Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children. *Environ Res*. 1999; 80(1): 25-33.
27. Binns HJ, Campbell C, Brown MJ. Interpreting and managing blood lead levels of less than 10 microg/dL in children and reducing childhood exposure to lead: recommendations of the Centers for Disease Control and Prevention Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. *Pediatrics*. 2007; 120(5): 1285-98.
28. Bloch P, Shapiro IM, Soule L, Close A, Revich B. Assessment of lead exposure of children from K-XRF measurements of shed teeth. *Appl Radiat Isot*. 1998; 49(5-6): 703-5.
29. Bradman A, Eskenazi B, Sutton P, Athanasoulis M, Goldman LR. Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated environments. *Environ Health Perspect*. 2001; 109(10): 1079-84.
30. Brodeur J, Lacasse Y, Talbot D. Influence of removal from occupational lead exposure on blood and saliva lead concentrations. *Toxicol Lett*. 1983; 19(1-2): 195-9.
31. Brudevold F, Aasenden R, Srinivasian BN, Bakhos Y. Lead in enamel and saliva, dental caries and the use of enamel biopsies for measuring past exposure to lead. *J Dent Res*. 1977; 56(10): 1165-71.
32. Brudevold F, Reda A, Aasenden R, Bakhos Y. Determination of trace elements in surface enamel of human teeth by a new biopsy procedure. *Arch Oral Biol*. 1975; 20(10): 667-73.
33. Brudevold F, Steadman LT. The distribution of lead in human enamel. *J Dent Res*. 1956; 35(3): 430-7.
34. Budd P, Montgomery J, Cox A, Krause P, Barreiro B, Thomas RG. The distribution of lead within ancient and modern human teeth: implications for long-term and historical exposure monitoring. *Sci Total Environ*. 1998; 220(2-3): 121-36.
35. Bu-Olayan AH, Thomas BV. Dental lead levels in residents from industrial and suburban areas of Kuwait. *Sci Total Environ*. 1999; 226(2-3): 133-7.

36. Cake KM, Bowins RJ, Vaillancourt C, Gordon CL, McNutt RH, Laporte R, Webber CE, Chettle DR. Partition of circulating lead between serum and red cells is different for internal and external sources of lead. *Am J Ind Med.* 1996; 29(5): 440-5.
37. Calabrese EJ. Expanding the reference dose concept to incorporate and optimize beneficial effects while preventing toxic responses from nonessential toxicants. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1996; 24(1 Pt 2): S68-75.
38. Canfield RL, Henderson CR Jr, Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA, Lanphear BP. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N Engl J Med.* 2003; 348(16): 1517-26.
39. Carvalho FM, Silvany Neto AM, Tavares TM, Costa AC, Chaves CR, Nascimento LD, Reis Mde A. Blood lead levels in children and environmental legacy of a lead foundry in Brazil. *Rev Panam Salud Publica.* 2003; 13(1): 19-23.
40. 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.
41. Cavalleri A, Minoia C, Pozzoli L, Polatti F, Bolis PF. Lead in red blood cells and in plasma of pregnant women and their offspring. *Environ Res.* 1978; 17(3): 403-8.
42. Centers for Disease Control and Prevention. Preventing Lead Poisoning in Young Children. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1991.
43. Centers for Disease Control and Prevention. Preventing Lead Poisoning in Young Children. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2005.
44. Chen Y, Zhao JX, Liu JW, Cui J, Li L, Tian W. Lack of association of delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype with blood lead levels in environmentally exposed children of Uygur and Han populations. *Acta Paediatr.* 2008; 97(12): 1717-20.
45. Chiodo LM, Jacobson SW, Jacobson JL. Neurodevelopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels. *Neurotoxicol Teratol.* 2004; 26(3): 359-71.
46. Clark M, Royal J, Seeler R. Interaction of iron deficiency and lead and the hematologic findings in children with severe lead poisoning. *Pediatrics.* 1988; 81(2): 247-54.
47. Cleymaet R, Bottenberg P, Retief DH, Slop D, Michotte Y, Coomans D. In vivo use of a dual acid etch biopsy for the evaluation of lead profiles in human surface enamel. *Caries Res.* 1991a; 25(4): 256-63.

48. Cleymaet R, Bottenberg P, Slop D, Clara R, Coomans D. Study of lead and cadmium content of surface enamel of schoolchildren from an industrial area in Belgium. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1991b; 19(2): 107-11.
49. Cleymaet, R., et al., Relation between lead in surface tooth enamel, blood, and saliva from children residing in the vicinity of a non-ferrous metal plant in Belgium. *Br J Ind Med*, 1991c. 48(10): p. 702-9.
50. Cleymaet R, Collys K, Retief DH, Michotte Y, Slop D, Taghon E, Maex W, Coomans D. A comparative study of the lead and cadmium content of surface enamel of Belgian and Kenyan children. *Sci Total Environ.* 1991d; 104(3): 175-89.
51. Costa de Almeida GR, Pereira Saraiva Mda C, Barbosa F Jr, Krug FJ, Cury JA, Rosário de Sousa Mda L, Rabelo Buzalaf MA, Gerlach RF. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environ Res.* 2007; 104(3): 337-45.
52. Costa de Almeida GR, Umbelino de Freitas C, Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Lead in saliva from lead-exposed and unexposed children. *Sci Total Environ.* 2008; *in press*.
53. Counter SA, Buchanan LH, Ortega F, Rifai N. Blood lead and hemoglobin levels in Andean children with chronic lead intoxication. *Neurotoxicology.* 2000; 21(3): 301-8.
54. Curran JE, Vaughan T, Lea RA, Weinstein SR, Morrison NA, Griffiths LR. Association of A vitamin D receptor polymorphism with sporadic breast cancer development. *Int J Cancer.* 1999; 83(6): 723-6.
55. Davidson CI. *Clean Hands: Clair Patterson's Crusade Against Environmental Lead Contamination.* Nova Science Publishers, 1998.
56. 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.
57. de Freitas CU, De Capitani EM, Gouveia N, Simonetti MH, de Paula E Silva MR, Kira CS, Sakuma AM, de Fátima Henriques Carvalho M, Duran MC, Tiglea P, de Abreu MH. 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.

58. Delves HT, Clayton BE, Carmichael A, Bubear M, Smith M. An appraisal of the analytical significance of tooth-lead measurements as possible indices of environmental exposure of children to lead. *Ann Clin Biochem.* 1982; 19(Pt 5): 329-37.
59. Dietrich KN, Krafft KM, Bornschein RL, Hammond PB, Berger O, Succop PA, Bier M. Low-level fetal lead exposure effect on neurobehavioral development in early infancy. *Pediatrics.* 1987; 80(5): 721-30.
60. Dietrich KN, Ris MD, Succop PA, Berger OG, Bornschein RL. Early exposure to lead and juvenile delinquency. *Neurotoxicol Teratol.* 2001; 23(6): 511-8.
61. DiGregorio GJ, Ferko AP, Sample RG, Bobyock E, McMichael R, Chernick WS. Lead and delta-aminolevulinic acid concentrations in human parotid saliva. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1974; 27(3): 491-3.
62. Everson J, Patterson CC. "ULtra-clean" isotope dilution/mass spectrometric analyses for lead in human blood plasma indicated that most reported values are artificially high. *Clin Che.* 1980; 26(11): 1603-7.
63. Fergusson DM, Fergusson JE, Horwood LJ, Kinzett NG. A longitudinal study of dentine lead levels, intelligence, school performance and behaviour. Part I. Dentine lead levels and exposure to environmental risk factors. *J Child Psychol Psychiatry.* 1988; 29(6): 781-92.
64. Fergusson JE, Purchase NG. The analysis and levels of lead in human teeth: a review. *Environ Pollut.* 1987; 46(1): 11-44.
65. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem.* 1925; 66(5) :375-400.
66. Fleming DE, Chettle DR, Wetmur JG, Desnick RJ, Robin JP, Boulay D, Richard NS, Gordon CL, Webber CE. 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.
67. Fosse G, Justesen NP. Lead in deciduous teeth of Norwegian children. *Arch Environ Health.* 1978; 33(4): 166-75.
68. Fullmer CS. Intestinal interactions of lead and calcium. *Neurotoxicology.* 1992; 13(4): 799-807.
69. Fullmer CS, Edelstein S, Wasserman RH. Lead-binding properties of intestinal calcium-binding proteins. *J Biol Chem.* 1985; 260(11): 6816-9.

70. Fung HL, Yaffe SJ, Mattar ME, Lanighan MC. Blood and salivary lead levels in children. *Clin Chim Acta*. 1975; 61(3): 423-4.
71. Ghazi-Khansari M, Mortazapour Z, Shayaganfar N, Abdollahi M, Dehpour AR. Lead determination in parotid and submandibular salivas and whole blood in rat. *Toxic Subst Mech*. 1997; 16 (2), 327-335.
72. Gidlow DA. Lead toxicity. *Occup Med (Lond)*. 2004; 54(2): 76-81.
73. Gil F, Pérez ML, Facio A, Villanueva E, Tojo R, Gil A. Dental lead levels in the Galician population, Spain. *Sci Total Environ*. 1994; 156(2): 145-50.
74. Gilbert SG, Rice DC. Low-level lifetime lead exposure produces behavioral toxicity (spatial discrimination reversal) in adult monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1987; 91(3): 484-90.
75. Gilfillan SC. Lead Poisoning and the Fall of Rome. *J Occup Med*. 1965; 7: 53-60.
76. Godwin HA. The biological chemistry of lead. *Curr Opin Chem Biol*. 2001; 5(2): 223-7.
77. Goldman LR. Lead regulation. *Science*. 1998; 282(5395): 1825-7.
78. Gomes VE, Rosário de Sousa Mda L, Barbosa F Jr, Krug FJ, Pereira Saraiva Mda C, Cury JA, Gerlach RF. In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. *Sci Total Environ*. 2004; 320(1): 25-35.
79. Gonzalez M, Banderas JA, Baez A, Belmont R. Salivary lead and cadmium in a young population residing in Mexico city. *Toxicol Lett*. 1997; 93(1): 55-64.
80. Goyer RA, Cherian MG, Jones MM, Reigart JR. Role of chelating agents for prevention, intervention, and treatment of exposures to toxic metals. *Environ Health Perspect*. 1995; 103(11): 1048-52.
81. Grandjean P, Hansen ON, Lyngbye K. Analysis of lead in circumpulpal dentin of deciduous teeth. *Ann Clin Lab Sci*. 1984; 14(4): 270-5.
82. Grandjean P, Lintrup J. Erythrocyte-Zn-protoporphyrin as an indicator of lead exposure. *Scand J Clin Lab Invest*. 1978; 38(7): 669-75.
83. Grandjean P, Lyngbye T, Hansen ON. Lead concentration in deciduous teeth: variation related to tooth type and analytical technique. *J Toxicol Environ Health*. 1986; 19(3): 437-44.

84. Grobler SR, Rossouw RJ, Kotze D, Lead levels in circumpulpal dentine of children from different geographic areas. *Arch Oral Biol.* 1985; 30(11-12): 819-20.
85. Gulson BL. Tooth analyses of sources and intensity of lead exposure in children. *Environ Health Perspect.* 1996; 104(3): 306-12.
86. Gulson BL, Gillings BR, Lead exchange in teeth and bone--a pilot study using stable lead isotopes. *Environ Health Perspect.* 1997; 105(8): 820-4.
87. Gulson BL, Jameson CW, Mahaffey KR, Mizon KJ, Korsch MJ, Vimpani G. Pregnancy increases mobilization of lead from maternal skeleton. *J Lab Clin Med.* 1997; 130(1): 51-62.
88. Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, Howarth D, Phillips A, Hall J. Impact on blood lead in children and adults following relocation from their source of exposure and contribution of skeletal tissue to blood lead. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1996; 56(4): 543-50.
89. Gwiazda R, Campbell C, Smith D. A noninvasive isotopic approach to estimate the bone lead contribution to blood in children: implications for assessing the efficacy of lead abatement. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(1): 104-10.
90. Hammad TA, Sexton M, Langenberg P. Relationship between blood lead and dietary iron intake in preschool children. A cross-sectional study. *Ann Epidemiol.* 1996; 6(1): 30-3.
91. Harada K, Miura H, Free erythrocyte protoporphyrin (FEP) and zinc protoporphyrin (ZnP) as biological parameters for lead poisoning. *Int Arch Occup Environ Health.* 1984; 53(4): 365-77.
92. Haynes EN, Kalkwarf HJ, Hornung R, Wenstrup R, Dietrich K, Lanphear BP. Vitamin D receptor FokI polymorphism and blood lead concentration in children. *Environ Health Perspect.* 2003; 111(13): 1665-9.
93. Hernández-Avila M, Smith D, Meneses F, Sanin LH, Hu H. The influence of bone and blood lead on plasma lead levels in environmentally exposed adults. *Environ Health Perspect.* 1998; 106(8): 473-7.
94. Hong S, Candelone JP, Patterson CC, Boutron CF. Greenland Ice Evidence of Hemispheric Lead Pollution Two Millennia Ago by Greek and Roman Civilizations. *Science.* 1994; 265(5180): 1841-1843.
95. 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.

96. Hu H, Wu MT, Cheng Y, Sparrow D, Weiss S, Kelsey K. The delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism and bone and blood lead levels in community-exposed men: the Normative Aging Study. *Environ Health Perspect.* 2001; 109(8): 827-32.
97. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001; 85(2): 162-9.
98. Jaffe EK, Salowe SP, Chen NT, DeHaven PA. Porphobilinogen synthase modification with methylmethanethiosulfonate. A protocol for the investigation of metalloproteins. *J Biol Chem.* 1984; 259(8): 5032-6.
99. Johnston MV, Goldstein GW. Selective vulnerability of the developing brain to lead. *Curr Opin Neurol.* 1998; 11(6): 689-93.
100. Jusko WJ, Milsap RL. Pharmacokinetic principles of drug distribution in saliva. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 694: 36-47.
101. Kamel F, Umbach DM, Lehman TA, Park LP, Munsat TL, Shefner JM, Sandler DP, Hu H, Taylor JA. Amyotrophic lateral sclerosis, lead, and genetic susceptibility: polymorphisms in the delta-aminolevulinic acid dehydratase and vitamin D receptor genes. *Environ Health Perspect.* 2003; 111(10): 1335-9.
102. Karacic V, Prpic-Majic D, Telisman S. The relationship between zinc protoporphyrin (ZPP) and "free" erythrocyte protoporphyrin (FEP) in lead-exposed individuals. *Int Arch Occup Environ Health.* 1980; 47(2): 165-77.
103. Karahalil B, Aykanat B, Ertas N. Dental lead levels in children from two different urban and suburban areas of Turkey. *Int J Hyg Environ Health.* 2007; 210(2): 107-12.
104. Kelada SN, Shelton E, Kaufmann RB, Khoury MJ. Delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2001; 154(1): 1-13.
105. Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou CN, Bak R. Comparison of Sebia Capillary capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol.* 2008; 130(5): 824-31.
106. Kim HS, Lee SS, Lee GS, Hwangbo Y, Ahn KD, Lee BK. The protective effect of delta-aminolevulinic acid dehydratase 1-2 and 2-2 isozymes against blood lead with higher hematologic parameters. *Environ Health Perspect.* 2004; 112(5): 538-41.

107. Koh D, Ng V, Chua LH, Yang Y, Ong HY, Chia SE. Can salivary lead be used for biological monitoring of lead exposed individuals? *Occup Environ Med.* 2003; 60(9): 696-8.
108. Lane RE. The care of the lead worker. *Br J Ind Med.* 1949; 6(3): 125-43.
109. Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P, Cox C. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dL in US children and adolescents. *Public Health Rep.* 2000; 115(6): 521-9.
110. Lanphear BP, Matte TD, Rogers J, Clickner RP, Dietz B, Bornschein RL *et al.* The contribution of lead-contaminated house dust and residential soil to children's blood lead levels. A pooled analysis of 12 epidemiologic studies. *Environ Res.* 1998; 79(1): 51-68.
111. Lappalainen R, Knuuttila M. The distribution and accumulation of Cd, Zn, Pb, Cu, Co, Ni, Mn and K in human teeth from five different geological areas of Finland. *Arch Oral Biol.* 1979; 24(5): 363-8.
112. Lazzari E P. *Dental Biochemistry.* Lea and Keliger, Philadelphia; 1976, p.7-8.
113. Lee SS, Lee BK, Lee GS, Stewart WF, Simon D, Kelsey K, Todd AC, Schwartz BS. Associations of lead biomarkers and delta-aminolevulinic acid dehydratase and vitamin D receptor genotypes with hematopoietic outcomes in Korean lead workers. *Scand J Work Environ Health.* 2001; 27(6): 402-11.
114. Leggett RW. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environ Health Perspect.* 1993; 101(7): 598-616.
115. Lin-Fu JS. Vulnerability of children to lead exposure and toxicity (first of two parts). *N Engl J Med.* 1973; 289(23): p. 1229-33.
116. Lin-Fu JS. Vulnerability of children to lead exposure and toxicity (second of two parts). *N Engl J Med.* 1973; 289(24): 1289-93.
117. Mackie AC, Stephens R, Townshend A. Tooth lead levels in Birmingham children. *Arch Environ Health.* 1977; 32(4): 178-85.
118. Manton WI. Total contribution of airborne lead to blood lead. *Br J Ind Med.* 1985; 42(3): 168-72.
119. Manton WI, Cook JD. High accuracy (stable isotope dilution) measurements of lead in serum and cerebrospinal fluid. *Br J Ind Med.* 1984; 41(3): 313-9.

120. Manton WI, Rothenberg DJ, Manalo M. The lead content of blood serum. *Environ Res.* 2001; 86(3): 263-73.
121. Marcus AH, Schwartz J. Dose-response curves for erythrocyte protoporphyrin vs blood lead: effects of iron status. *Environ Res.* 1987; 44(2): 221-7.
122. McMichael AJ, Baghurst PA, Wigg NR, Vimpani GV, Robertson EF, Roberts RJ. Port Pirie Cohort Study: environmental exposure to lead and children's abilities at the age of four years. *N Engl J Med.* 1988; 319(8): 468-75.
123. Meyer I, Heinrich J, Trepka MJ, Krause C, Schulz C, Meyer E, Lippold U. The effect of lead in tap water on blood lead in children in a smelter town. *Sci Total Environ.* 1998; 209(2-3): 255-71.
124. Mobarak N, P'An Y. Lead distribution in the saliva and blood fractions of rats after intraperitoneal injections. *Toxicology.* 1984; 32(1): 67-74.
125. 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.
126. 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.
127. Muldoon SB, Cauley JA, Kuller LH, Morrow L, Needleman HL, Scott J, Hooper FJ. Effects of blood lead levels on cognitive function of older women. *Neuroepidemiology.* 1996; 15(2): 62-72.
128. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 694: 72-7.
129. Needleman H. Standing up to the lead industry: an interview with Herbert Needleman. Interview by David Rosner and Gerald Markowitz. *Public Health Rep.* 2005; 120(3): 330-7.
130. Needleman HL, Bellinger D. The health effects of low level exposure to lead. *Annu Rev Public Health.* 1991; 12: 111-40.
131. Needleman HL, Davidson I, Sewell EM, Shapiro IM. Subclinical lead exposure in philadelphia schoolchildren. Identification by dentine lead analysis. *N Engl J Med.* 1974; 290(5): 245-8.
131. Needleman HL, Gunnoe C, Leviton A, Reed R, Peresie H, Maher C, Barrett P. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N Engl J Med.* 1979; 300(13): 689-95.

132. Needleman HL, Riess JA, Tobin MJ, Biesecker GE, Greenhouse JB. Bone lead levels and delinquent behavior. *Jama*. 1996; 275(5): 363-9.
133. Needleman HL, Schell A, Bellinger D, Leviton A, Allred EN. The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. An 11-year follow-up report. *N Engl J Med*. 1990; 322(2): 83-8.
134. Needleman HL, Tuncay OC, Shapiro IM. Lead levels in deciduous teeth of urban and suburban American children. *Nature*. 1972; 235(5333): 111-2.
135. Noren JG, Hulthe P, Gillberg C. Analysis of lead and cadmium in deciduous teeth by means of potentiometric stripping analysis. *Swed Dent J*. 1987; 11(1-2): 45-52.
136. Nriagu J, Burt B, Linder A, Ismail A, Sohn W. Lead levels in blood and saliva in a low-income population of Detroit, Michigan. *Int J Hyg Environ Health*. 2006; 209(2): 109-21.
137. Nriagu J, Jinabhai C, Naidoo R, Coutsooudis A. Atmospheric lead pollution in KwaZulu/Natal, South Africa. *Sci Total Environ*. 1996; 191(1-2): 69-76.
138. O'Flaherty EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. V. Lead absorption and disposition in childhood. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1995; 131(2): 297-308.
139. Omokhodion FO, Crockford GW. Lead in sweat and its relationship to salivary and urinary levels in normal healthy subjects. *Sci Total Environ*. 1991; 103(2-3): 113-22.
140. Onalaja AO, Claudio L. Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ Health Perspect*. 2000; 108 Suppl 1: 23-8.
141. P'an AYS. Lead levels in saliva and in blood. *J Toxicol Environ Health*. 1981; 7: 273-280.
142. Paoliello MM, De Capitani EM. Environmental contamination and human exposure to lead in Brazil. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2005; 184: 59-96.
143. Paoliello MM, De Capitani EM. Occupational and environmental human lead exposure in Brazil. *Environ Res*. 2007; 103(2): 288-97.
144. Paoliello MM, De Capitani EM, da Cunha FG, Matsuo T, Carvalho Mde F, Sakuma A, Figueiredo BR. Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. *Environ Res*. 2002; 88(2): 120-8.

145. Paterson LJ, Raab GM, Hunter R, Laxen DP, Fulton M, Fell GS, Halls DJ, Sutcliffe P. Factors influencing lead concentrations in shed deciduous teeth. *Sci Total Environ.* 1988; 74: 219-33.
146. Patterson CC, Shirahata H, Ericson JE. Lead in ancient human bones and its relevance to historical developments of social problems with lead. *Sci Total Environ.* 1987; 61: 167-200.
147. Pérez-Bravo F, Ruz M, Morán-Jiménez MJ, Olivares M, Rebolledo A, Codoceo J, Sepúlveda V, Jenkin A, Santos JL, Fontanellas A. Association between aminolevulinate dehydrase genotypes and blood lead levels in children from a lead-contaminated area in Antofagasta, Chile. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2004; 47(2): 276-80.
148. Piomelli S, Seaman C, Zullo D, Curran A, Davidow B. Threshold for lead damage to heme synthesis in urban children. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79(10): 3335-9.
149. Potluri VR, Astrin KH, Wetmur JG, Bishop DF, Desnick RJ. Human delta-aminolevulinate dehydratase: chromosomal localization to 9q34 by in situ hybridization. *Hum Genet.* 1987; 76(3): 236-9.
150. Pounds JG. Effect of lead intoxication on calcium homeostasis and calcium-mediated cell function: a review. *Neurotoxicology.* 1984; 5(3): 295-331.
151. Pounds JG, Long GJ, Rosen JF. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ Health Perspect.* 1991; 91: 17-32.
152. Purchase NG, Fergusson JE. Lead in teeth: the influence of the tooth type and the sample within a tooth on lead levels. *Sci Total Environ.* 1986; 52(3): 239-50.
153. Rabinowitz MB. Toxicokinetics of bone lead. *Environ Health Perspect.* 1991; 91: 33-7.
154. Rabinowitz MB, Bellinger D, Leviton A, Wang JD. Lead levels among various deciduous tooth types. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1991; 47(4): 602-8.
155. Rabinowitz MB, Leviton A, Bellinger D. Relationships between serial blood lead levels and exfoliated tooth dentin lead levels: models of tooth lead kinetics. *Calcif Tissue Int.* 1993; 53(5): 338-41.
156. Rabinowitz MB, Wetherill GW, Kopple JD. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest.* 1976; 58(2): 260-70.

157. Rahman A, Maqbool E, Zuberi HS. Lead-associated deficits in stature, mental ability and behaviour in children in Karachi. *Ann Trop Paediatr*. 2002; 22(4): 301-11.
158. 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.
159. Richardt G, Federolf G, Habermann E. Affinity of heavy metal ions to intracellular Ca²⁺-binding proteins. *Biochem Pharmacol*. 1986; 35(8): 1331-5.
160. Rinderknecht AL, Kleinman MT, Ericson JE. Pb enamel biomarker: deposition of pre- and postnatal Pb isotope injection in reconstructed time points along rat enamel transect. *Environ Res*. 2005; 99(2): 169-76.
161. Roberts JR, Reigart JR, Ebeling M, Hulsey TC. Time required for blood lead levels to decline in nonchelated children. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2001; 39(2): 153-60.
162. Roels HA, Buchet JP, Lauwerys RR, Bruaux P, Claeys-Thoreau F, Lafontaine A, Verduyn G. Exposure to lead by the oral and the pulmonary routes of children living in the vicinity of a primary lead smelter. *Environ Res*. 1980; 22(1): 81-94.
163. Rohner F, Zeder C, Zimmermann MB, Hurrell RF. Comparison of manual and automated ELISA methods for serum ferritin analysis. *J Clin Lab Anal*. 2005; 19(5): 196-8.
164. Rosen JF, Zarate-Salvador C, Trinidad EE. Plasma lead levels in normal and lead-intoxicated children. *J Pediatr*. 1974; 84(1): 45-8.
165. Ryan JA, Scheckel KG, Berti WR, Brown SL, Casteel SW, Chaney RL *et al*. Reducing children's risk from lead in soil. *Environ Sci Technol*. 2004; 38(1): 18A-24A.
166. Sakai T, Morita Y, Araki T, Kano M, Yoshida T. Relationship between delta-aminolevulinic acid dehydratase genotypes and heme precursors in lead workers. *Am J Ind Med*. 2000; 38(3): 355-60.
167. Schroeder HA, Tipton IH. The human body burden of lead. *Arch Environ Health*. 1968; 17(6): 965-78.
168. Schroeder SR, Hawk B, Otto DA, Mushak P, Hicks RE. Separating the effects of lead and social factors on IQ. *Environ Res*. 1985; 38(1): 144-54.

169. Schütz 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.
170. Schütz A, Skerfving S, Ranstam J, Christoffersson JO. Kinetics of lead in blood after the end of occupational exposure. *Scand J Work Environ Health.* 1987; 13(3): 221-31.
171. 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.
172. 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.
173. Schwartz BS, Stewart WF, Bolla KI, Simon PD, Bandeen-Roche K, Gordon PB, *et al.* Past adult lead exposure is associated with longitudinal decline in cognitive function. *Neurology.* 2000a; 55(8): 1144-50.
174. Schwartz BS, Stewart WF, Kelsey KT, Simon D, Park S, Links JM, Todd AC. Associations of tibial lead levels with BsmI polymorphisms in the vitamin D receptor in former organolead manufacturing workers. *Environ Health Perspect.* 2000b. 108(3): p. 199-203.
175. Schwartz J, Landrigan PJ, Baker EL Jr, Orenstein WA, von Lindern IH. Lead-induced anemia: dose-response relationships and evidence for a threshold. *Am J Public Health.* 1990; 80(2): 165-8.
176. Scinicariello F, Murray HE, Moffett DB, Abadin HG, Sexton MJ, Fowler BA. Lead and delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: where does it lead? A meta-analysis. *Environ Health Perspect.* 2007; 115(1): 35-41.
177. Shapiro IM, Dobkin B, Tuncay OC, Needleman HL. Lead levels in dentine and circumpulpal dentine of deciduous teeth of normal and lead poisoned children. *Clin Chim Acta.* 1973; 46(2): 119-23.
178. Shapiro IM, Needleman HL, Tuncay OC. The lead content of human deciduous and permanent teeth. *Environ Res.* 1972; 5(4): 467-70.
179. Shen XM, Wu SH, Yan CH, Zhao W, Ao LM, Zhang YW, *et al.* Delta-aminolevulinate dehydratase polymorphism and blood lead levels in Chinese children. *Environ Res.* 2001. 85(3): p. 185-90.

180. Shen XM, Yan CH, Guo D, Wu SM, Li RQ, Huang H, Ao LM, Zhou JD, Hong ZY, Xu JD, Jin XM, Tang JM. Low-level prenatal lead exposure and neurobehavioral development of children in the first year of life: a prospective study in Shanghai. *Environ Res.* 1998; 79(1): 1-8.
181. Silbergeld EK. New approaches to monitoring environmental neurotoxins. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 694: p. 62-71.
182. Silvany-Neto AM, Carvalho FM, Tavares TM, Guimarães GC, Amorim CJ, Peres MF, Lopes RS, Rocha CM, Raña MC. Lead poisoning among children of Santo Amaro, Bahia, Brazil in 1980, 1985, and 1992. *Bull Pan Am Health Organ.* 1996; 30(1): 51-62.
183. Simons TJ. Lead transport and binding by human erythrocytes in vitro. *Pflugers Arch.* 1993; 423(3-4): 307-13.
184. Six KM, Goyer RA. Experimental enhancement of lead toxicity by low dietary calcium. *J Lab Clin Med.* 1970; 76(6): 933-42.
185. Smith CM, Wang X, Hu H, Kelsey KT. A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environ Health Perspect.* 1995; 103(3): 248-53.
186. 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(5): 430-8.
187. Smith DR, Osterloh JD, Flegal AR. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton. *Environ Health Perspect.* 1996; 104(1): 60-6.
188. Smith M, Delves T, Lansdown R, Clayton B, Graham P. The effects of lead exposure on urban children: the Institute of Child Health/Southampton Study. *Dev Med Child Neurol Suppl.* 1983. 47: p. 1-54.
189. Steenhout A. Kinetics of lead storage in teeth and bones: an epidemiologic approach. *Arch Environ Health.* 1982; 37(4): 224-31.
190. Steenhout A, Pourtois M. Lead accumulation in teeth as a function of age with different exposures. *Br J Ind Med.* 1981; 38(3): 297-303.
191. Stewart DJ. Teeth as indicators of exposure of children to lead. *Arch Dis Child.* 1974; 49(11): 895-7.

192. Surkan PJ, Zhang A, Trachtenberg F, Daniel DB, McKinlay S, Bellinger DC. Neuropsychological function in children with blood lead levels <10 microg/dL. *Neurotoxicology*. 2007; 28(6): 1170-7.
193. Theppeang K, Schwartz BS, Lee BK, Lustberg ME, Silbergeld EK, Kelsey KT, Parsons PJ, Todd AC. Associations of patella lead with polymorphisms in the vitamin D receptor, delta-aminolevulinic acid dehydratase and endothelial nitric oxide synthase genes. *J Occup Environ Med*, 2004. 46(6): p. 528-37.
194. Todd AC, Wetmur JG, Moline JM, Godbold JH, Levin SM, Landrigan PJ. Unraveling the chronic toxicity of lead: an essential priority for environmental health. *Environ Health Perspect*. 1996; 104 Suppl 1: 141-6.
195. Tomokuni K, Ichiba M, Hirai Y. Comparison of hepatic delta-aminolevulinic acid (ALA) synthase and ALA dehydratase activities and urinary ALA excretion in different strains of male mice. *Ind Health*. 1991; 29(1): 27-31.
196. Trepka MJ, Heinrich J, Krause C, Schulz C, Lippold U, Meyer E, Wichmann HE. The internal burden of lead among children in a smelter town--a small area analysis. *Environ Res*. 1997; 72(2): 118-30.
197. 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.
198. Tvinnereim HM, Eide R, Riise T. Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentrations. *Sci Total Environ*. 2000; 255(1-3): 21-7.
199. Tvinnereim HM, Eide R, Riise T, Wesenberg GR, Fosse G, Steinnes E. Lead in primary teeth from Norway: changes in lead levels from the 1970s to the 1990s. *Sci Total Environ*. 1997; 207(2-3): p. 165-77.
200. 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.
201. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta*. 2006; 371(1-2): 1-12.
202. Waldron T, Wells C. Exposure to lead in ancient populations. *Trans Stud Coll Physicians Phila*. 1979; 1(2): 102-15.
203. Warren C. *Brush with Death: a social history of lead poisoning*. 1rd ed. The Johns Hopkins Paperbacks;2000.

204. Warren MJ, Cooper JB, Wood SP, Shoolingin-Jordan PM. Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. *Trends Biochem Sci.* 1998; 23(6): p. 217-21.
205. Wasserman RH, Fullmer CS. Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypotheses. *J Nutr.* 1995; 125(7 Suppl): 1971S-1979S.
206. Weber DF, Eisenmann DR. Microscopy of the neonatal line in developing human enamel. *Am J Anat.* 1971; 132(3): 375-91.
207. Weidmann SM, Weatherell JA, Hamm AM. Variations of enamel density in sections of human teeth. *Arch Oral Biol.* 1967; 12(1): 85-97.
208. Human delta-aminolevulinate dehydratase: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. Human delta-aminolevulinate dehydratase: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(20): 7703-7.
209. 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.
210. 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.
211. Wildt K, Berlin M, Isberg PE. Monitoring of zinc protoporphyrin levels in blood following occupational lead exposure. *Am J Ind Med.* 1987; 12(4): 385-98.
212. Wilhelm M, Pesch A, Rostek U, Begerow J, Schmitz N, Idel H, Ranft U. Concentrations of lead in blood, hair and saliva of German children living in three different areas of traffic density. *Sci Total Environ.* 2002; 297(1-3): 109-18.
213. Wright JP, Dietrich KN, Ris MD, Hornung RW, Wessel SD, Lanphear BP, Ho M, Rae MN. Association of prenatal and childhood blood lead concentrations with criminal arrests in early adulthood. *PLoS Med.* 2008; 5(5): e101.
214. Wright RO, Hu H, Maher TJ, Amarasiriwardena C, Chaikyakul P, Woolf AD, Shannon MW. Effect of iron deficiency anemia on lead distribution after intravenous dosing in rats. *Toxicol Ind Health.* 1998; 14(4): 547-51.
215. Wright RO, Shannon MW, Wright RJ, Hu H. Association between iron deficiency and low-level lead poisoning in an urban primary care clinic. *Am J Public Health.* 1999; 89(7): 1049-53.

216. Wright RO, Tsaih SW, Schwartz J, Wright RJ, Hu H. Association between iron deficiency and blood lead level in a longitudinal analysis of children followed in an urban primary care clinic. *J Pediatr*. 2003; 142(1): 9-14.
217. Yip R, Norris TN, Anderson AS. Iron status of children with elevated blood lead concentrations. *J Pediatr*. 1981; 98(6): 922-5.
218. Ziegler EE, Edwards BB, Jensen RL, Mahaffey KR, Fomon SJ. Absorption and retention of lead by infants. *Pediatr Res*. 1978; 12(1): 29-34.
219. Ziemsen B, Angerer J, Lehnert G, Benkmann HG, Goedde HW. Polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in lead-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 1986; 58(3): 245-7.
220. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Recent progress in understanding the genetic susceptibility to osteoporosis. *Genet Epidemiol*. 1999; 16(4): 356-67.
221. Zwennis WC, Franssen AC, Wijnans MJ. Use of zinc protoporphyrin in screening individuals for exposure to lead. *Clin Chem*. 1990; 36(8 Pt 1): 1456-9.

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da criança: _____

Por este instrumento de autorização, na qualidade de _____ autorizo que o menor _____ participe da pesquisa **“Utilização de biomarcadores de dose interna para determinação de chumbo e sua correlação com anemia e polimorfismos da ALAD e do Gene Receptor da Vitamina D”**. Justificativa: A contaminação por chumbo pode fazer muito mal às crianças e por isso o interesse em descobrir se as crianças apresentam ou não chumbo nos dentes, saliva e sangue. Objetivo: Correlacionar os níveis de chumbo encontrados na saliva, dentes e sangue com anemia. Procedimentos: Serão feitos exames clínicos rápidos, contagem de cárie, manchas no esmalte, coleta de saliva, DNA, amostras de sangue e um teste de esmalte para coletar pequena amostra de cálcio do dente, que será reposta pela aplicação de flúor gel. Desconfortos: quanto aos teste no esmalte e coletas de saliva, não há possibilidade de causarem desconforto ou trauma para a criança. A coleta de sangue pode causar algum desconforto inerente a este procedimento, mas que será realizado por profissional habilitado para fazer coleta de sangue. Riscos: Não haverá utilização de qualquer tipo de procedimento que traga risco aos participantes. Benefícios: esta pesquisa trata informações importantes para a comunidade e para os indivíduos que participarem do estudo sobre contaminação por chumbo e sua correlação com anemia. Métodos alternativos: este estudo visa justamente buscar métodos alternativos para determinação da exposição ao chumbo, por isso, usamos os melhores métodos aceitos até o momento e não há métodos alternativos a esses. Forma de assistência e responsável: as crianças que participarão deste estudo já fazem parte de programa de atendimento odontológico existente nas escolas em que estudam. Se ocorrer algum imprevisto durante a execução dos procedimentos desta pesquisa, os pesquisadores se comprometem a prestar assistência (CD. Glauce Regina Costa de Almeida – Avenida do Café, S/N - Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Tel: 9119-3418). Esclarecimentos antes e durante a pesquisa sobre a metodologia: Se houver qualquer dúvida não esclarecida neste documento, o pai/mãe/responsável poderá procurar a CD Glauce Regina Costa de Almeida para maiores esclarecimentos. Liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem penalização: para fazer parte do estudo a criança deve ter a autorização assinada e estar com vontade de participar, havendo plena liberdade para a criança deixar de participar da pesquisa em qualquer momento, sem que esta decisão implique em qualquer prejuízo para a criança. Garantia de sigilo e privacidade: esta pesquisa é científica e poderá ser publicada em jornais, revistas e/ou congressos científicos no país e no exterior, mantendo-se o sigilo e respeitando-se o código de Defesa do Menor e do Adolescente. Não está previsto o ressarcimento de despesas, uma vez que os sujeitos da pesquisa serão examinados nas próprias creches onde estudam mediante seu consentimento e sem nenhum custo adicional. Não está prevista qualquer forma de indenização referente a possíveis danos, visto que não existe essa possibilidade por se tratar somente de exames clínicos por visualização, coleta de saliva e teste de esmalte para coleta de quantidade mínima de minerais (cálcio) da superfície de um dente, sem riscos à saúde.

Estou ciente de que esta pesquisa tem como responsável a Profª Drª Raquel Fernanda Gerlach e a Pós-Graduanda Glauce Regina Costa de Almeida.

Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo.

_____, _____ de _____ de 200____

Assinatura do pai/mãe/responsável

Profª Drª. Raquel F. Gerlach

CD. Glauce Regina Costa de Almeida

Anexo II

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/270/FORP/28082006

Prezado(a) Professor(a),

Ref.: Processo n. 2006.1.797.58.5
Caae n. 0027.0.138.000-06

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 70ª Sessão realizada no dia 23 de agosto de 2006, deliberou **aprovar** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado: **"Utilização de biomarcadores de dose interna para determinação de chumbo e sua correlação com anemia e polimorfismos da Alad e do gene receptor da vitamina D"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria, na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final, ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, o **Relatório Parcial** até o dia 28 de fevereiro de 2008, e o **Relatório Final** até o dia 31 de agosto de 2009.

Atenciosamente,

Glaucete Della Rosa
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilma. Sra.

Profa. Dra. RAQUEL FERNANDA GERLACH

Professora Associada do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia - FORP/USP

GDR/bgrp

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa - Glaucete Della Rosa - e-mail: glaucete@forp.usp.br

APÊNDICE

- 1)** Lead in saliva from lead-exposed and unexposed children.
- 2)** Analysis of enamel microbiopsies in shed deciduous teeth by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Polarizing Microscopy (PM).

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/scitotenv

Lead in saliva from lead-exposed and unexposed children

Glauce Regina Costa de Almeida^a, Clarice Umbelino de Freitas^b, Fernando Barbosa Jr.^c,
José Eduardo Tanus-Santos^d, Raquel Fernanda Gerlach^{a,*}

^aDepartment of Morphology, Stomatology and Physiology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo — FORP/USP, Av. do Café, S/N, Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto-SP, Brazil

^bSurveillance Department/ SES / SP / Brasil, Av. Dr. Arnaldo, 351, Pinheiros, CEP 01246-000, São Paulo-SP, Brazil

^cDepartment of Clinical Analysis, Toxicology and Bromatology, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto-USP, Av. do Café, S/N, Monte Alegre, CEP 14040-903, Ribeirão Preto-SP, Brazil

^dDepartment of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo — FMRP/USP, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, CEP 14049-900, Ribeirão Preto-SP, Brazil

ARTICLE DATA

Article history:

Received 16 April 2008

Received in revised form

22 October 2008

Accepted 23 October 2008

Keywords:

Lead

Saliva

Deciduous teeth

Enamel microbiopsy

ABSTRACT

Introduction: Whole blood is used for diagnosis of lead exposure. A non-invasive method to obtain samples for the biomonitoring of lead contamination has become a necessity. This study 1) compares the lead content in whole saliva samples (Pb-saliva) of children from a city with no reported lead contamination (Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil) and children of a region notoriously contaminated with lead (Bauru, São Paulo State, Brazil), and 2) correlates Pb-saliva with the lead content in the enamel microbiopsy samples (Pb-enamel) in the case of these two populations.

Methods: From a population of our previous study that had included 247 children (4- to 6-year-old) from Ribeirão Preto, and 26 children from Bauru, Pb-saliva was analyzed in 125 children from Ribeirão Preto and 19 children from Bauru by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS). To correlate Pb-saliva with Pb-enamel, we used Pb-enamel data obtained in our previous study. The Mann-Whitney test was employed to compare the Pb-saliva data of the two cities. Pb-saliva and Pb-enamel values were then Log₁₀ transformed to normalize data, and Pb-saliva and Pb-enamel were correlated using Pearson's correlation coefficient.

Results: Median Pb-saliva from the Ribeirão Preto population (1.64 µg/L) and the Bauru population (5.85 µg/L) were statistically different ($p < 0.0001$). Pearson's correlation coefficient for Log₁₀ Pb-saliva versus Log₁₀ Pb-enamel was 0.15 ($p = 0.08$) for Ribeirão Preto and 0.38 ($p = 0.11$) for Bauru.

Conclusions: A clear relationship between Pb-saliva and environmental contamination by lead is shown. Further studies on Pb-saliva should be undertaken to elucidate the usefulness of saliva as a biomarker of lead exposure, particularly in children.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lead is usually analyzed in whole blood for biomonitoring exposure in human populations. However, blood collection is

an invasive procedure that causes discomfort, especially in children (Barbosa et al., 2005). Saliva collection is easier than blood collection for large population screening studies, and therefore it has been suggested by some authors as a possible

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 4065; fax: +55 16 3633 0999.

E-mail addresses: glauce79@yahoo.com.br (G.R. Costa de Almeida), unbelin@uol.com.br (C. Umbelino de Freitas), fbarbosa@fcrp.usp.br (F. Barbosa), tanus@fmrp.usp.br (J.E. Tanus-Santos), rferlach@forp.usp.br (R.F. Gerlach).

0048-9697/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.scitotenv.2008.10.058

biomarker of lead exposure (Silbergeld, 1993; Koh et al., 2003; Nriagu et al., 2006).

Indeed, Pb-saliva may indirectly reflect the amount of lead in plasma (Omokhodion and Crockford, 1991), and in recent years plasma lead levels has gained considerable attention (Smith et al., 2002; Barbosa et al., 2006; Bergdahl et al., 2006). The plasma reflects the extracellular fluid in the body (Guyton and Hall, 2000), thus allowing access to the true amounts of lead to which cells are exposed. The saliva, in turn, is formed by the active transport of water and ions from plasma (Humphrey and Williamson, 2001).

Studies from the past decade described plasma concentrations in lead workers and controls (Schütz et al., 1996), as well as in unexposed and exposed children (Bergdahl et al., 1999), showing that plasma lead concentrations are reliable.

In this sense, this study aimed at: (1) comparing Pb-saliva in samples from a city with no apparent lead contamination (Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil) with samples from an area notoriously contaminated located in the city of Bauru (Bauru, São Paulo State, Brazil), and (2) correlating Pb-saliva with Pb-enamel in these two populations.

2. Methods

2.1. Sample population

The study proposal was approved by the Ethics Research Committee (FORP/USP protocol no. 2003.1.353.58.7), according to Resolution 196/96 of the National Ethics Research Committee. Parents signed an informed consent prior to inclusion of their child in the study.

The children studied here were the same that participated in our previous study (Costa de Almeida et al., 2007) that had included 247 children (4- to 6-year-old) from Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil (city with no reported lead contamination), and 26 children living in a region highly exposed to lead (Barbosa et al., 2006; de Freitas et al., 2007) during the running of a battery plant located less than 1000 m from their residences in Bauru, São Paulo State, Brazil. Further details on the study population in this previous study are available elsewhere (Costa de Almeida et al., 2007). The median blood lead level in children (6 to 8 years-old) from Ribeirão Preto is 2.0 µg/dL (manuscript in preparation), while the median blood lead level in children (<13 years-old) living in the contaminated area in Bauru was 7.3 µg/dL, and 37% of these children presented blood lead level above the action limit established by the World Health Organization (10 µg/dL) (de Freitas et al., 2007).

2.2. Saliva sample collection

Whole non-stimulated saliva was collected from 125 children living in Ribeirão Preto and 19 children from Bauru. The reason why a smaller population was included in the present study is that some children failed to spit (probably due to different motor control of muscles in children at this age).

After thoroughly rinsing the child's mouth with tap water, 5 mL of non-stimulated whole saliva was collected into 50 mL Falcon tubes. The samples were frozen at -20 °C until analysis was performed. All the saliva collections were carried out between 8 and 11 a.m.

2.3. Enamel microbiopsy technique and chemical analysis

The detailed enamel microbiopsy procedure and chemical analysis are described in detail in Costa de Almeida et al. (2007).

2.4. Saliva analysis

The saliva samples were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) (Perkin Elmer Elan DRC II) following the method proposed by Barbosa et al. (2006). The method's quantification limit was 0.02 µg/L.

2.5. Blood Lead Data

To explore the possible association between Pb-saliva and Pb-blood, we examined whether Pb-saliva correlated with Pb-blood in the contaminated region (Bauru) using blood data derived from the periodic evaluations performed by the Epidemiological Surveillance System.

The blood samples were collected in three distinct periods: 1) diagnostic assessment; 2) confirmation assessment for the children who had Pb-blood higher than 10 µg/dL (both collected in 2002); 3) evaluation of children after environmental control measures were taken (between September 2003 and October 2004). The saliva samples were collected in August 2004, and the blood samples from the same children had been collected between May 2002 and December 2002, before environmental control measures aiming at decreasing lead content in the environment had taken place. To correlate Pb-saliva with Pb-blood, only the data concerning Pb-blood obtained during the confirmation assessment (second collection) and Pb-blood data obtained after the environmental control measures (third collection) were used. The data from the confirmation assessment were employed in the analysis because the collection time was closest to the saliva collection time.

2.6. Statistical analysis

The distribution of Pb-saliva and Pb-enamel was analyzed for normality and lead distribution was not normal in the Ribeirão Preto population. The Mann-Whitney test was used to compare Pb-saliva between the two cities. Moreover, Pb-saliva and Pb-enamel values were Log₁₀ transformed to normalize data for testing correlation between Pb-saliva with Pb-enamel. Only this correlation was performed using Pearson's correlation coefficient.

A probability level of 5% was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the Graph Pad Prism Program (Version 3.0).

3. Results and Discussion

This study shows there is a clear relationship between Pb-saliva and environmental contamination by lead, as judged from data obtained for populations with different histories of lead exposure.

Fig. 1 shows Pb-saliva (range and quartiles) found in children from Ribeirão Preto and Bauru. Pb-saliva in the

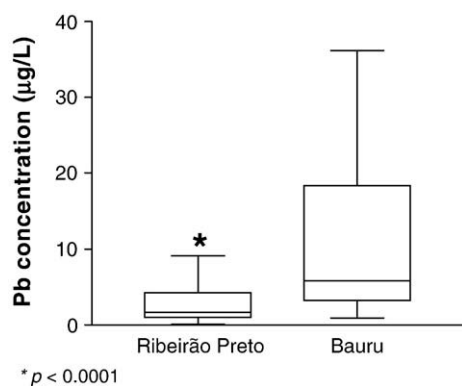


Fig. 1 – Pb-saliva (µg/L) from children living in Ribeirão Preto ($n=125$) and Bauru ($n=19$), State of São Paulo, Brazil (2004). The box and whiskers plots show range and quartiles. The boxes extend from the 25th percentile to the 75th percentile, with a line at the median. The whiskers show the highest and the lowest values.

studied population from Ribeirão Preto varied from 0.09 to 9.10 µg/L, with a median of 1.64 µg/L. As for Bauru, Pb-saliva varied from 0.91 to 36.19 µg/L, with a median of 5.85 µg/L. In other words, there was 3.5 times more lead in the saliva of children living in the contaminated area. When Pb-saliva from Ribeirão Preto was compared with that of Bauru, the difference was highly significant ($p<0.0001$). These results confirmed that lead is present in the saliva of lead-exposed and unexposed individuals, and that differences can be reliably measured by ICPMS. Our results are in agreement with data from other authors that showed good correlation between Pb-saliva and lead encountered in the plasma or blood, suggesting that Pb-saliva may be valuable in the assessment of lead exposure (Brodeur et al., 1983, Omokhodion and Crockford, 1991; Silbergeld, 1993).

To our knowledge, the present study is the first that compares the lead concentration in whole saliva from lead-exposed and unexposed children using an analytical technique that provides results with quantification limits of 0.02 µg/L.

There was no significant correlation between Log_{10} Pb-saliva and Log_{10} Pb-enamel ($r=0.15$, $p=0.08$ for Ribeirão Preto and $r=0.38$, $p=0.11$ for Bauru) (Fig. 2). These results are in

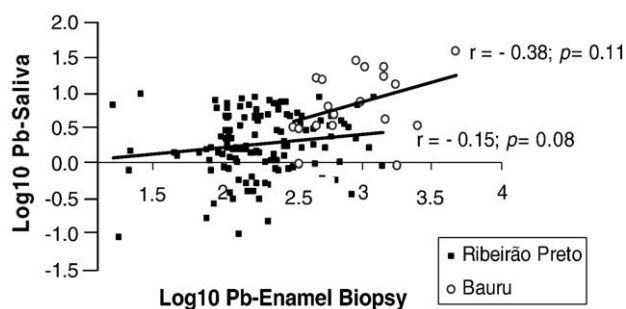


Fig. 2 – Scatter diagrams showing the correlation between Log_{10} Pb-saliva and a Log_{10} Pb-enamel in the population of Ribeirão Preto ($n=125$) and Bauru ($n=19$), State of São Paulo, Brazil (2004).

sharp contrast with the findings published by Nriagu et al. (2006). They considered that the saliva may be a significant route in the accumulation of lead in the enamel. The lack of correlation between Pb-saliva and Pb-enamel in our study appears to indicate that lead values in the saliva may be independent of the amount of lead accumulated in the enamel. Pb-saliva probably reflects recent exposure, while Pb-enamel emerges as a cumulative past marker (Cleymaet et al., 1991; Gomes et al., 2004; Costa de Almeida et al., 2007, 2008). The transfer of lead from the saliva to the enamel proposed by Nriagu et al. (2006) does not appear to have occurred to a great extent in the present study because most children did not have active caries. Although lead may accumulate in the enamel of children with active caries, we think that the amount of lead incorporated pre-eruptively into the enamel of children may be much higher than the amount of lead that can be incorporated from the saliva. If this is true, lead may be released from the enamel during periods of low pH, and, consequently, increasing the amount of lead in the saliva. This hypothesis deserves study, since in such process children would be re-exposed to the lead accumulated in their enamel (which will be then swallowed and absorbed).

Fig. 3 shows the correlations between Pb-saliva and Pb-blood in the two distinct periods of blood collection from children living in Bauru. Pearson's correlation analysis gave a coefficient of 0.76 ($p=0.04$) for the correlation between Pb-saliva and Pb-blood collected for confirmation assessment, and 0.03 ($p=0.94$) for the correlation between Pb-saliva and Pb-

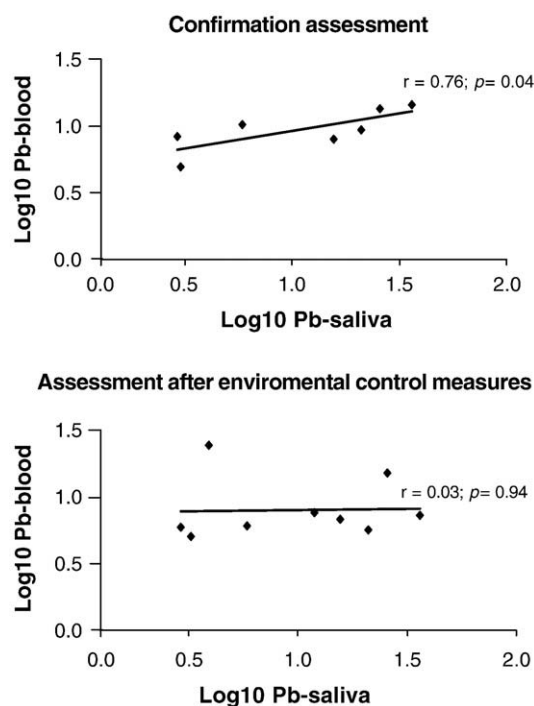


Fig. 3 – Scatter diagrams showing the correlation between Log_{10} Pb-saliva and Log_{10} Pb-blood in the two distinct periods of blood collection: confirmation assessment and assessment of Pb-blood after environmental control measures in the population of Bauru, State of São Paulo, Brazil (2004).

blood assessment after environmental control measures were in place.

The lack of correlation between saliva and whole blood lead after remediation may reflect the fact that, after environmental control measures, even though whole blood lead levels decreased in all but one subject analyzed, plasma lead levels were probably still high due to changes in the amount of lead that left the erythrocyte compartment. Since the saliva is formed by the active transport of ions and water from the extracellular fluid, a careful study of the saliva might provide data that ultimately reflect plasma lead concentrations. This notion is further supported by the fact that lead concentrations in the saliva are of the same order of magnitude as lead concentrations described in the plasma (Wilhelm et al., 2002; Barbosa et al., 2006). If further studies show that the saliva mimics the plasma, this could be a great marker for accessing changes in lead even after remediation, especially in children.

Because the correlation between Pb-saliva and Pb-blood, was examined in a small number of children from the contaminated region (Bauru), our data should be interpreted with caution.

4. Conclusion

Our results suggest that there is a clear relationship between Pb-saliva and environmental contamination by lead. Pb-saliva has no correlation with Pb-enamel. Further studies on Pb-saliva should be undertaken to elucidate the usefulness of saliva as a biomarker of lead exposure, particularly in children. Methodological progresses in determining Pb-saliva will enable further studies on the questions raised in this study.

Acknowledgements

We would like to acknowledge Adriana Aziani and Francisco Marcelo Paranhos Pinto for help during data collection; the State of São Paulo Surveillance System for the blood data from children living in the contaminated region of Bauru; and FAPESP, CNPq, and CAPES for financial support.

REFERENCES

Barbosa Jr F, 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;113:1669–74.

Barbosa Jr F, Correa Rodrigues MH, Buzalaf MR, Krug FJ, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Evaluation of the use of salivary lead levels as

a surrogate of blood lead or plasma lead levels in lead exposed subjects. *Arch Toxicol* 2006;80:633–7.

Bergdahl IA, Vahter M, Counter SA, Schütz A, Buchanan LH, Ortega F, et al. Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children. *Environ Res* 1999;80:25–33.

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.

Brodeur J, Lacasse Y, Talbot D. Influence of removal from occupational lead exposure on blood and saliva lead concentrations. *Toxicol Lett* 1983;19:195–9.

Cleymaet R, Bottenberg P, Retief DH, Slop D, Michotte Y, Coomans D. In vivo use of a dual acid etch biopsy for the evaluation of lead profiles in human surface enamel. *Caries Res* 1991;25:256–63.

Costa de Almeida GR, Saraiva MCP, Barbosa Jr F, Krug FJ, Cury JA, Sousa MLR, et al. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environ Res* 2007;104:337–45.

Costa de Almeida GR, Guerra CS, Tanus-Santos JE, Barbosa Jr F, 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;107:264–70.

de Freitas CU, De Capitani EM, Gouveia N, Simonetti MH, de Paula e Silva MR, 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;103:338–44.

Gomes VE, Sousa MLR, Barbosa Jr F, Krug FJ, Saraiva MCP, Cury JA, et al. In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. *Sci Total Environ* 2004;320:25–35.

Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001;85:162–9.

Koh D, Ng V, Chua LH, Yang Y, Ong HY, Chia SE. Can salivary lead be used for biological monitoring of lead exposed individuals? *Occup Environ Med* 2003;60:696–8.

Nriagu J, Burt B, Linder A, Ismail A, Sohn W. Lead levels in blood and saliva in a low-income population of Detroit, Michigan. *Int J Hyg Environ Health* 2006;209:109–21.

Omokhodion FO, Crockford GW. Lead in sweat and its relationship to salivary and urinary levels in normal healthy subjects. *Sci Total Environ* 1991;103:113–22.

Schütz 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;53:736–40.

Silbergeld EK. New approaches to monitoring environmental neurotoxins. *Ann N Y Acad Sci* 1993;694:62–71.

Smith D, Hernandez-Avila M, Téllez-Rojo MM, Mercado A, Hu H. The relationship between lead in plasma and whole blood in women. *Environ Health Perspect* 2002;110:263–8.

Wilhelm M, Pesch A, Rostek U, Begerow J, Schmitz N, Idel H, et al. Concentrations of lead in blood, hair and saliva of German children living in three different areas of traffic density. *Sci Total Environ* 2002;297:109–18.

Elsevier Editorial System(tm) for Science of the Total Environment
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Analysis of enamel microbiopsies in shed deciduous teeth by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Polarizing Microscopy (PM)

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Analytical / Methodological

Keywords: enamel microbiopsy; Scanning Electron Microscopy; Polarizing Microscopy; enamel birefringence; lead determination

Corresponding Author: Dr Raquel Fernanda Gerlach, PhD

Corresponding Author's Institution: Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo

First Author: Glaucé R Costa de Almeida, MSc

Order of Authors: Glaucé R Costa de Almeida, MSc; Gabriela F Molina, Graduation Student; César A Meschiari, Graduation Student; Frederico B de Sousa, PhD; Raquel Fernanda Gerlach, PhD

Abstract: The aims of this study were 1) to verify how close to the theoretically presumed areas are the areas of enamel microbiopsies carried out in vivo or in exfoliated teeth; 2) to test whether the etching solution percolates beyond the tape borders; 3) to test whether the etching solution demineralizes the enamel in depth. 24 shed upper deciduous central incisors were randomly divided into two groups: the Rehydrated Teeth Group and the Dry Teeth Group. An enamel microbiopsy was performed, and the enamel microbiopsies were then analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Polarizing Microscopy (PM). Quantitative birefringence measurements were performed. The "true" etched area was determined by measuring the etched enamel using the NIH Image analysis program. Enamel birefringence was compared using the

paired t test. There was a statistically significant difference when the etched areas in the Rehydrated teeth were compared with those of the Dry teeth ($p= 0.04$). The etched areas varied from -11.6% to 73.5% of the presumed area in the Rehydrated teeth, and from 6.6% to 61.3% in the Dry teeth. The mean percentage of variation in each group could be used as a correction factor for the etched area. Analysis of PM pictures shows no evidence of in-depth enamel demineralization by the etching solution. No statistically significant differences in enamel birefringence were observed between values underneath and outside the microbiopsy area in the same tooth, showing that no mineral loss occurred below the enamel superficial layer. Our data showed no evidence of in-depth enamel demineralization by the etching solution used in the enamel microbiopsy proposed for deciduous enamel. This study also showed some variation in the measured diameter of the enamel microbiopsy, indicating that sometimes the etching solution percolated beyond the tape borders.

Suggested Reviewers:

Opposed Reviewers:

**Analysis of enamel microbiopsies in shed deciduous teeth by
Scanning Electron Microscopy (SEM) and Polarizing
Microscopy (PM)**

**Glauce Regina Costa de Almeida ^a, Gabriela Ferian Molina ^a, César Arruda
Meschiari ^a, Frederico Barbosa de Sousa ^b, Raquel Fernanda Gerlach ^{*a}**

^a Department of Morphology, Stomatology and Physiology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo – FORP/USP, Av. do Café, S/N, Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto-SP, Brazil.

^b Department of Morphology, Dental School of João Pessoa, Federal University of Paraíba – UFPB, Av Castelo Branco- Campus I, CEP - 58.059-900, João Pessoa, PB, Brazil.

* corresponding author: R.F.Gerlach, Department of Morphology, Stomatology and Physiology
Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo – FORP/USP, Av. do Café, S/N, Monte Alegre,
CEP 14040-904, Ribeirão Preto-SP, Brazil. Phone: (016) 3602-4065 FAX: (016) 3633-0999 e-mail:
rfgerlach@forp.usp.br

1. Abstract

The aims of this study were 1) to verify how close to the theoretically presumed areas are the areas of enamel microbiopsies carried out *in vivo* or in exfoliated teeth; 2) to test whether the etching solution percolates beyond the tape borders; 3) to test whether the etching solution demineralizes the enamel in depth. 24 shed upper deciduous central incisors were randomly divided into two groups: the Rehydrated Teeth Group and the Dry Teeth Group. An enamel microbiopsy was performed, and the enamel microbiopsies were then analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Polarizing Microscopy (PM). Quantitative birefringence measurements were performed. The “true” etched area was determined by measuring the etched enamel using the NIH Image analysis program. Enamel birefringence was compared using the paired *t* test. There was a statistically significant difference when the etched areas in the Rehydrated teeth were compared with those of the Dry teeth ($p= 0.04$). The etched areas varied from -11.6% to 73.5% of the presumed area in the Rehydrated teeth, and from 6.6% to 61.3% in the Dry teeth. The mean percentage of variation in each group could be used as a correction factor for the etched area. Analysis of PM pictures shows no evidence of in-depth enamel demineralization by the etching solution. No statistically significant differences in enamel birefringence were observed between values underneath and outside the microbiopsy area in the same tooth, showing that no mineral loss occurred below the enamel superficial layer. Our data showed no evidence of in-depth enamel demineralization by the etching solution used in the enamel microbiopsy proposed for deciduous enamel. This study also showed some variation in the measured diameter of the enamel microbiopsy, indicating that sometimes the etching solution percolated beyond the tape borders.

Key words: enamel microbiopsy, Scanning Electron Microscopy, Polarizing Microscopy, enamel birefringence, lead determination.

2. Introduction

Dental enamel is the hardest tissue in the vertebrate body. The enamel is made up of highly organized, tightly packed crystallites that comprise 95 percent of its weight. Whereas organic material comprises 20 percent of other mineralized tissues, the mature enamel has less than 1 percent organic matter (Simmer and Hu, 2001).

The enamel matrix laid down prior to birth as well as after birth mineralizes over a long time, and this has to be taken into account when trying to use the dental enamel to detect elements that accumulate in mineralized tissues. This mineralization process in the enamel (called enamel maturation) is very different from the one that occurs in the dentine or in the bone, which are secreted as organic matrices that mineralize in increments (each increment in a short and specific period of time), that can be even detected in the dentine as incremental lines (Renz et al., 1997).

1 Some authors consider the tooth enamel as a promising marker for detection of early
2 contamination by lead (Ericson 2001; Uryu et al. 2003; Gomes et al., 2004;
3 Rinderknecht et al. 2005; Costa de Almeida et al., 2007; de Almeida, 2008). Studies
4 using experimental animals have also given evidence that lead has a heterogeneous
5 spatial distribution in teeth, its highest concentration being found in the superficial
6 enamel (Arora et al., 2005). Recent studies of our group on deciduous enamel samples
7 collected in vivo showed that lead accumulates in the enamel surface of deciduous
8 teeth in accordance with its presence in the environment (Gomes et al., 2004; Costa de
9 Almeida et al., 2007; de Almeida, 2008). We noted that it is very important to determine
10 lead in the superficial enamel, possibly in the first 2 to 10 μm , instead of determining
11 lead in the middle or inner enamel. It also seems important to obtain relatively large
12 volumes of sample from large areas (and possibly from a depth less than 10 μm), so
13 that the minerals (particularly lead, cadmium and fluoride) that are found in higher
14 amount at the surface become concentrated in the sample.

15 To obtain samples of enamel surface, we used a technique called enamel
16 microbiopsy. This technique is an acid etch procedure that utilizes 1.6 mol.L⁻¹ HCl in
17 70% glycerol (v/v) as the etching solution. When the solution is appropriately prepared
18 (with ultrapure reagents) and the procedure is carefully performed, enamel microbiopsy
19 enables researchers to obtain uncontaminated samples of surface enamel in an
20 adequate volume for determination of phosphorus, calcium and lead. Most importantly,
21 the procedure takes only 20 seconds and can be done in vivo, thus dismissing the
22 need for collection and sectioning of deciduous teeth, in order to reach the inner
23 dentine, so far the best marker of past cumulative exposure to lead ever used in large
24 studies with school-age children (Needleman et al., 1972, 1974, 1979).

25 Enamel microbiopsy was described in 1975 by Brudevold et al., who used this
26 technique to determine lead in extracted permanent teeth. This method was
27 reassessed by Cleymaet et al. (1991a) and used in several in vivo studies on
28 permanent teeth. These authors were able to discriminate populations according to

lead exposure on the basis of the amount of lead accumulated in the superficial enamel (Cleymaet et al. 1991b, 1991c, 1991d, 1991e). Recently, some modifications were made to the original technique so that it could be adapted to deciduous teeth (Gomes et al., 2004), allowing for the collection of samples from young children to estimate their exposure to lead.

However, some details about enamel microbiopsy that are crucial when considering this procedure for wide use in the screening of children for lead exposure have not been studied yet. Therefore, the aims of this study were 1) to verify how close to the theoretically assumed areas are the areas of enamel microbiopsies carried out in vivo or in exfoliated teeth (in vitro); 2) to test whether the etching solution percolates beyond the tape borders; 3) to test whether the etching solution attacks the deciduous enamel in depth.

3. Materials and Methods

3.1 Tooth material

The study proposal was approved by the Ethics Research Committee (FORP/USP protocol no. 2003.1.353.58.7), according to Resolution 196/96 of the National Commission of Ethics in Research. Twenty four shed upper deciduous central incisors, without clinical signs of caries or fillings, were used in this study. These teeth were collected from children of the first and second grades of state schools in Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil. Parents or a guardian signed a donation informed consent when the child donated the tooth.

Each tooth was cleaned with Triton X-100 solution (0.1%) and a dental brush. It was then submitted to 3 cycles of ultrasound in ultrapure water (10 minutes each), rinsed in ultrapure water, and allowed to dry at room temperature for 18 h in a laminar flow hood. Teeth were randomly divided into two groups: the Rehydrated Teeth Group (13 teeth) and the Dry Teeth Group (11 teeth). Teeth from the Rehydrated Group were

rehydrated with saline solution (sodium chloride at 0.9%) for 48 hours. Teeth from the Dry Group were not rehydrated.

One enamel microbiopsy was performed in the labial surface of each tooth (Figure 1A), as described by Gomes et al., 2004, using an adhesive tape and an etching time of 20 seconds. All microbiopsies were carried out by a dentist trained in pedodontics (GRCA). Just after the microbiopsy procedure was finished, the adhesive tape was relocated toward the cervical aspect of the tooth. Distances from the microbiopsy area to the incisal and cervical aspects of the tooth were measured by stereomicroscopy, as described below, and thereafter teeth with the adhesive tape on their cervical area were prepared for SEM.

Prior to SEM, each tooth (covered with the adhesive tape) was analyzed under a stereomicroscope, in order to register and measure the distances of the cervical and incisal margins of the microbiopsy area from the cervical and incisal margins of the buccal surface of the tooth crown. Under the stereomicroscope, a hand-made line was drawn on the most incisal aspect of the buccal surface of the tooth root. A 10/100 linear reticule was also photographed, and linear measurements of the abovementioned distances were obtained in digital photographs using an image analysis freeware (Image J).

3.2 Scanning Electron Microscopy

Teeth were dehydrated with increasing concentrations of acetone (50%, 70%, 80%, 90% and 100%), for 10 minutes in each concentration, mounted on sample holders, sputtered with gold, and observed in a JEOL JSM-5600 LV Scanning Electron Microscope. A horizontal line was drawn to determine the microbiopsy diameter in each tooth. Pictures from each tooth were made at 18X, 40X, 800X and 2500X (Figures 1B, C, D and 2). The microbiopsy area is easily distinguished by SEM. The etched area was then measured on pictures using the Image Analysis Program NIH Image (<http://www.nih.gov>), and this measured area was considered the true microbiopsy

area for comparison with the theoretically assumed or presumed area, based on the formula of a circle with a diameter of 1.6 mm (the presumed area being 2.01 mm²).

3.3 Polarizing Microscopy

After SEM observation, a longitudinal slice of the central region of each microbiopsy was cut using a hard tissue saw with a diamond disk. The slices were polished with wet sandpaper of decreasing granulation (600 to 2400) until a thickness of 100 µm was achieved. These slices were examined under polarized light after water imbibition in a position with maximum birefringence, in a polarizing microscope (Axioskop 40, Carl Zeiss) under 2.5X, 10X and 50X (numerical aperture of 0.8) objectives and 10X eyepieces fitted with a 10/100 calibrated linear reticule. The margins of each microbiopsy area were localized using the linear distances to both the cervical and incisal margins of the buccal surface of the tooth crown previously obtained under stereomicroscopy. Microbiopsy depth was directly measured under the 50X objective in some specimens.

3.4 Phosphorus Determination

To determine the mass of enamel obtained by each microbiopsy procedure, the concentration of phosphorus was determined in triplicate by the colorimetric method of Fiske and Subbarow (1925) as described in Costa de Almeida et al. (2007), assuming an enamel density of 2.95 g cm⁻³ and a phosphorus content of 17.4% (Koo and Cury, 1998; Weidmann et al., 1967).

The amount of enamel in each sample and the presumed area (2.01 mm²) of adhesive tape used to demarcate the microbiopsy site in the tooth were used to calculate the presumed depth of each microbiopsy, as done before by us (Gomes et al., 2004, Costa de Almeida et al., 2007) and by Cleymaet et al. (1991b; 1991c; 1991d). The presumed depth was then compared with the true microbiopsy depth, which was obtained by recalculating the depth according to the true etched areas measured in each tooth.

3.5 Enamel birefringence

Enamel birefringence is an indirect indication of the amount of mineral in the enamel (Sousa et al., 2006). A less mineralized enamel; i.e., enamel with a decreased mineral percent, shows decreased (less negative) birefringence signs. Quantitative birefringence measurements were performed on 100- μ m thick enamel slices of six teeth, in a polarizing microscope equipped with a 0-5 order Berek compensator after sample dehydration at room temperature for 48h. Sample thickness was measured edge-on to the nearest 2 micrometers in an optical compound microscope with a calibrated reticule in the eyepiece.

In the slide of each of the six teeth, four points were selected for measurements: two points underneath and two points outside the microbiopsy area (one located incisally to the microbiopsy, and one located cervically to the microbiopsy area). Points were located 100 μ m incisally/cervically to the biopsy border and all 4 points were located at 15 micrometers from the enamel surface. For each of these 4 points, the final value was obtained by calculating the mean of 5 consecutive measurements carried out by the same examiner. Birefringence of the enamel underneath and outside the microbiopsy area was compared for each tooth, as well as for the group of 6 teeth.

6. Statistical analysis

The unpaired *t* test was used to compare the true etched areas obtained in the Rehydrated and Dry groups of teeth. The variation between the presumed area (2.01 mm²) and the true etched area in both groups was also calculated. Presumed and true microbiopsy depths in each group were compared using the unpaired *t* test. The enamel birefringence underneath the microbiopsy area and outside the microbiopsy area were compared using the paired *t* test. A probability level of 5% was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the Graph Pad Prism Program (Version 3.0).

4. Results

Figure 1A shows a shed deciduous tooth with an adhesive tape in place ready for the enamel microbiopsy procedure. SEM photographs of dry teeth (Figure 1B-1D) show the aspect of the etched enamel after one microbiopsy has been performed. The adhesive tape used in the microbiopsy is also shown on top of each tooth. The etched area represents the area attacked by the acid solution, which is observed as a brighter area on the tooth surface.

Figure 2 depicts a series (A-D) of 4 SEM photographs taken at increasing magnifications (X18, X40, X800, X2500, respectively) of a rehydrated shed deciduous tooth. In 2C and 2D, the structure of the enamel prisms is clearly observed. The etched area is even and flat, without depressions or craters.

4.1 Comparison of true and estimated areas in enamel biopsies

The presumed diameter of the perforated tape was 1.6 mm. The diameter of the etched area of the 24 teeth used in this study was measured in SEM photographs taken after the procedure of enamel microbiopsy, and the diameters varied from 1.56 mm to 1.98 mm (Figure 1B, C and D). The presumed area of the microbiopsy was 2.01 mm². In the Rehydrated Group, the area varied from 1.78 mm² to 3.49 mm² with a mean of 2.34 mm² (SD= 0.50); in the Dry Group, the area varied from 2.14 mm² to 3.24 mm² with a mean of 2.63 mm² (SD= 0.26). Since perforations of the tape had the same diameter, we tested whether the areas obtained after the etching were different in the two groups. There was a statistically significant difference when the areas etched in the Rehydrated teeth were compared with the ones in the Dry teeth ($p= 0.04$). Figure 3 shows the mean values of the areas measured in the two groups. The areas varied from -11.6% to 73.5% of the presumed area in the Rehydrated teeth (Mean 16%), while these values varied between 6.6% and 61.3% in the Dry teeth (Mean 31%). Although a larger variation was found in the Rehydrated group, the mean area of this group was closer to

the presumed area of 2.01 mm². We reasoned that the mean percentage of variation of each group (16% and 31% for the Rehydrated and Dry teeth, respectively) could be used as a correction factor for the etched area, which is a parameter for calculation of the microbiopsy depth. This correction factor multiplied by the presumed area (2.01 mm²) resulted in what we called the corrected area, which was employed in an attempt to correct depth when a significant difference was found between the presumed and true microbiopsy depth (see below).

4.2 The etching solution does not demineralize deciduous enamel in depth

Figure 4 shows a series of 4 PM photographs taken at increasing magnifications (A-B in 10X and C-D in 50X) of 100-µm thick enamel slices of shed deciduous teeth. Analysis of the PM pictures gives no evidence of in-depth enamel demineralization by the etching solution. Using a calibrated reticule, the precise limit of the upper and lower limit of the microbiopsy could be determined, and in some specimens a depression of few micrometers could be observed (in Figure 4D, for example, the depression where the microbiopsy area starts). Some teeth revealed some mineral loss in the outer enamel (compatible with subclinical caries), as the specimen shown in Figure 4C, but this pattern was not related to the microbiopsy procedure, nor did this procedure cause any further mineral loss in the proximity of the subclinical caries.

4.3 Phosphorus Determination and Microbiopsy Depth

Figure 5 shows the distribution of presumed and true depth of each microbiopsy from the Rehydrated Group and the distribution of presumed, true and corrected depth (calculated using the corrected area) of each microbiopsy from the Dry Group. Mean microbiopsy depth for the Rehydrated Group was 3.0 µm (SD=1.9) and 2.8 µm (SD=2.1) for the presumed and true depth, respectively. As for the Dry Group, the mean microbiopsy depth was 5.6 (SD=1.55), 4.2 (SD=1.22) and 4.3 (SD=1.18) for the presumed, true and corrected depths, respectively. When the presumed and true depth

1 in the Rehydrated Group were compared, there was no significant difference ($p= 0.78$),
2 so the correction factor was not used in this group. In the Dry Group, comparison
3 between the presumed and the true depth revealed a statistically significant difference
4 ($p= 0.03$). When the true and corrected depths were compared, there was no
5 statistically significant difference ($p= 0.94$).

6 7 4.4 Enamel birefringence

8 Table 1 provides the enamel negative birefringence ($\times 10^{-4}$) values obtained at 4 points
9 in 100- μm thick enamel slices of 6 shed deciduous teeth. Each value represents the
10 mean of 5 measurements made at two points underneath the microbiopsy area, and at
11 two points outside the microbiopsy area.

12 Enamel birefringence varied from -16.8×10^{-4} to -3.2×10^{-4} with a mean of -10.5×10^{-4}
13 ($\text{SD}=4.87$) underneath the microbiopsy. Outside the microbiopsy area, values varied
14 from -15.2×10^{-4} to 0.0×10^{-4} with a mean of -8.9×10^{-4} ($\text{SD}=4.97$). No statistically
15 significant differences in the enamel birefringence were observed between values
16 underneath and outside the microbiopsy area in the same tooth ($p>0.1$ for all
17 comparisons).

18 19 **5. Discussion**

20 In this study we analyzed the morphological characteristics of teeth submitted to a
21 microbiopsy procedure according to the modifications proposed for deciduous teeth
22 (Gomes et al., 2004). Information on many aspects of this procedure was lacking, and
23 the results shown here highlight that knowledge about the details of this procedure will
24 probably enable its wide use in screening children for lead exposure, and possibly also
25 in the screening for other elements accumulated in the surface of the deciduous
26 enamel.

1 There was some variation in the measured diameter of the enamel microbiopsy etched
2 area. In some teeth, the etching solution percolated beyond the tape borders, but the
3 areas where the acid percolated comprised less than 5% of the total microbiopsy area.
4 Most importantly, analysis of PM pictures gave no evidence that the etching solution
5 demineralized the deciduous enamel in depth, not even in teeth with signs of
6 subclinical caries (Figure 4), which was consistent in all studied teeth. These results
7 were also confirmed by birefringence analysis, since the mean birefringence of each
8 tooth was not different in areas analyzed underneath the microbiopsy area. One of the
9 main worries of researchers, parents and ethical commissioners is how the
10 microbiopsy can affect the tooth structure. The data provided in this study clearly
11 shows that in deciduous teeth with no clinical sign of caries (even in the presence of
12 subclinical caries), the microbiopsy procedure was not detrimental to the dental
13 enamel.

14 Comparison between the presumed microbiopsy area (2.01 mm^2) and the areas
15 measured after the procedure in the two studied groups revealed a greater variability in
16 the areas from the Rehydrated Group (from 1.78 mm^2 to 3.49 mm^2) than in the areas
17 from the Dry Group (2.14 mm^2 to 3.24 mm^2). Despite this greater variation in the
18 Rehydrated Group, the mean area found in this Group (2.34 mm^2 , $SD= 0.50$) was only
19 16% larger than the expected area (2.01 mm^2), while the mean area found in the Dry
20 Group was 31% larger (2.63 mm^2 , $SD= 0.26$). Since a statistically significant difference
21 was found between the two groups of teeth, we reasoned that this difference between
22 wet and dry teeth could negatively affect the calculation of the microbiopsy depth in dry
23 teeth (i.e., in studies using the microbiopsy procedure in vitro). The microbiopsy depth
24 is calculated on the basis of the presumed surface area (2.01 mm^2), and the formula of
25 the cylinder. If dry teeth have larger etched areas, this will result in the miscalculation of
26 the microbiopsy depth, resulting in deeper microbiopsies. When microbiopsy is
27 employed for determination of lead concentrations in the enamel, the etched depth is a
28 very important parameter, because of the gradient described in lead concentrations,

1 which are greater at the outermost few micrometers (Brudevold et al., 1977; Purchase
2 and Fergusson, 1986; Cleymaet et al., 1991d; Gomes et al., 2004; Costa de Almeida et
3 al., 2007). In other words, the presumed area can be a concern, because it may
4 indicate that the amount of lead determined in the tooth is present in a deeper
5 microbiopsy than it really is.

6 When the presumed and true depth in the Rehydrated Group were compared, there
7 was no significant difference ($p= 0.78$), so the correction factor was not used in this
8 group. On the other hand, when the presumed and true depth were compared in the
9 Dry Group, the difference was statistically significant ($p= 0.03$). After the correction
10 factor was employed and the corrected depth was calculated in the Dry Group, the true
11 and corrected depths were compared and there was no statistically significant
12 difference ($p= 0.94$) between them. For this reason, the correction factor is very
13 important to minimize problems related to in vitro studies.

14 Quantitative birefringence of the mature enamel in air ranges from -22 to 10×10^{-4}
15 (Angmar et al., 1963). Our data are within such ranges. It has been shown that the
16 mean birefringence in air can be reasonably related to the mineral content in the
17 mature enamel according to a mathematical expression that considers the relationship
18 between three non-mineral contents (two types of adsorbed water and organic matter)
19 and the mineral content, so that the latter is directly proportional to the amount of
20 negative birefringence (Sousa et al., 2006). On this basis, and considering that no
21 statistically significant differences were found between birefringence of the enamel
22 underneath the microbiopsy area and when it was compared to the non-etched
23 enamel, our data indicates that no internal mineral loss occurred in the enamel due to
24 the microbiopsy etching procedure.

25 To our knowledge, this is the first study to address questions on the morphological and
26 biochemical details of the enamel microbiopsy in deciduous enamel. Some aspects
27 that deserve attention became evident, such as the differences in the effect of the
28 etched solution in wet versus dry teeth, and suggestions for improvements were made.

1 Even though in this study only teeth from a non-contaminated region were used, we
2 think that the results – particularly the in-depth effect of the acid solution – also apply
3 to teeth formed in lead contaminated environments, since a study on the morphology of
4 teeth collected in areas contaminated with lead do not show changes in comparison to
5 teeth from areas with low exposure to lead (Youravong et al., 2005), the same being
6 true for rat enamel formed when animals were exposed to lead (170 mg/l of lead
7 acetate in the drinking water) (Gerlach et al., 2002).

8 One other aspect that needs further study is the density of the hydroxiapatite
9 containing different amounts of lead, since higher contents of lead are found in the
10 surface of the teeth formed in areas highly contaminated with lead. Lead has a high
11 density in comparison to calcium (but Pb/Ca ratios are still below 1:1000 even in the
12 enamel surface). Increased lead amounts may have some modest effect on the enamel
13 density, which is another parameter used to determine the biopsy depth.

14 The enamel microbiopsy can easily collect samples of deciduous tooth enamel and
15 these samples provide information that makes sense in terms of environmental
16 contamination. This methodology is painless, easy to perform, and has proved to be
17 suitable for epidemiological studies that require large number of individuals (Almeida et
18 al., 2007). In this study we showed some important details about enamel microbiopsy
19 that will improve in vitro studies (the use of the correction factor for the dry teeth etched
20 area).

22 **Conclusion**

23 Our data showed no evidence of in-depth enamel demineralization by the etching
24 solution used in the enamel microbiopsy proposed for deciduous enamel, even when
25 sub-clinical caries was present in the teeth. This study also showed some variation in
26 the measured diameter of the enamel microbiopsy, indicating that sometimes the
27 etching solution percolated beyond the tape borders. We found a greater variation in
28 the true etched area in the Rehydrated Group of teeth when compared with the Dry

Teeth Group. However, in the Rehydrated Group, the mean true area was closest to the expected area when compared with the Dry Group, which had a 31% (mean) increase in the etched area. In the Dry Group, comparison between the presumed and the true depth revealed a statistically significant difference. Therefore, we suggest that the correction factor of 1.31 is used for studies using microbiopsies in vitro (in dry teeth), to minimize problems related the calculation of the microbiopsy depth in in vitro studies. The precise calculation of the etched depth is particularly important when using the enamel microbiopsy to determine elements accumulated in the surface of the enamel whose concentration changes according to the depth.

We would like to acknowledge **FAPESP**, **CNPq**, and **CAPES** for financial support.

References

1. Angmar B, Carlstrom D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. J. Ultrastruct Res. 1963; 8: 12-23.
2. Arora M, Chan SW, Ryan CG, Kennedy BJ, Walker DM. Spatial distribution of lead in enamel and coronal dentine of wistar rats. Biol Trace Elem Res 2005; 105: 159-170.
3. Brudevold F, Reda A, Aasenden R, Bakhos Y. Determination of trace elements in surface enamel of human teeth by a new biopsy procedure. Arch Oral Biol 1975; 20: 667-673.
4. Brudevold F, Aasenden R, Srinivasian BN, Bakhos Y. Lead in enamel and saliva, dental caries and the use of enamel biopsies for measuring past exposure to lead. J Dent Res 1977; 56: 1165-1171.

- 1 5. Cleymaet R, Bottenberg P, Retief DH, Slop D, Michotte Y, Coomans D. *In vivo* use
2 of a dual acid etch biopsy for the evaluation of lead profiles in human surface enamel.
3 Caries Res 1991a; 25: 256-263.
4
- 5 6. Cleymaet R, Bottenberg P, Slop D, Clara R, Coomans D. Study of lead and
6 cadmium content of surface enamel of schoolchildren from an industrial area in
7 Belgium. Community Dent Oral Epidemiol 1991b ; 19: 107-111.
8
- 9 7. Cleymaet R, Quartier E, Slop D, Retief DH, Smeyers-Verbeke J, Coomans D. Model
10 for assessment of lead content in human surface enamel. J Toxicol Environ Health
11 1991c; 32: 111-127.
12
- 13 8. Cleymaet R, Retief DH, Quartier E, Slop D, Coomans D, Michotte Y. A comparative
14 study of the lead and cadmium content of surface enamel of Belgian and Kenyan
15 children. Sci Total Environ 1991d ; 104 : 175-189.
16
- 17 9. Cleymaet R, Collys K, Retief DH, Michotte Y, Slop D, Taghon E, Maex W, Coomans
18 D. Relation between lead in surface tooth enamel, blood, and saliva from children
19 residing in the vicinity of a non-ferrous metal plant in Belgium. Brit J Ind Med 1991e; 48:
20 702-709.
21
- 22 10. Costa de Almeida GR Saraiva MCP, Barbosa FJr, Krug FJ, Cury JA, Sousa MLR,
23 Buzalaf MAR, Gerlach RF. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth
24 sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas.
25 Environ Res 2007; 104: 337-45.
26
- 27 11. de Almeida GRC, Guerra CS, Tanus-Santos JE, Barbosa FJr, Gerlach RF. A
28 *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: 264-70.

12. Ericson JE. Enamel lead biomarker for prenatal exposure assessment. Environ Res 2001; 87: 136-140.

13. Fiske CH, Subbarow Y. The Colorimetric Determination of Phosphorus. J Biol Chem 1925; 66:375-400.

14. Gerlach RF, Cury JA, Krug FJ, Line SR. Effect of lead on dental enamel formation. Toxicology. 2002; 175: 27-34.

15. Gomes VE, Sousa MLR, Barbosa FJr, Krug FJ, Saraiva MCP, Cury JA, Gerlach RF. *In vivo* studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. Sci Total Environ 2004; 320: 25-35.

16. Koh D, Ng V, Chua LH, Yang Y, Ong HY, Chia SE. Can salivary lead be used for biological monitoring of lead exposed individuals? Occup Environ Med 2003; 60: 696-698.

17. Needleman HL, Tuncay OC, Shapiro IM. Lead levels in deciduous teeth of urban and suburban American children. Nature 1972; 235: 111-112.

18. Needleman HL, Davidson I, Sewell EM, Shapiro IM. Subclinical lead exposure in Philadelphia schoolchildren. Identification by dentine lead analysis. N Engl J Med 1974; 290: 245-248.

19. Needleman HL, Gunnoe C, Leviton A, Reed R, Peresie H, Maher C, Barrett P. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N Engl J Med* 1979; 300: 689-695.
20. Purchase NG, Fergusson JE. Lead in teeth: the influence of the tooth type and the sample within a tooth on lead levels. *Sci Total Environ* 1986; 52: 239-250.
21. Renz H, Schaefer V, Duschner H, Radlanski RJ. Incremental lines in root cementum of human teeth: an approach to their ultrastructural nature by microscopy. *Adv Dent Res* 1997; 11: 472-7.
22. Rinderknecht AL, Kleinman MT, Ericson JE. Pb enamel biomarker: deposition of pre- and postnatal Pb isotope injection in reconstructed time points along rat enamel transect. *Environ Res* 2005; 99: 169-176.
23. Simmer JP, Hu JC. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ* 2001; 65: 896-905.
24. Sousa FB, Vianna SS, Santos-Magalhães NS. A new approach for improving the birefringence analysis of dental enamel mineral content using polarizing microscopy. *J Microsc* 2006; 221: 79-83.
25. Uryu T, Yoshinaga J, Yanagisawa Y, Endo M, Takahashi J. Analysis of lead in tooth enamel by laser ablation-inductively coupled plasmamass spectrometry. *Anal Sci* 2003; 19: 1413-1416.

26. Youravong N, Chongsuvivatwong V, Teanpaisan R, Geater AF, Dietz W, Dahlén, G, Norén JG. Morphology of enamel in primary teeth from children in Thailand exposed to environmental lead. *Sci Total Environ* 2005; 348: 73-81.

27. Weidmann SM, Weatherell JA, Hamm SM. Variations of enamel density in sections of human teeth. *Arch Oral Biol* 1967; 12: 85-97.

Figures Legends

Figure 1 – Figure 1A shows a shed upper deciduous central incisor with an adhesive tape in place ready for the enamel microbiopsy procedure. In 1B-1D, SEM photographs show the aspect of the etched enamel after one microbiopsy has been performed (observed as a brighter area), and the adhesive tape used is also shown on top of each tooth.

Figure 2 – A series (A-D) of SEM photographs taken at increasing magnifications (x18, x40, x800, x 2500, respectively) of a shed deciduous tooth. In 2C and 2D, the structure of the enamel prisms is clearly observed.

Figure 3 - Mean values of the areas (mm²) measured in the Rehydrated and Dry Groups.

Figure 4 – A series (A-D) of PM photographs taken at increasing magnifications (A-B in 10X and C-D in 50X) of 100-µm thick enamel slices of shed deciduous teeth. In 4A and 4C, the arrow indicates the cervical microbiopsy border, in 4B and 4D, the arrow indicates the incisal microbiopsy border. The asterisk (*) shows an area with subclinical caries evident as superficial mineral loss.

- 1 **Figure 5** - Distribution of presumed and true depth of each microbiopsy from the
- 2 Rehydrated Group and the distribution of presumed, true and corrected depth of each
- 3 microbiopsy from the Dry Group.
- 4

1 **Table 1** – Enamel negative birefringence ($\times 10^{-4}$) measured at two points underneath the
2 microbiopsy area, and at two points outside the microbiopsy area (one located incisally to
3 the microbiopsy and one located cervically to the microbiopsy area) in 6 teeth. Each value
4 represents the mean of 5 measurements taken at each point (SD)*.
5

Teeth	Underneath Microbiopsy Area		Outside Microbiopsy Area		<i>p</i>
	Incisal point	Cervical point	Incisal point	Cervical point	
1	-7.5 (1.5)	-11.7 (0.3)	-5.6 (0.1)	-5.1 (0.5)	0.1822
2	-13.0 (0.1)	-12.4 (0.1)	-12.0 (0.1)	-7.1 (0.2)	0.3301
3	-3.8 (0.0)	-3.2 (0.2)	-3.5 (0.1)	0.0 (0.0)	0.4282
4	-14.7 (0.4)	-15.7 (0.1)	-14.4 (0.1)	-14.2 (0.3)	0.2196
5	-15.2 (0.3)	-16.8 (0.3)	-12.8 (0.2)	-15.2 (0.3)	0.2999
6	-6.4 (0.4)	-6.1 (0.3)	-5.8 (0.2)	-10.5 (0.3)	0.5044
1-6	-9.0 (0.5)	-8.7 (0.2)	-10.8 (0.1)	-10.3 (0.3)	0.1081

6
7 *SD= Standard Deviation
8
9

Figure 1

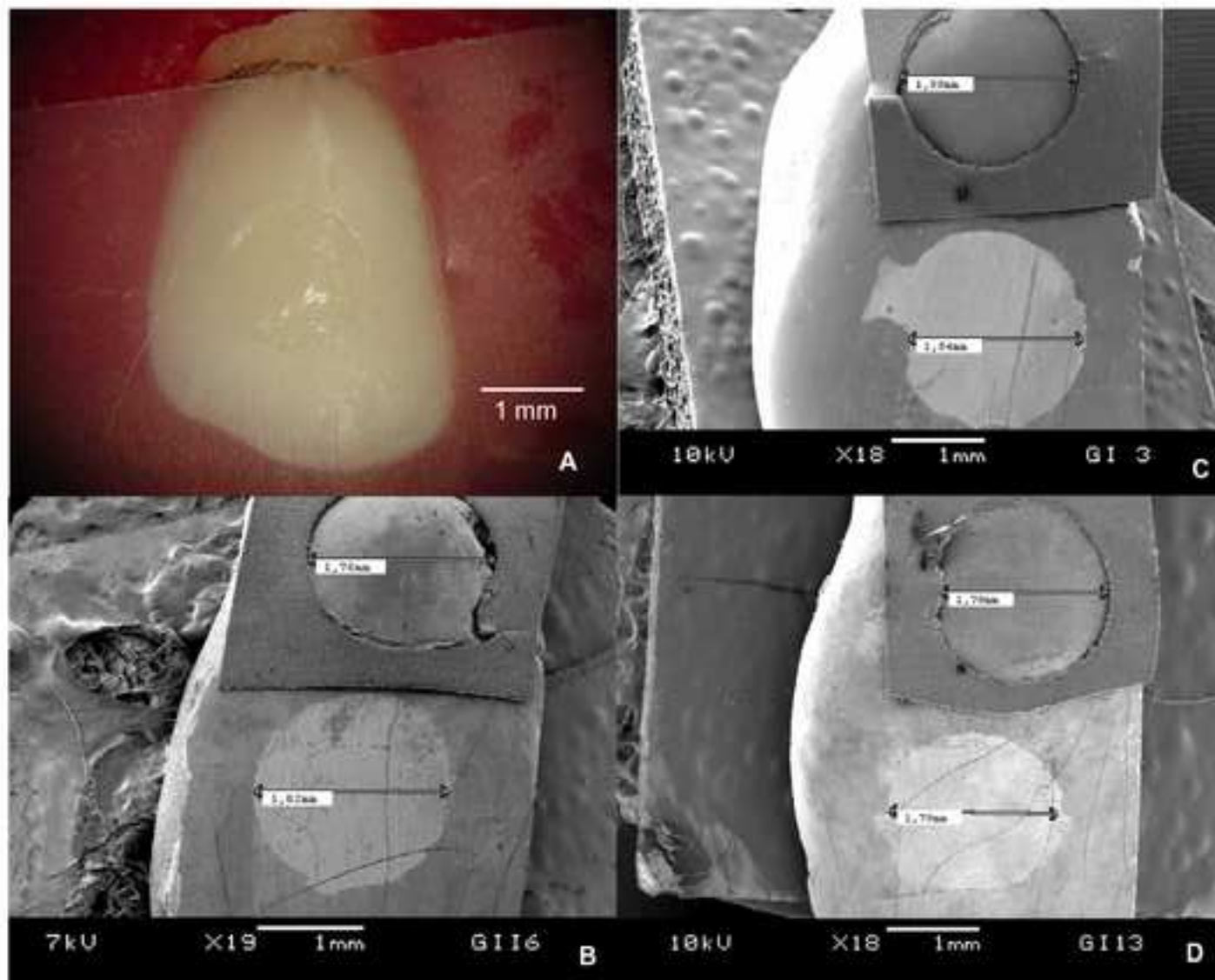


Figure 2

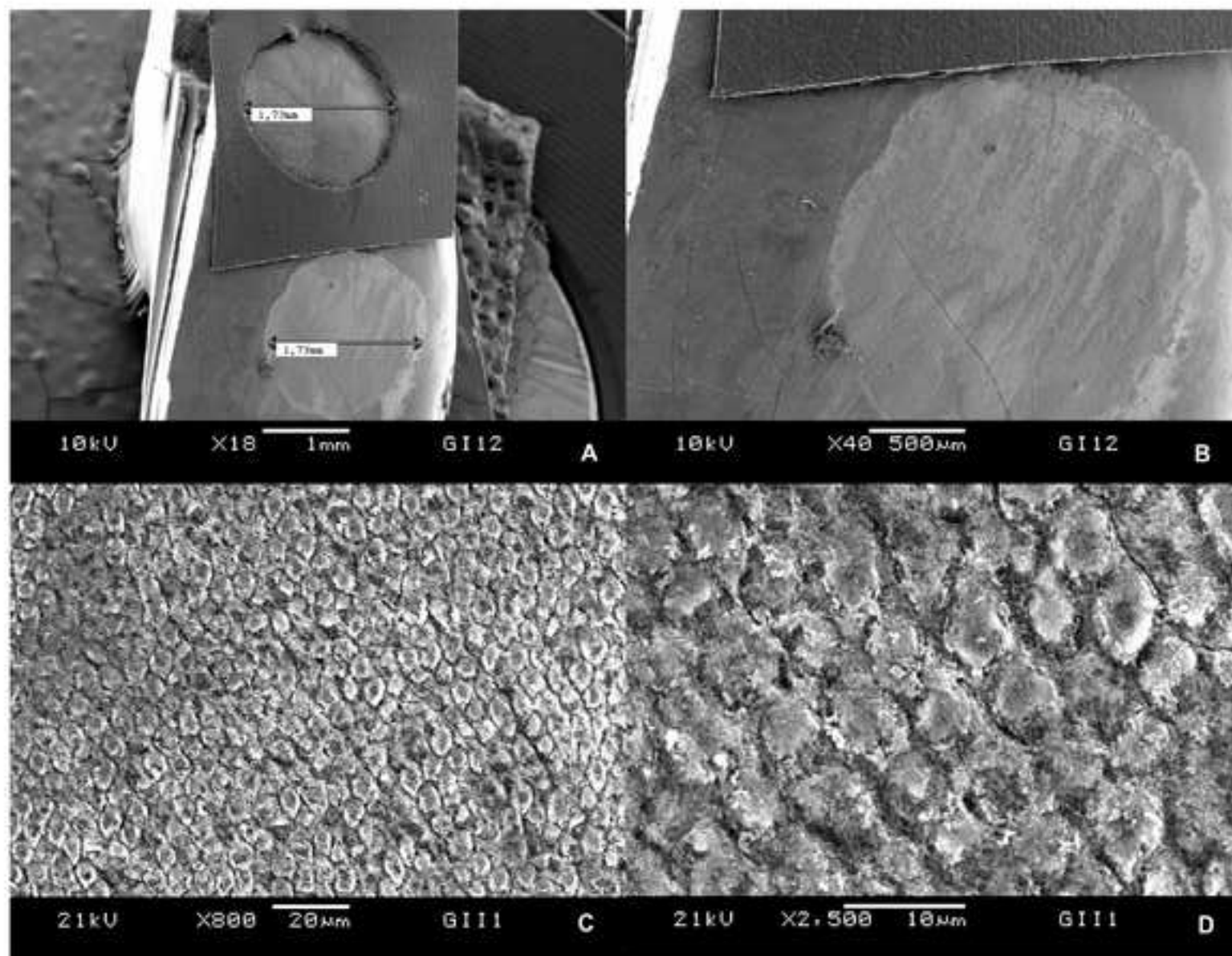


Figure 3:

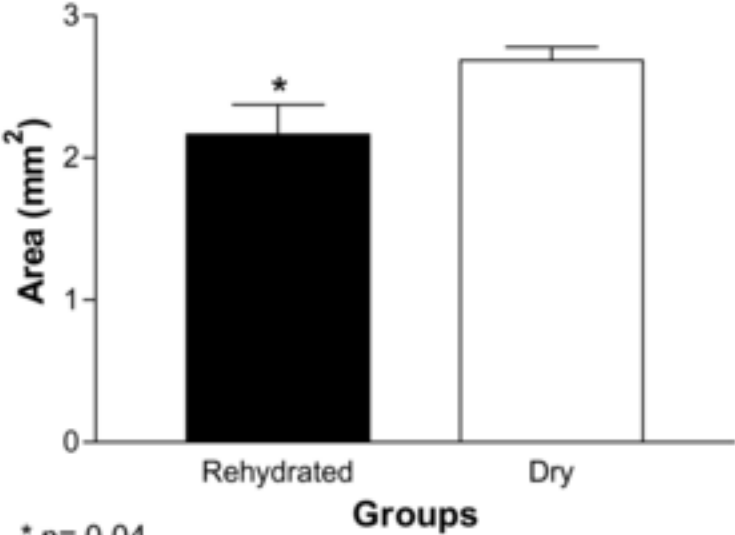


Figure 4

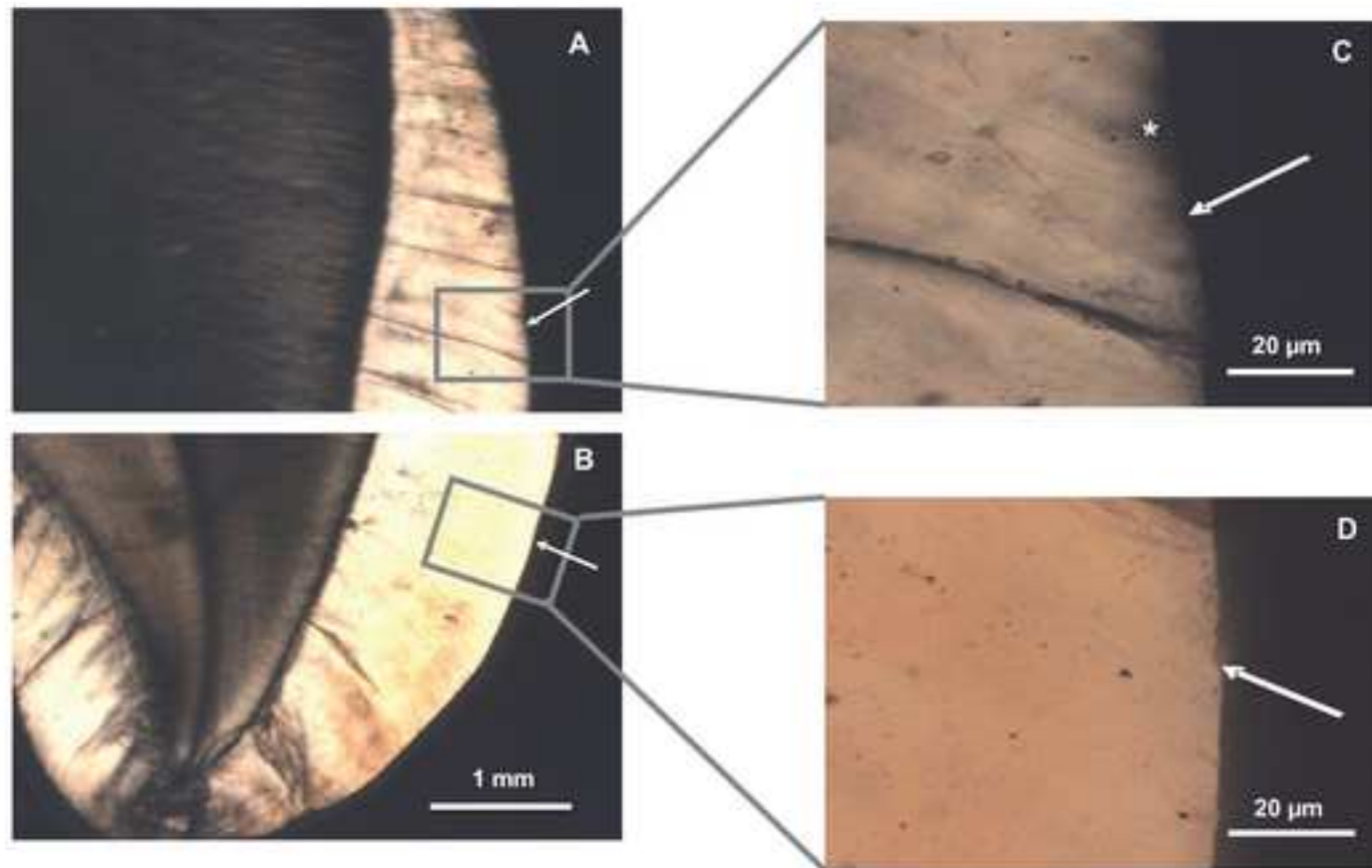


Figure 5:

