

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA**

**PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA
METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO
POLIMORFISMO DA ENZIMA ÁCIDO δ -
AMINOLEVULÍNICO DESIDRATASE NA
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO**

SIMONE MITRI NOGUEIRA

Tese de mestrado submetida à Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em ciências (área de Saúde Pública)

Rio de Janeiro

2003

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública
Curso de Pós-graduação em Saúde Pública

**PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA
METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO
POLIMORFISMO DA ENZIMA ÁCIDO δ -
AMINOLEVULÍNICO DESIDRATASE NA
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO**

Simone Mitri Nogueira

Orientadora: Rita de Cássia de Oliveira da Costa Mattos
Co-orientadores: Joab Trajano da Silva
Vânia Margareth Flosi Paschoalin

Dissertação defendida e aprovada em de de 2003

Pela seguinte banca examinadora:

Mitri, Simone

Padronização e Aplicação de uma Metodologia para Determinação do Polimorfismo da Enzima Ácido δ -Aminolevulínico Desidratase na Avaliação da Exposição ao Chumbo

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública, subárea de Toxicologia. Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz)

1. Chumbo; 2. Ácido δ -aminolevulínico desidratase. 3. Polimorfismo genético; 4. Dissertação.

I. Fundação Oswaldo Cruz;. II. Título

*Este trabalho é dedicado a Deus e a minha
filha. A Deus pela presença constante, nos
momentos de alegria e de tristeza. A minha
filha Carolina pela compreensão,
companheirismo e pela alegria que traz aos
meus dias.*

AGRADECIMENTOS

- ❖ Aos meus pais pelo apoio incondicional, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível.
- ❖ A minha avó Sebastiana, com quem desejo dividir a alegria de cada conquista, pelo muito que lhe devo.
- ❖ A minha orientadora Rita Mattos por ter me acolhido em seu grupo, confiado a mim a realização deste trabalho e, por muitas vezes, ter se comportado não apenas como orientadora, mas como amiga.
- ❖ Aos meus co-orientadores Joab Trajano e Vânia Paschoalin por toda dedicação e apoio dispensados ao meu trabalho.
- ❖ Ao meu amigo e companheiro de bancada Eduardo (Pablo) por sua efetiva participação em todas as etapas deste trabalho (fica tranqüilo que seu nome vai entrar no trabalho!).
- ❖ Aos meus companheiros do CESTEJ que participaram deste estudo de maneira direta (Renata, Marcinha, Helena) ou indireta (Cristiane, Érica, Murata, Carlúcio, João, Ana Cristina, Lucineide, Alan, Elaine, Paula, Mário, Flor, Fátima, Regina, Leandro entre outros).
- ❖ Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica de Leveduras do IQ/CT/UFRJ, Daniele, Alice, Pedro, Renato, Tatiana Amaral (obrigada pelos cafezinhos), Tatiana Figueiredo, Renata, Natália e Gabriel por tornarem as tardes de muito trabalho mais divertidas.
- ❖ Aos meus grandes amigos Rosane, Patrícia, Priscila e Luís, sem a ajuda dos quais não teria sido possível cumprir mais uma etapa. A amizade de vocês é muito importante para mim.

RESUMO

O chumbo é um metal tóxico, de ocorrência natural na crosta terrestre e utilizado desde a antigüidade. A exposição ao chumbo afeta, especialmente, o sistema hematológico, alterando a atividade de enzimas da biosíntese do heme. Uma destas, a ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD), apresenta um polimorfismo, com dois alelos (1 e 2), que, possivelmente, modifica a toxicidade do chumbo no organismo. O objetivo deste trabalho foi padronizar uma metodologia para investigação deste polimorfismo, que possa ser utilizada em estudos de exposição ao chumbo. Para tanto, foram padronizados métodos para extração de DNA, amplificação, purificação e digestão enzimática. Após padronizada, a metodologia foi aplicada em uma amostra populacional de 50 indivíduos, dos quais também foram determinados os níveis de alguns indicadores biológicos. A partir dos resultados da padronização, ficou estabelecida a seguinte metodologia para genotipagem da ALAD: extração de DNA a partir de 1 mL de sangue total, utilizando o *kit GFX Genomic Blood DNA Purification*; amplificação por PCR, com o *kit Ready-To-Go PCR Beads* e os *primers* 5'-AGACAGACATTAGCTCAGTA-3' (senso) e 5'-GGCAAAGACCACGTCCATTC-3' (antisenso); purificação com o *kit GFX PCR DNA/GEL Band Purification*; e digestão do produto com Msp I (7,5 unidades para 1, 5 μ g). A metodologia se mostrou eficiente, específica e sensível para determinação do genótipo da ALAD da população, onde 98% apresentou genótipo ALAD¹⁻¹ e 2%, ALAD¹⁻². Os indicadores apresentaram níveis médios de 4,2 μ g/dL (não expostos) e 70,7 (expostos) para chumbo em sangue; 38,1% (não expostos) e 67,2% (expostos) para recuperação da ALAD; 2,4 μ moles/g Hb (não expostos) e 30,3 μ moles/g Hb (expostos) para zinco protoporfirina eritrocitária; e 0,75 mg/g Cr (não expostos) e 13,66 mg/g Cr (expostos) para ácido δ -aminolevulínico urinário. A metodologia para genotipagem da ALAD padronizada neste trabalho pode ser aplicada para determinação do polimorfismo da enzima em estudos de exposição ao chumbo.

ABSTRACT

Lead is a toxic metal, that has been found in all earthy surface and it has been used since ancient times. This metal impairs the hematological system because it is responsible for the inhibition of heme biosynthesis enzymes. The δ -aminolevulinate dehydratase (ALAD), one of these enzymes, shows a genetic polymorphism, with two alleles (ALAD¹ and ALA²). that according to some authors, can change the lead toxicity in the organism. The main goal of this study was standardize one methodology to investigate the polymorphism of ALAD and it could be used in the lead studies contamination. Assays for DNA extraction, amplification, purification and digestion with Msp1 were standardized. After these steps, the methodology was applied in samples of 50 individuals and the levels of lead biomarkers were also determined. The results of the methodology standardization to ALAD genotyping were: extraction of DNA with 1 mL of total blood using the *GFX Genomic blood DNA purification kit*, amplification by PCR using the *Read to go PCR Beads kit* and the primers 5'-AGACAGACATTAGCTCAGTA-3' (sense) e 5'-GGCAAAGACCACGTCCATTC-3' (antisense). The purification was standardized with *GFX PCR DNA/gel band Purification kit* and the digestion was with Msp1 in the proportion of 7,5 units to 1,5 μ g of DNA. The methodology is efficient, and sensible to determinate the genotype of ALAD of the population, where 98% had presented ALAD¹⁻¹ and 2% ALAD¹⁻². The average levels of lead biomarkers were: 4,2 μ g/dL to Pb-B (no exposed group) and 70,7 μ g/dL (exposed group); 38,1% (no exposed group) and 67,2 % (exposed group) to recovery of ALAD; 2,4 μ moles/g Hb (no exposed group) and 30,3 μ moles/g Hb (exposed group) to ZPP and 0,75 mg/g creatinine (no exposed group) and 13,66 mg/g creatinine (exposed group) to ALA-U. The methodology to ALAD genotyping standardized in this work, could be applied to investigate the polymorphism of enzyme in studies of lead exposure.

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO	1
I.1 – Exposição ao chumbo	1
I.2 – Aspectos toxicocinéticos do chumbo	3
I.2.1 – Absorção	3
I.2.2 – Distribuição	3
I.2.3 – Biotransformação	6
I.2.4 – Eliminação	6
I.3 – Aspectos toxicodinâmicos do chumbo	6
I.3.1 – Neurotoxicidade	7
I.3.2 – Efeitos gastrintestinais	8
I.3.3 – Efeitos renais	8
I.3.4 – Efeitos hematológicos	8

I.3.5 – Efeitos sobre a pressão sanguínea	10
I.3.6 – Efeitos sobre a reprodução e desenvolvimento	11
I.3.7 – Efeitos carcinogênicos e mutagênicos	11
I.4 – Indicadores biológicos de exposição ao chumbo	12
I.4.1 – Chumbo em sangue – Pb-S	12
I.4.2 – Chumbo em osso – Pb-O	13
I.4.3 – Chumbo na urina – Pb-U	13
I.4.4 – Atividade da ALAD	13
I.4.5 – ALA urinário – ALA-U	14
I.4.6 – ALA plasmático – ALA-P	14
I.4.7 – Zinco Protoporfirina Eritrocitária – ZPP	15
I.4.8 – Indicadores de susceptibilidade	15
I.5 – Enzima Ácido δ -aminolevulínico desidratase	17
I.5.1 – Função catalítica	17
I.5.2 – Estrutura	17
I.5.3 – Sítios ativos	18
I.5.4 – Inibição enzimática	19
I.5.5 – Genótipo da ALAD	20
I.5.6 – Polimorfismo da ALAD	21
II – OBJETIVOS	26
II.1 – Objetivos gerais	26
II.2 – Objetivos específicos	26
III. MATERIAL E MÉTODOS	27
III.1 – Equipamentos	27
III.2 – Reagentes	27
III.3 – Padronização da metodologia para determinação do genótipo da ALAD	28
III.3.1 – Extração de DNA genômico	29
III.3.2 – Amplificação de DNA extraído	30
III.3.3 – Purificação do produto de PCR	33
III.3.4 – Digestão com Msp I	33
III.4 - Aplicação da genotipagem da ALAD e determinação dos indicadores biológicos	34
III.4.1 – Amostra populacional	34
III.4.2 – Determinação do genótipo da ALAD	35
III.4.3 – Determinação dos indicadores biológicos	35
III.4.3.1 – Determinação de chumbo em sangue (Pb-S)	35
III.4.3.2 – Determinação de Zinco Protoporfirina Eritrocitária (ZPP)	36
III.4.3.3 – Recuperação da ALAD (%)	36
III.4.3.4 – Determinação de ALA urinário	37
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
IV.1 – Padronização da metodologia para determinação do genótipo da ALAD	39
IV.1.1 – Extração de DNA genômico	39
IV.1.2 – Amplificação de DNA extraído	39
IV.1.3 - Digestão com Msp I	45
IV.1.4 – Seqüência da metodologia padronizada	47
IV.2 – Aplicação da genotipagem da ALAD e determinação dos indicadores biológicos na população	47
IV.2.1 – Características da população	48
IV.2.2 – Determinação do genótipo da ALAD	49
IV.2.3 – Determinação dos indicadores biológicos	52
IV.2.4 – Discussão geral	55
V – CONCLUSÕES	56
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequências genotípica e gênica dos alelos da ALAD em diferentes populações	21
Tabela 2: Características da população	49
Tabela 3: Características do indivíduo que apresentou genótipo ALAD ¹⁻²	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo metabólico de Rabnowitz para o chumbo (1976)	5
Figura 2: Via de biosíntese do heme	10
Figura 3: Dímero da ALAD	18
Figura 4: Seqüência de nucleotídeos do RNAm da ALAD	20
Figura 5: Ponto de mutação da ALAD	22
Figura 6: Sítios de restrição da enzima Msp I no gene da ALAD	22
Figura 7: Esquema seqüencial da metodologia para genótipagem da ALAD	29
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos de PCR do experimento 1	41
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos de PCR do experimento 2	42
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos de PCR do experimento 3	43
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1,3% do produto de PCR do experimento 4	44
Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos de PCR do experimento 5	45
Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1,3% da digestão com Msp I de 5 produtos de PCR purificados	46
Figura 14: Distribuição do genótipo da ALAD na população estudada	50
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1,3% da genotipagem da ALAD de 7 indivíduos	51
Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1,3% da genotipagem da ALAD de 8 indivíduos	52
Figura 17: Gráficos da distribuição dos níveis dos indicadores determinados na população	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ACGIH – American Conference of Governmental Industry Hygienists
 ALA – ácido δ -aminolevulínico
 ALAD - ácido δ -aminolevulínico desidratase
 ALA-P - ácido δ -aminolevulínico plasmático
 ALA-U- ácido δ -aminolevulínico urinário

CEP – Conselho de Ética em Pesquisa
CESTEH – Centro de Estudo da Saúde do Trabalho e Ecologia Humana
Cr - creatinina
DNA – ácido desoxiribonucleico
dNTP – desoxinucleosídeos 5'-trifosfato
DO – densidade ótica
Fago – vírus bacteriófago
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
GABA – ácido γ -aminobutírico
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance
Ht - hematócrito
IBMP – Índice Biológico Máximo Permitido
KDa - kilodalton
n – número de amostras
P5N – pirimidina 5-nucleotidase
pb- pares de base
PBG – porfobilinogênio
Pb-O – chumbo ósseo
Pb-S – chumbo em sangue
Pb-U – chumbo urinário
PCR – Polimerase Chain Reaction
POP – protocolo Operacional Padrão
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
SH – sulfidrila
SNC – Sistema Nervoso Central
 T_m – melting temperature (temperatura de dissociação)
U – unidade de enzima. Para endonucleases de restrição: Quantidade de enzima requerida para digerir completamente 1 μ g de DNA de fago λ , nas condições de temperatura e tampão adequadas.
UV – ultra violeta
ZPP – Zinco Protoporfinina Eritrocitária

I – INTRODUÇÃO

I.1 – EXPOSIÇÃO AO CHUMBO

O chumbo (Pb) é um metal de ocorrência natural na crosta terrestre, classificado como tóxico. Este metal foi um dos primeiros a ser manipulado pelo homem por possuir características como baixo ponto de fusão, durabilidade, ductibilidade e facilidade em formar ligas metálicas (Sheets, 1998).

O chumbo pode ser usado em sua forma pura ou formando compostos com outros elementos químicos. A utilização do chumbo remonta de tempos pré-históricos. Entretanto, foi a partir da revolução industrial que o chumbo começou a ser utilizado em larga escala. Desde então, a contaminação por chumbo tornou-se um problema de saúde pública. O uso extensivo do chumbo pela indústria tem liberado cerca de 300 milhões de toneladas do metal para o ambiente, sendo os últimos 500 anos responsáveis pela maior parte desta poluição (Tong *et al.*, 2000). Diversos ramos da indústria utilizam o chumbo em seus processos de trabalho, calcula-se que em torno de 4000 toneladas do metal sejam usadas por ano em todo o mundo (Hipkins *et al.*, 1998).

Os principais setores de utilização do chumbo são a fabricação e reforma de baterias chumbo-ácidas, incluindo as reformadoras de baterias, reparadoras de radiadores, fundições secundárias e refino de metais, cujos trabalhadores sofrem altos níveis de exposição. Nos países em desenvolvimento, a fabricação de baterias em pequena escala ou operações de reparos são responsáveis pela maioria das intoxicações ocupacionais por chumbo notificadas. Por requerer tecnologia muito simples, este tipo de atividade é muito atrativa, gerando uma economia informal (Goldsberg *et al.*, 1997).

A exposição ao chumbo é caracterizada como ocupacional quando decorre da utilização do metal em alguma etapa do processo de trabalho. No momento, podem ser quantificadas mais de 200 atividades envolvendo a exposição de trabalhadores ao chumbo (Hipkins *et al.*, 1998). E paralela à exposição ocupacional, verifica-se a exposição de populações circunvizinhas às fábricas emissoras do metal para o ambiente (Candela *et al.*, 1998). Estas populações exibem níveis de chumbo em sangue (Pb-S) mais elevados que as populações não expostas (Izmerov, 1998). A exposição ao chumbo também pode ocorrer durante atividades como a demolição e restauração de construções velhas, cujas tintas contenham o metal em sua composição.

O chumbo pode ser encontrado no ar, na água de beber, nos rios, lagos e oceanos, na poeira, no solo e na cadeia alimentar. Portanto a exposição ambiental ao chumbo pode ocorrer pela ingestão de comida ou

água contaminadas, por contato com tintas contendo o metal, pelo ar ou poeira contaminados, sendo algumas vezes proveniente de múltiplas fontes (ATSDR, 1999; Kelada *et al.*, 2001).

O chumbo foi amplamente empregado como aditivo da gasolina (Pb tetraetila) até o ano de 1992, quando este uso foi banido na maioria dos países. Da mesma forma, a quantidade de chumbo acrescida a determinados produtos como tintas, tem sido reduzida nos últimos anos com objetivo de minimizar a exposição (ATSDR, 1999).

Nos últimos vinte anos, os níveis de exposição e, conseqüentemente, os valores de Pb-S da população em geral vêm decaindo significativamente devido às medidas de controle (Lippmann, 1990; ATSDR, 1999). Mas não obstante às restrições quanto ao uso e à redução dos níveis aceitáveis de chumbo no ambiente de trabalho, a exposição ao metal representa, ainda, um sério problema de saúde ocupacional e ambiental, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil (ATSDR, 1999).

I.2 – ASPECTOS TOXICOCINÉTICOS DO CHUMBO

I.2.1 - Absorção

A absorção do chumbo é determinada por sua espécie química, suas características físico-químicas e pela dose, frequência, duração e via da exposição, podendo ser influenciada por fatores como idade, sexo, estilo de vida, estado fisiológico e nutricional e ainda pela susceptibilidade individual do organismo exposto (Alexander *et al.*, 1998).

O chumbo pode ser absorvido por diversas vias, principalmente através dos tratos respiratório e gastrointestinal. No caso das exposições ocupacionais, a via respiratória constitui-se na mais importante

A absorção pela via respiratória é determinada, , enquanto a via digestiva tem maior representatividade em exposições ambientais (Marqués, 1993).entre outros fatores, pela concentração do metal no ambiente, tamanho da partícula e pela ventilação pulmonar. Partículas com diâmetros aerodinâmicos acima de 5 µm são, geralmente, depositadas nas vias aéreas superiores, removidas pelo mecanismo mucociliar e ingeridas, podendo ser absorvidas pelo trato gastrintestinal. A maioria das partículas menores que 1 µm (fumos e vapores de chumbo) são depositadas e absorvidas na região alveolar do pulmão.

A absorção de chumbo pela via dérmica é mínima, salvo se houver ferida local (ATSDR, 1999).

I.2.2 - Distribuição

Uma vez absorvido, o chumbo se distribui rapidamente entre sangue e tecidos moles, de acordo com a intensidade da perfusão sangüínea destes tecidos. No tecido sangüíneo, cerca de 95% do metal encontra-se associado aos eritrócitos, seja na superfície externa de suas membranas ou no meio intracelular ligado à proteínas, como a ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD) e a hemoglobina (Simons, 1993). Os demais 5% de chumbo podem ser encontrados no plasma, de forma livre ou associado à albumina, à γ -globulina e a outros compostos de baixo peso molecular contendo sulfidrilas (SH) (cisteína, hemocisteína e cisteamina), constituindo a fração potencialmente tóxica do metal, que é capaz de alcançar os órgãos e tecidos alvos (Al-Modhefer *et al.*, 1991).

Nos tecidos moles - cérebro, fígado, rim e baço - o chumbo permanece, predominantemente, ligado à proteínas. Complexos formados pelo chumbo e proteínas ácidas denominados corpos de inclusão intranucleares podem ser observados em células do túbulo renal proximal de indivíduos que apresentam neuropatia induzida pelo metal (Bellinger *et al.*, 1987; Fowler, 1989).

O chumbo é redistribuído de acordo com sua afinidade pelos tecidos. Em casos de exposição crônica, cerca de 95% da carga corpórea de chumbo acumula-se nos ossos, onde sua meia-vida é em torno de 20 a 30 anos (Barry, 1975). Apesar da complexidade da distribuição farmacocinética do chumbo no corpo, é fato que o tecido ósseo constitui o principal sítio de estocagem de longo termo, de onde o metal pode ser mobilizado, levando o organismo a uma exposição sistêmica continuada (Smith *et al.*, 1995).

A afinidade entre o chumbo e osso se deve à similaridade de sua valência com a do cálcio. O conteúdo de chumbo no esqueleto não é distribuído homogeneamente. Existem duas frações distintas, uma contida nos ossos trabeculares, e outra nos ossos corticais. (Smith *et al.*, 1995).

Alguns modelos teóricos têm sido propostos para a distribuição do chumbo no organismo. Um desses é o modelo clássico de Rabinowits (1976) (figura 1), que baseado em estudos cinéticos com isótopos estáveis de chumbo (Pb_2O_4), propõem um modelo tricompartimental. No primeiro compartimento, contendo cerca de 4% da carga corpórea total do chumbo, há um rápido fluxo entre o sangue, fluidos biológicos e tecidos moles com meia-vida de aproximadamente 30 dias. No segundo, onde o chumbo apresenta meia-vida de 40 dias a um ano, ocorre um intercâmbio mais lento entre tecidos moles e ossos. O terceiro é formado somente pelo tecido ósseo, onde o tempo de permanência do metal pode ser de quase 30 anos.

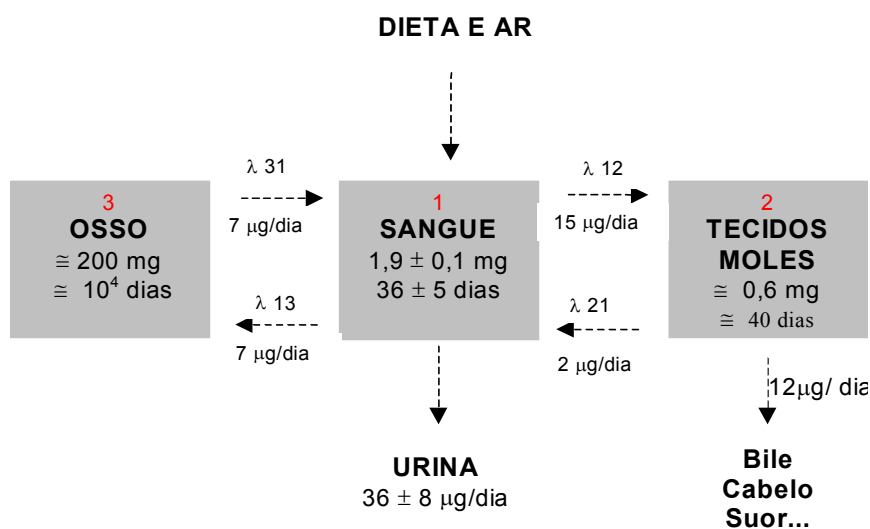


Figura 1: Modelo metabólico de Rabinowitz para o chumbo (1976)

Agentes quelantes têm sido usados terapeuticamente para extrair o chumbo dos tecidos. Estes agentes também são utilizados em estudos sobre estimativas da carga corpórea do metal (Goyer, 1996).

O chumbo possui a capacidade de atravessar a barreira transplacentária, podendo passar do organismo materno para o fetal. Portanto, a exposição da criança pode ter início ainda na vida intra-uterina. O metal também pode ser transferido para a criança através do leite materno (Ong *et al.*, 1993).

A barreira hematoencefálica também pode ser atravessada pelo chumbo. A distribuição pelo sistema nervoso é desigual, com altos níveis no hipocampo e nas amígdalas (Skerfving *et al.*, 1993).

1.2.3 - Biotransformação

O chumbo inorgânico não sofre biotransformação no organismo, mas pode formar complexos reversíveis com proteínas, aminoácidos e pequenos peptídeos tionados. Os compostos orgânicos de chumbo podem ser transformados em metabólitos altamente neurotóxicos. Este metabolismo ocorre no tecido hepático através de reações de desalquilação oxidativa catalisadas pelo sistema microsomal P-450.

I.2.4 - Eliminação

A eliminação do chumbo ocorre principalmente pela via renal, através dos processos de filtração glomerular e reabsorção tubular (Araki *et al.*, 1990). O fluxo urinário pode afetar a excreção urinária do chumbo, segundo o ritmo circadiano. O chumbo pode ser excretado também pela via biliar, possivelmente, complexado ao glutatión (Skerfving *et al.*, 1993).

I.3 – ASPECTOS TOXICODINÂMICOS DO CHUMBO

O chumbo apresenta um amplo espectro de efeitos adversos sobre o organismo, afetando os sistemas cardiovascular, neurológico, gastrointestinal, hematológico, renal e reprodutor. Também está associado ao aumento da pressão arterial e alterações nos níveis séricos da vitamina D (Marqués, 1993). Além do mais, é possível que o chumbo também exerça atividade mutagênica e carcinogênica (Skerfving *et al.*, 1993).

A intoxicação por chumbo é denominada Saturnismo, cujos sinais e sintomas clássicos são: dor abdominal, fadiga, sonolência, cefaléia inespecífica, dores articulares, irritabilidade, impotência sexual, depressão, anorexia, mialgia, tremores, alterações do ritmo intestinal, hipertensão arterial sistêmica e perda de peso (Cordeiro, 1995).

O mecanismo de ação do chumbo ocorre por sua ligação aos grupamentos funcionais de determinadas proteínas (ATSDR, 1999). A interação chumbo-proteína pode acarretar interferências em vias metabólicas importantes, inibição do transporte ativo e aumento da permeabilidade passiva da célula.

I.3.1 - Neurotoxicidade

No sistema nervoso central (SNC) e periférico, o chumbo causa encefalopatia e desmielinização dos neurônios, bem como manifestações neuromusculares conhecidas como paralisia saturnina.

O efeito neurológico mais severo do chumbo em indivíduos adultos é denominado encefalopatia do chumbo, que é caracterizado por uma série de sintomas. Os sintomas da neuropatia periférica provocada pelo chumbo têm início dentro de uma faixa de 40 a 50 µg/dL de Pb-S (ATSDR, 1999).

Vários mecanismos têm sido propostos a fim de explicar a neurotoxicidade do chumbo. Um deles envolve a inibição da enzima ALAD e o conseqüente acúmulo de ácido δ-aminolevulínico (ALA) no

plasma, conhecido agente neuropatogênico (Alexander *et al.*, 1998). O papel do ALA como agente neurotóxico tem se sustentado pelo fato de ser um potente agonista do ácido γ -aminobutírico (GABA) em receptores pré-sinápticos, exercendo um antagonismo competitivo com o neurotransmissor (Wetmur, *et al.*, 1986; Solliway *et al.*, 1994). O chumbo também exerce sua toxicidade sobre o tecido nervoso de maneira direta, podendo iniciar um dano oxidativo, alterando a estrutura dos componentes celulares (Mahaffey *et al.*, 2000)

I.3.2 - Efeitos gastrintestinais

O chumbo afeta a musculatura lisa da parede do tubo gastrintestinal. Efeitos hepáticos também podem ser observados através de um leve aumento dos níveis de algumas enzimas séricas, produzidas no fígado, ou mesmo por necrose hepato-celular (Marqués, 1993).

I.3.3 - Efeitos renais

O chumbo provoca alterações estruturais e funcionais no tecido renal, de modo que podem ser observadas disfunções tubulares, classificadas como nefropatias agudas de efeitos reversíveis e uma nefropatia intersticial crônica irreversível.

I.3.4 - Efeitos hematológicos

O chumbo interfere na via de biosíntese do heme (Figura 2), grupamento constituinte de biomoléculas importantes como a hemoglobina, mioglobina, catalases e citocromos. O chumbo altera a atividade de quatro enzimas do processo: ácido δ -aminolevulínico sintetase (ALAS), ácido δ -aminolevulínico desidratase, coproporfirinogênio oxidase e a ferroquelatase (ATSDR, 1999).

A ALAS, que catalisa a formação do ALA a partir de glicina e succinil coenzima A, é induzida indiretamente pelo chumbo através de um mecanismo de *feedback* negativo. A coproporfirinogênio oxidase é inibida pelo metal, resultando na diminuição da formação de protoporfirina IX. Da mesma forma, o chumbo também exerce inibição sobre a atividade das enzimas ácido δ -aminolevulínico desidratase e ferroquelatase. A ALAD catalisa a formação de porfobilinogênio e, provavelmente, possui um papel regulatório na via (Erskine *et al.*, 2001). A ferroquelatase catalisa a incorporação do íon Fe^{+2} à molécula de protoporfirina IX. As alterações sofridas por estas enzimas resultam em aumento da concentração de ALA plasmático e

urinário, coproporfirina urinária e zinco protoporfirina eritrocitária (ZPP) (Astrin *et al.*, 1987; Skerfving *et al.*, 1993).

O chumbo também afeta o metabolismo de nucleotídeos eritrocitários residuais, pela inibição da enzima pirimidina 5'-nucleotidase (P5N). A inibição desta enzima determina o aparecimento de um ponteados basófilo em hemácias decorrente da deposição de ácidos nucléicos nestas células. Esta interferência causa uma anemia hemolítica, freqüente em casos de intoxicação pelo metal (Marqués, 1993; Marinaki *et al.*, 2001).

O sinal clínico da toxicidade do chumbo sobre o sistema hematológico é uma anemia classificada como hipocrômica e microcítica (Mushak *et al.*, 1989).

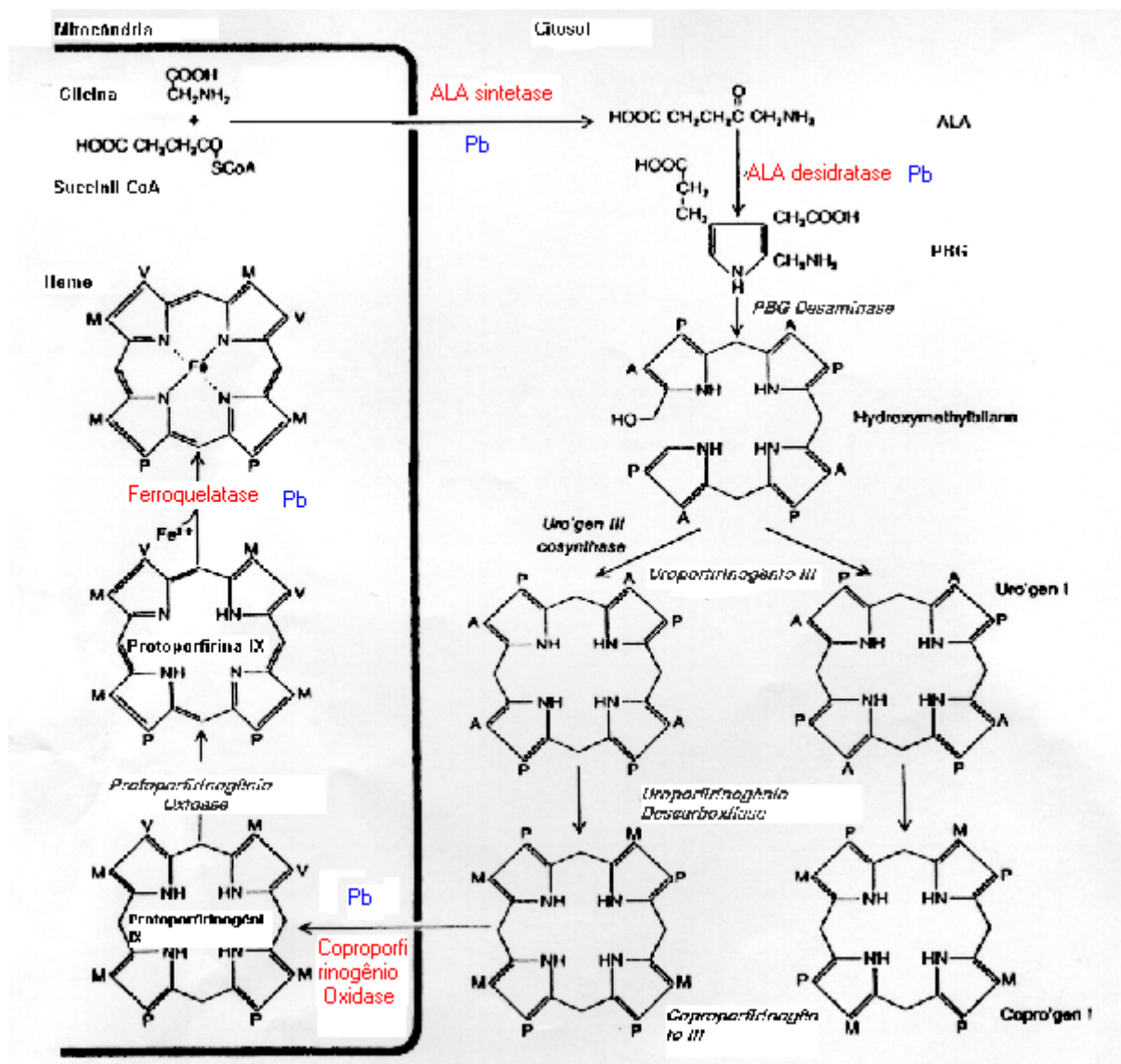


Figura 2: Via de biosíntese do heme

PBG:porfobilinogênio; A: -CH₂COOH; M: -CH₂; P: -CH₂CH₂COOH; V: -CH=CH₂. Fonte: The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 7th Ed. New York, NY: McGraw-Hill Book Company, 1995:2103-2159.

1.3.5 - Efeitos sobre a pressão sanguínea

A exposição ao chumbo pode resultar em elevação da pressão sanguínea, em concentrações iguais ou superiores a 5 µg/dL de Pb-S (De Cort *et al.*, 1987). Este efeito pode ocorrer de forma direta, por alterações na sensibilidade do músculo vascular ou indiretamente por alterações neuroendócrinas (Campbell *et al.*, 1985).

I.3.6 - Efeitos sobre a reprodução e desenvolvimento

O chumbo prejudica o sistema reprodutor masculino alterando a qualidade e quantidade de espermatozoides, podendo também conduzir à impotência sexual.

Em alguns estudos epidemiológicos, mulheres expostas ocupacionalmente ao chumbo apresentam aumento na frequência de hemorragias e de natimortos (ATSDR, 1999).

I.3.7 - Efeitos carcinogênicos e mutagênicos

Embora estudos epidemiológicos realizados em trabalhadores expostos não tenham apontado para efeitos carcinogênicos e mutagênicos, o aparecimento de tumores de rim e cérebro foi reportado em estudos experimentais com animais submetidos a doses altas de chumbo inorgânico. Isso fez com que o chumbo fosse classificado como possível agente carcinogênico para humanos (Skerfving *et al.*, 1993).

De uma maneira geral, testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, não incluem o chumbo como genotóxico. Entretanto tais resultados estão associados à diferenças entre as técnicas utilizadas para avaliação e entre níveis de exposição (Apostoli *et al.*, 1989). Existem evidências sobre a capacidade do chumbo de aumentar a excreção urinária do ácido aminobutírico, o que indica um efeito sobre o metabolismo da timina no DNA. Além disso, alguns efeitos relacionados a abortos, podem ser atribuídos a uma ação genotóxica do metal (Skerfving *et al.*, 1993).

I.4 – INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO

A utilização dos indicadores biológicos têm uma função chave em investigações de avaliação do risco por fornecer informações que podem ser usadas para prever o desenvolvimento de doenças e para implementar programas de prevenção de doenças, sendo considerados ferramentas úteis no processo de monitorização biológica da exposição à substâncias químicas (Bonassi, 2002). Os indicadores biológicos são categorizados da seguinte forma: 1) Indicadores de dose interna, que representam medições da própria substância ou de seus metabólitos em matrizes biológicas; 2) Indicadores de efeito, decorrentes de alterações bioquímicas, fisiológicas ou estruturais, provenientes da interação entre a substância e o organismo; 3) Indicadores de susceptibilidade, que se referem à limitações inerentes à sensibilidade do organismo exposto,

influenciando na capacidade de responder à exposição e nas características desta resposta (Bertazzi *et al.*, 2000).

Os indicadores de dose interna para este metal são representados, principalmente, pelos níveis de Pb-S, chumbo plasmático (Pb-P), chumbo urinário (Pb-U) e chumbo ósseo (Pb-O); e os indicadores de efeito mais comuns são: ALA plasmático (ALA-P) e ALA-U, ZPP e ALAD (Mahaffey *et al.*, 2000).

I.4.1 - Chumbo em sangue – Pb-S

Chumbo em sangue é o indicador de exposição ao chumbo mais utilizado para determinar a entrada de chumbo no organismo. A utilização deste biomarcador é limitada pela meia vida do metal no sangue, em torno de 28-36 dias. Assim, os níveis de Pb-S representam medidas confiáveis da exposição que tenha ocorrido num período de poucas semanas (Rabinowitz *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1995).

I.4.2 - Chumbo em osso – Pb-O

Pb-O representa o melhor indicador de exposição crônica ao chumbo. A análise é comumente realizada pela técnica de fluorescência de raio X. (Smith *et al.*, 1995).

I.4.3 - Chumbo na urina- Pb-U

A quantidade de chumbo excretada na urina tem sido usada como marcador de exposições contínuas. A utilização deste indicador garante vantagens quanto à facilidade de coleta (não invasiva), transporte, manuseio e armazenamento das amostras.

Medidas de Pb-U, seguidas da administração de agentes quelantes podem ser mais adequadas para avaliar a fração biodisponível do chumbo no organismo (Skerfving *et al.*, 1993).

I.4.4 - Atividade da ALAD

A função catalítica da ALAD é um dos primeiros processos bioquímicos afetados pelo chumbo. A atividade da enzima eritrocitária é o indicador de exposição recente ao chumbo mais sensível, por isso, vem sendo utilizada rotineiramente como ferramenta para diagnóstico em casos de suspeita de intoxicação por chumbo em alguns laboratórios clínicos e toxicológicos (Wetmur *et al.*, 1991). A inibição da ALAD é detectada mesmo em baixas concentrações de Pb-S (10µg/dL); em níveis de 15 µg/dL, a atividade da enzima

sofre uma inibição de 50%. A inativação máxima ocorre na faixa de 40 a 60µg/dL de Pb-S (Astrin *et al.*, 1987).

Populações não expostas têm uma ampla faixa de atividade da enzima, sendo que apenas 2% de indivíduos apresentam menos que 50% dos valores normais (Erskine *et al.*, 1999). A atividade da enzima pode ser afetada pelo uso de álcool e cigarro (tabaco) (Onalaja & Claudio, 2000), também por patologias não relacionadas ao chumbo, como cirrose hepática e ainda por uma porfiria hereditária resultante de uma deficiência recessiva da ALAD. Por conta disso, alguns pesquisadores incluem uma etapa de ativação enzimática (ditiotreitol, zinco ou calor) nos procedimentos de análise da atividade da enzima, determinando o percentual de recuperação da ALAD e não sua atividade diretamente (Sakai *et al.*, 1980; Wigfield & Farant, 1981).

A ligação do chumbo à metalotioneínas e a outras proteínas não pertencentes à biosíntese do heme, parece exercer um efeito modulador sobre a inibição da ALAD (Goering & Fowler, 1984). A inativação da ALAD resulta em proporcional acúmulo de ALA no plasma e na urina (Wetmur *et al.*, 1991).

I.4.5 – ALA urinário – ALA-U

A determinação de ALA-U tem sido utilizada como indicador em exposições recentes. Existe uma correlação entre os valores de Pb-S e ALA-U, porém não é linear. A quantidade de ALA excretado na urina aumenta a partir de 35 µg/dL de Pb-S e decresce, lentamente, de maneira proporcional aos níveis de Pb-S, após cessada a exposição (Skerfving *et al.*, 1993).

A influência da variabilidade interindividual nas análises de ALA-U pode ser minimizada pela correção da urina, por exemplo, pela creatinina (Caldeira *et al.*, 2000).

I.4.6 - ALA plasmático – ALA-P

A concentração de ALA-P é o marcador que melhor reflete a toxicidade do chumbo no organismo, pois representa uma medida da fração que potencialmente alcança os órgãos e tecidos alvos (Al-Modhefer *et al.*, 1991).

I.4.7 - Zinco Protoporfirina Eritrocitária - ZPP

A determinação de ZPP tem sido proposta como indicador de exposição alta e recente. Embora não apresente sensibilidade e especificidade suficientes para ser usado como indicador primário de exposição ao

chumbo, sua utilização é crescente junto a outros indicadores (Alexander *et al.*, 1998; Onalaja & Claudio, 2000; Mattos, 2001).

I.4.8 – Indicadores de susceptibilidade

Os indicadores de susceptibilidade são considerados como ferramentas complementares no processo de avaliação de risco, fornecendo dados que podem ser usados para prever o desenvolvimento de doenças e para implementação de programas de prevenção dessas doenças (Bonassi, 2002).

A importância da utilização dos indicadores de susceptibilidade na execução e interpretação de programas de monitorização da exposição de populações à substâncias químicas está na consideração da questão da variabilidade interindividual (Mutti, 1999). As demais classes de indicadores, embora forneçam de maneira precoce informações acerca do processo de desenvolvimento de doenças provenientes de exposições, não levam em consideração os determinantes genéticos que podem conferir susceptibilidade diferenciada a indivíduos sujeitos a níveis de exposição semelhantes. Segundo a American Conference of Governmental Industry Hygienists (ACGIH), a avaliação clínica do indivíduo exposto deve levar em consideração não apenas os sinais e sintomas oriundos das exposições, mas também a susceptibilidade individual conferida por fatores genéticos.

São exemplos de indicadores de susceptibilidade os polimorfismos genéticos de enzimas envolvidas no metabolismo de substâncias tóxicas (Kang, 2001). Pesquisadores de diversas instituições têm investigado genes que, por possuírem múltiplos alelos, determinam polimorfismos metabólicos (Kaiser, 1997; Taioli, 2002).

No momento, duas questões estão envolvidas na limitação do uso dos polimorfismos genéticos como indicadores nos processos de avaliação de risco a compostos tóxicos. Uma delas é a necessidade de maior desenvolvimento metodológico, isto é, de ajustes que garantam maior repetitividade e reprodutibilidade às análises genéticas disponíveis atualmente, ainda pouco adequadas para aplicação nos programas de monitorização deste tipo de exposição (Bertazzi *et al.*, 2000).

A outra questão diz respeito aos aspectos bioéticos envolvidos na manipulação genética. Estudos sobre polimorfismos de enzimas, enquanto teste genético, devem ser conduzidos dentro dos princípios bioéticos de equidade, tendo como objetivo a proteção dos indivíduos contra doenças possíveis de serem desenvolvidas.

Os testes genéticos que envolvem seres humanos devem ser realizados sob determinadas condições, que são listadas a seguir:

- Os indivíduos participantes dos estudos devem ser previamente consultados, recebendo toda informação concernente ao estudo (finalidade, resultados, interpretações, etc.);
- Os dados genéticos relativos aos indivíduos devem ser comunicados somente aos mesmos, sendo vetado acesso a terceiros;
- Deve ser proibida, juridicamente, a seleção de trabalhadores, baseada em critérios genéticos;
- Deve ser vetada a realização de análises genéticas em visitas médicas periódicas.

I.5 – ENZIMA ÁCIDO δ -AMINOLEVULÍNICO DESIDRATASE

I.5.1 - Função catalítica

A ALAD, também conhecida como porfobilinogênio sintetase, é a segunda enzima da via de biosíntese do grupamento heme. Sua atividade catalítica é a condensação assimétrica de duas moléculas de ALA, com a formação de uma molécula de porfobilinogênio, primeiro precursor do heme, porfirinas, clorofilas, citocromos e cobalaminas (Wetmur *et al.*, 1986; Plewinska *et al.*, 1991).

A ALAD, uma enzima citossólica, é expressa em todos os tecidos, sendo seus maiores níveis encontrados nos rins, fígado e sobretudo nos eritrócitos, que sintetizam uma quantidade de heme ordens de grandeza maior que outras células (Fleming *et al.*, 1998; Bishop *et al.*, 1996).

I.5.2 - Estrutura

A ALAD é uma proteína octamérica com peso molecular de 280 Kda, sendo composta por oito subunidades idênticas. A ALAD é uma metaloenzima dependente do zinco, de modo que são necessários dois íons no sítio ativo (em cada subunidade) para a atividade enzimática. A enzima possui um sítio de ligação ao Zn importante para a estabilidade de sua estrutura octamérica (Dent *et al.*, 1990).

Existe alto grau de homologia entre ALAD de diversas fontes (humana, rato, camundongos, *E. coli*, plantas, etc.). As poucas diferenças são, principalmente, concernentes ao cofator metálico, aos parâmetros cinéticos, aos valores ideais de pH, aos inibidores e em relação à suscetibilidade de sofrer oxidação. Embora

todas requeiram um cátion divalente para sua atividade, a enzima animal liga-se ao Zn, enquanto a de plantas utiliza o magnésio. Há representante de ambas em bactérias (Erskine *et al.*, 1999).

1.5.3 - Sítios ativos

Sítio catalítico

Cada monômero da enzima possui dois sítios catalíticos, denominados P e A, onde se ligam duas moléculas do substrato. Cada sítio está localizado na superfície da enzima, possuindo uma lisina ativa e dois Zn (figura 3). Estudos sobre o mecanismo de síntese de porfobilinogênio têm destacado a função de grupamentos SH essenciais, além dos resíduos de lisina nestes sítios (Wetmur *et al.*, 1986; Erskine *et al.*, 1999; Erskine *et al.*, 2001).

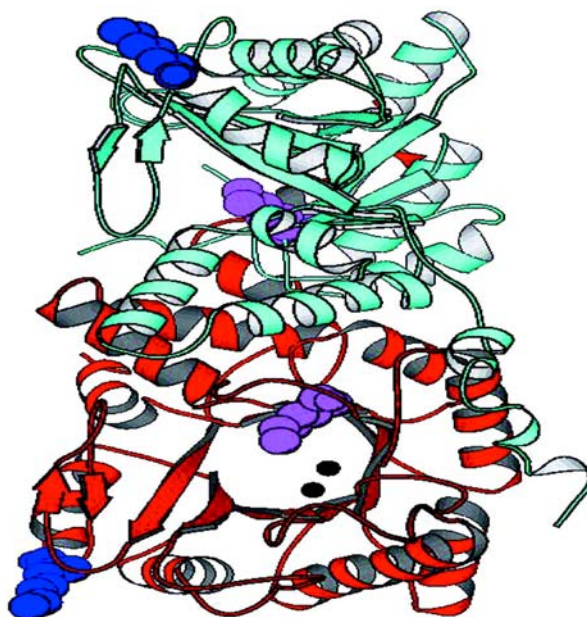


Figura 3: Dímero da ALAD. São mostradas duas subunidades (vermelho e verde). São apresentados no sítio catalítico a lisina ativa (lilaz) e dois íons Zn (preto). O resíduo 59 de lisina envolvido no polimorfismo (azul) também pode ser visto em cada monômero.

Sítio de ligação ao zinco

A ALAD possui um domínio de ligação para o Zn fora do sítio catalítico, que ocorre numa região hidrofóbica situada entre duas regiões hidrofílicas da enzima. Os aminoácidos de 119-132 são os resíduos

potenciais de quelação do metal, onde se destaca a função dos resíduos de cisteína 119, 122 e 132; e de histidina 129. Esta região é bastante conservada entre as espécies, sendo a mesma em camundongos, ratos e humanos (Wetmur *et al.*, 1986; Bishop *et al.*, 1986).

I.5.4 - Inibição enzimática

A atividade da enzima ALAD é inibida por oxidação de seus grupos tiol críticos e por vários metais pesados, inclusive o chumbo (Wetmur *et al.*, 1986).

O chumbo é um potente inibidor da ALAD, que apresenta alta afinidade de ligação ao metal. A inibição ocorre devido à substituição dos íons Zn^{2+} por Pb^{2+} na ligação aos radicais SH do sítio de ligação ao cofator metálico (Goering, 1993). Esta inibição pode ser revertida *in vitro* por incubação da enzima com zinco, com ditioneitol (DTT) ou pelo calor, que têm a capacidade de restaurar as pontes dissulfeto do sítio (Sakai *et al.*, 1980).

Estudos realizados recentemente consideraram a ALAD um dos principais ligantes de chumbo. A afinidade de ligação de diversas proteínas para o chumbo foi testada experimentalmente nestes estudos, não sendo encontrado chumbo ligado a hemoglobina, considerada, até então, o principal ligante do metal nos eritrócitos. A maior quantidade de chumbo ligado foi achada associada a ALAD e a uma outra proteína de baixo peso molecular (Bergdhal *et al.*, 1997; Bergdhal *et al.*, 1998).

I.5.5 - Genótipo da ALAD

A ALAD humana é codificada por um único gene contendo cerca de 16 Kb (figura 4), localizado no cromossomo 9q34. Este gene possui dois alelos co-dominantes: ALAD¹ e ALAD², que apresentam frequência gênica de 0,9 e 0,1 em média, respectivamente (tabela 1). Estes alelos formam três diferentes genótipos: ALAD¹⁻¹, ALAD¹⁻² e ALAD²⁻² (Wetmur *et al.*, 1986).

```

atgcagcccc agtccggttct gcacagcggc tacttccacc cactacttcg ggcttggcag
acagccacca ccaccctcaa tgctccaac ctcatctacc ccatctttgt cacggatggt
cctgatgaca tacagcctat caccagcctc ccaggagtgg ccaggatggt tgtgaagcgg
ctggaagaga tgctgaggcc cttggtggaa gagggcctac gctgtgtctt gatctttggc
gtccccagca gagttcccaa ggacgagcgg gggtccgcag ctgactccga ggagtcccca
gctattgagg caatccatct gttgaggaag accttcccca acctcctggt ggcttgtgat

```

```

gtctgcctgt gtcctacac ctcccatggt cactgcgggc tcctgagtga aaacggagca
ttccgggctg aggagagccg ccagcggctg gctgaggtgg cattggcgta tgccaaggca
ggatgtcagg tggtagcccc gtcggacatg atggatggac gcgtggaagc catcaaagag
gccctgatgg cacatggact tggcaacagg gtatcgggtga tgagctacag tgccaaatth
gcttctgttt tctatggccc tttccgggat gcagctaagt caagcccagc ttttggggac
cgccgctgct accagctgcc cctggagca cgaggcctgg ctctccgagc tgtggaccgg
gatgtacggg aaggagctga catgctcatg gtgaagccgg gaatgcccta cctggacatc
gtgcgggagg taaaggacaa gcaccctgac ctccctctcg ccgtgtacca cgtctctgga
gagtttgcca tgctgtggca tggagcccag gccggggcat ttgatctcaa ggctgccgta
ctggaggcca tgactgcctt ccgcagagca ggtgctgaca tcatcatcac ctactacaca
ccgcagctgc tgcagtggct gaaggaggaa tgatggagga cagtgccagg ccaagaact
agaactttca aacgttcccg gggcctcaga caagtgacaa ccaaagtaaa tgctgctttt
agaactg

```

Figura 4: Sequência de nucleotídeos do RNAm da ALAD

(GenBank™M13928)

Tabela 1: Frequências genotípica e gênica dos alelos da ALAD em diferentes populações

A menor frequência do alelo 2 é observada em população negra.

Populações estudadas	N	Frequência genotípica			Frequência gênica	
		ALAD ¹⁻¹	ALAD ¹⁻²	ALAD ²⁻²	ALAD ¹	ALAD ²
Italianos (Petrucci <i>et al.</i> , 1982)	762	0,81	0,17	0,02	0,90	0,10
Judeus europeus (Astrin <i>et al.</i> , 1987)	872	0,76	0,22	0,02	0,87	0,13
Negros (Astrin <i>et al.</i> , 1987)	115	0,95	0,05	-	0,97	0,03
Hispanicos (Astrin <i>et al.</i> , 1987)	20	0,85	0,15	-	0,92	0,08
Caucasiano (Wetmur <i>et al.</i> , 1991)	428	0,89	0,10	0,10	0,88	0,12
Chineses (Shen <i>et al.</i> , 2001)	229	0,92	0,08	-	0,96	0,04

1.5.6 – Polimorfismo da ALAD

Os polimorfismos genéticos modulando (aumentando ou diminuindo) o risco individual de exposição à substâncias tóxicas têm sido bastante estudados na área da epidemiologia e da genética de

populações. Como tal, o polimorfismo da ALAD tem sido investigado em populações de lugares como Japão, China, Coreia, Europa, África, EUA e Canadá (Kelada *et al.*, 2001; Onalaja & Cláudio, 2000). Entretanto, em países como Brasil, onde os riscos à exposição ao chumbo não são avaliados e controlados, apenas um estudo a respeito foi conduzido até o momento (Souza *et al.*, 1991).

Aspectos moleculares e bioquímicos do polimorfismo da ALAD

A análise da sequência de aminoácidos das isoformas da ALAD demonstra que a diferença entre os polipeptídeos ALAD¹ e ALAD² está na substituição da lisina pela asparagina no resíduo 59, resultante da troca das bases nitrogenadas guanina (G) por citosina (C) na posição 177 da região codificante do gene (figura 5). Esta mutação cria um sítio de restrição Msp I extra, encontrado somente no alelo 2 (figura 6). A digestão de um fragmento de 916 pb, amplificado por PCR da região polimórfica do gene da ALAD, pela endonuclease de restrição Msp I resulta em fragmentos de 582 e 511 pb para ALAD¹ e ALAD², respectivamente, tornando possível identificar o genótipo da enzima.

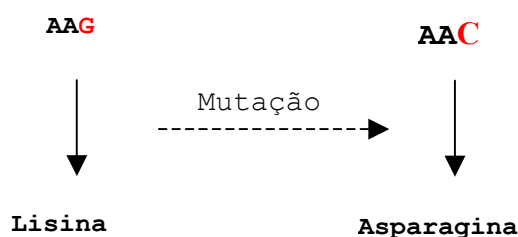


Figura 5: Ponto de mutação da ALAD

ALAD¹ à esquerda e ALAD² à direita. Troca das bases nitrogenadas G→C e a conseqüente substituição do aminoácido lisina (Lys) pela asparagina (Asn).

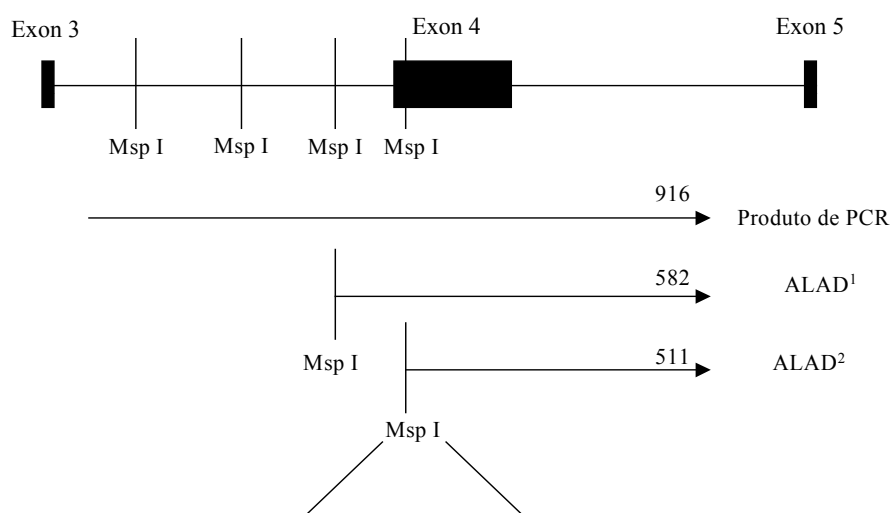


Figura 6: Sítios de restrição da enzima Msp I no gene da ALAD

A enzima Msp I possui um ponto de corte a mais no alelo 2, gerando um fragmento de 511 pb, enquanto no alelo 1, produz um fragmento de 582 pb. O retângulo preto representa a região do exon 4 do gene, e a linha, a região de introns.

Embora o resíduo 59 não esteja situado no sítio de ligação ao cofator metálico ou em suas adjacências, é possível que a substituição altere a conformação quaternária da enzima, aumentando, assim, sua afinidade de ligação ao chumbo (Wetmur *et al.*, 1991).

Devido à troca do aminoácido carregado positivamente (lisina) pelo neutro (asparagina), as três isoenzimas da ALAD, embora tenham a mesma função catalítica, possuem cargas distintas. Sendo assim, indivíduos hetero ou homozigotos para o alelo 2 expressam uma isoforma mais eletronegativa que indivíduos homozigotos ALAD¹ (Battistuzzi *et al.*, 1981; Wetmur *et al.*, 1991). Hipóteses baseadas nesta diferença de cargas elétricas são geradas a fim de sustentar os achados sobre a maior afinidade do alelo 2 pelo chumbo. O genótipo ALAD² codifica uma enzima, que por ser mais eletronegativa, é capaz de ligar íons Pb²⁺ de maneira mais firme que a proteína ALAD¹, podendo reter o metal por um período de tempo maior (Astrin *et al.*, 1987; Kelada *et al.*, 2001).

Alterações na toxicinética do chumbo

Devido a capacidade de reter o chumbo por mais tempo, a isoenzima ALAD² interfere na biodisponibilidade do metal, determinando modificações em seu comportamento toxicocinético (Smith *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1997). Assim, o polimorfismo da enzima pode causar as seguintes alterações em indivíduos portadores do alelo 2:

Hematológicas

- Níveis de Pb-S mais altos, demonstrando a maior permanência do metal no compartimento sangüíneo (Hsieh *et al.*, 2000).
- Níveis de ZPP mais baixos. Provavelmente devido à maior afinidade do chumbo pela ALAD, diminuindo seus efeitos sobre a enzima ferroquelatase (Alexander *et al.*, 1998).
- Menores níveis plasmáticos de ALA. Esta alteração está associada à atenuação dos efeitos neurotóxicos em indivíduos portadores do alelo 2 (Schawartz *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 2000).

Neurotóxicas

- Atenuação dos efeitos neurotóxicos do chumbo. Isto acontece devido a menor fração disponível para o tecido nervoso e do menor acúmulo de ALA-P (Onalaja & Claudio, 2000).

Renais

- Aumento no tempo de retenção renal de chumbo.

A relação entre a ALAD² e a toxicidade renal subclínica pode ser evidenciada por elevados níveis sangüíneos de uréia, ácido úrico e creatinina em indivíduos com genótipo ALAD² (Smith *et al.*, 1995). Schawartz e colaboradores (1997) propõem a hipótese de que a ALAD complexada ao chumbo por maior tempo levaria ao aumento da concentração do metal no rim.

Tecido ósseo

- Concentrações mais baixas de chumbo no osso cortical e mais altas no osso trabecular (esponjoso);
- Redução da taxa de mobilidade óssea do chumbo.

De acordo com Fleming e colaboradores (1998), o genótipo ALAD² modifica a cinética do chumbo no tecido ósseo.

II – OBJETIVOS

II.1 – OBJETIVOS GERAIS

Esta dissertação faz parte de um projeto mais amplo que visa avaliar os diversos aspectos biológicos e ambientais da exposição ao chumbo, desenvolvendo estratégias de monitorização biológica. Este estudo tem como objetivo principal padronizar uma metodologia para determinação do polimorfismo da enzima ALAD, para que este possa ser utilizado como modelo biológico associado aos níveis de indicadores biológicos na avaliação da exposição ao chumbo. Este trabalho também poderá contribuir para estudos de susceptibilidade interindividual ao chumbo.

II.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Padronização de uma metodologia para determinação do genótipo da enzima ALAD baseada na amplificação de uma região polimórfica pela técnica da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) e digestão por enzima de restrição;
2. Aplicação da metodologia padronizada para determinação do genótipo da ALAD em uma amostra populacional;
3. Determinação dos níveis dos indicadores biológicos Pb-S, ALAD, ALA-U e ZPP na amostra populacional.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto onde este estudo está inserido, bem como o questionário e o termo de consentimento foram submetidos ao Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) da ENSP/ FIOCRUZ, recebendo aprovação em 23 de agosto de 2002, parecer 73/02. Este estudo faz parte de um projeto colaborativo com o Laboratório de Bioquímica de Leveduras do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ onde as etapas do desenvolvimento metodológico e de determinação do genótipo foram executadas.

III.1 - EQUIPAMENTOS

- Espectrômetro de absorção atômica Zeeman 5100, *Perkin Elmer*;
- Espectrofotômetro DU-6, *Beckman*;
- Hematofluorômetro 206 D, *AVIV*;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), *Shimadzu*;
- Espectrofotômetro UV-Visível 1601 A, *Shimadzu*;
- Gene Amp PCR System 2400, *Perkin Elmer*;
- Transiluminador 3 UVTM, UVP.

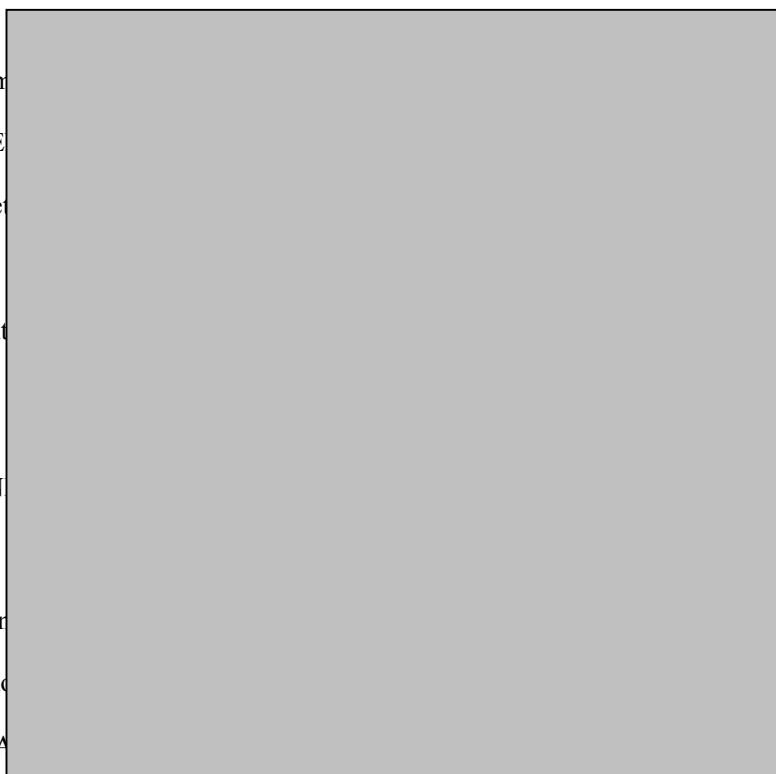
III.2 - REAGENTES

- Padrão de chumbo, *Merck*;
- Ditiotreitól, *Sigma*;
- Cloridrato de ácido δ -aminolevulínico, *Sigma*;
- GFX Genomic Blood DNA Purification Kit, *Amershan Pharmacia Biotec*;
- Read-To-Go PCR Beads, *Amershan Pharmacia Biotec*;
- GFX PCR DNA/Gel Band Purification Kit, *Amershan Pharmacia Biotec*;
- Enzima de restrição Msp I, *Amershan Pharmacia Biotec*;
- Enzima de restrição Ava II, *Amershan Pharmacia Biotec*;
- DNA de fago λ , não metilado, *Amershan Pharmacia Biotec*;

- ❑ Padrão de tam
 - ❑ SYBR GREEN
 - ❑ Brometo de et
 - ❑ *Primers, Life*
- Os demais reagent

III.3- PADRON ALAD

A padron
(1991) modificad
extração do DNA



GENÓTIPO DA

por Wetmur *et al.*
coleta de sangue,
ALAD¹/ALAD²,

purificação do fragmento amplificado, e digestão com a enzima de restrição Msp I (figura 7). Em cada uma das etapas, alguns parâmetros e condições foram testados.

Figura 7: Esquema seqüencial da metodologia para genotipagem da ALAD

Baseada no método de Wetmur *et al.* (1991) modificado por Hsieh *et al.* (2000).

III.3.1 – Extração de DNA genômico

A extração foi realizada através do *kit GFX Genomic Blood DNA Purification*, seguindo protocolo do fabricante. Todos os materiais utilizados na extração foram fornecidos pelo fabricante do kit. As amostras de sangue humano utilizadas foram coletadas por punção venosa. O procedimento para extração a partir de sangue total é descrito a seguir:

Um mililitro de sangue total foi adicionado a 3 mL de solução de lise. A mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 500 rpm durante 2 minutos. Logo após, o sobrenadante foi removido e 500 µL de solução de extração foram adicionados ao sedimento. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, a solução foi transferida para a coluna de extração e centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. O volume eluído foi desprezado e novamente foram adicionados 500 µL de solução de extração na coluna, sendo submetida as mesmas condições de centrifugação anteriores. Após este procedimento, 500 µL de solução de lavagem foram acrescentados à coluna e centrifugada por 3 minutos a 14000 rpm. O volume eluído foi descartado e 150 µL de água destilada e esterilizada foram adicionados à coluna, seguido de incubação durante 5 minutos e centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto. O material extraído foi estocado a –20°C.

Foram testadas duas variações de volume de sangue para a extração, 100 e 1000 µL. A extração feita a partir de 100 µL de sangue foi realizada de maneira idêntica ao procedimento descrito acima, sendo excluída a etapa de lise das células sangüíneas.

Quantificação do DNA extraído

Após a extração, a solução de DNA foi diluída 10 vezes com água e quantificada através da absorvância no comprimento de onda de 260 nm. A concentração de DNA da solução foi determinada a partir da seguinte relação: 1 DO \Rightarrow 50 µg/mL de DNA (Warburg & Christian, 1942)

III.3.2 – Amplificação de DNA extraído

A amplificação foi realizada através da técnica da *Polymerase Chain Reaction* (PCR), utilizando o *kit Ready-To-Go PCR Beads*. Os *primers* utilizados foram 5'-AGACAGACATTAGCTCAGTA-3' (senso) e 5'-GGCAAAGACCACGTCCATTC-3' (antisenso) na concentração de 10 µM (Wetmur *et al.*, 1991).

Para determinação das condições ideais para o PCR, foram realizados cinco experimentos testando variações específicas nas condições. Estes experimentos são descritos a seguir:

Experimento 1

Foram testadas duas quantidades de DNA no meio reacional, 500 ng e 250 ng, provenientes da mesma solução de DNA extraído.

As condições selecionadas no aparelho para este teste foram as seguintes: 40 ciclos de reações, onde cada um constituiu-se de 94°C por 30 segundos (desnaturação de DNA), 58°C por 15 segundos (anelamento) e 72°C durante 1 minuto (extensão).

Experimento 2

Três PCR foram realizados, onde variações nas temperaturas de anelamento foram avaliadas, seguindo as mesmas condições do experimento anterior e utilizando a mesma solução de DNA. As temperaturas testadas foram 60°, 62° e 64°C.

Experimento 3

Os resultados dos experimentos anteriores foram organizados em um protocolo e a repetitividade das condições estabelecidas foi avaliada. Foram testadas 10 amostras de DNA genômico humano no mesmo dia

Experimento 4

Em um mesmo PCR foram testadas três modificações: aumento do tempo de duração da etapa de extensão para 2 minutos, redução do número de ciclos para 35 e da quantidade de DNA para 100 ng.

Com exceção destas alterações, o experimento foi conduzido sob as mesmas condições do anterior.

Experimento 5

A partir dos resultados anteriores foi organizado um protocolo e a repetitividade das condições estabelecidas foi avaliada. Foram testadas 5 amostras de DNA genômico humano no mesmo dia

Protocolo para amplificação

Em tubos plásticos, fornecidos pelo kit, contendo tampão Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, cloreto de potássio 50 mM, cloreto de magnésio 1,5 mM, desoxinucleosídeos 5'-trifosfato (dNTP) 200 µM (de cada tipo de dNTP), estabilizadores incluindo albumina sérica bovina e 1,5 unidades (U) de Taq polimerase, foram adicionados 1 µL de cada *primer*, 100 ng de solução de DNA extraído e água destilada e estéril para completar 25 µL de volume final.

Depois do preparo do meio reacional, os tubos foram submetidos ao PCR no termociclador, sob as seguintes condições: 35 ciclos, 94°C por 30 segundos, 64°C por 15 segundos e 72°C durante 2 minutos. Os produtos amplificados foram armazenados a – 20°C até o momento da análise.

Após cada experimento, foi realizada uma eletroforese para análise do produto amplificado em gel de agarose 1,3% preparado com tampão TAE (Tris-acetato 40 mM/EDTA 1 mM), pH 8,0. As condições da fonte para a corrida foram selecionadas em 85 volts, 220 mA, por 1:45 h. Depois da eletroforese, o gel foi submetido à coloração com brometo de etídeo 0,5 µg/mL (em água destilada). Os tamanhos das bandas foram determinados por comparação com um padrão de tamanho de DNA de 100 pb. Para visualização das bandas foi usado um transiluminador UV, em 302 nm.

III.3.3– Purificação do produto de PCR

A purificação foi feita usando o kit *GFX PCR DNA/GEL Band Purification*, a partir de 100 µL do produto do PCR diluído em água destilada e estéril (1:5), seguindo o procedimento proposto pelo fabricante. Todos os materiais utilizados foram fornecidos pelo fabricante do kit.

Foram adicionados 500 µL do tampão de captura e 100 µL do produto de PCR à coluna, seguido de homogeneização com pipeta. A coluna foi centrifugada a 22400 rpm por 30 segundos e o eluído foi desprezado. Foram acrescentados à coluna 500 µL de tampão de lavagem, que foi novamente centrifugada a 22400 rpm por 1 minuto. Foram aplicados 50 µL de água destilada e estéril à coluna, que após incubação a temperatura ambiente durante 5 minutos, foi submetida à centrifugação por 1 minuto a 22400 rpm. O produto purificado foi coletado em tubos plásticos (de 1,5 mL) e armazenados a – 20° C até análise.

O material purificado foi quantificado da mesma maneira que a solução de DNA extraído, já descrita na seção III.3.1.

III.3.4 – Digestão com Msp I

O fragmento de DNA amplificado e purificado foi tratado com a enzima Msp I, na proporção de 5 U da enzima para 1,0 µg de DNA. O volume final da reação foi de 20 µL, contendo 2 µL de albumina sérica bovina 0,1%, 7,5 U da enzima, 1,5 µL do produto de PCR purificado, 2 µL do tampão (Tris-acetato, 330 mM, pH 7,9, contendo acetato de magnésio 100 mM, ditiotreitól 5 mM e acetato de potássio 660 mM) e água estéril para completar o volume.

A reação ocorreu a 37° C, durante a noite e foi paralisada com 0,4 µL de EDTA 0,5 M, pH 8,0, seguida de incubação por 5 minutos a 65°C. Após a paralisação, 10 µL do produto da reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose nas mesmas condições já descritas na etapa de amplificação. Como padrão foi utilizado DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição Ava II. O gel foi corado com SYBR GREEN (5 µL em tampão TAE), durante 1 hora, sob agitação por inversão. A revelação foi feita em transiluminador UV, no comprimento de onda de 365 nm.

III.4– APLICAÇÃO DA GENOTIPAGEM DA ALAD E DETERMINAÇÃO DOS INDICADORES BIOLÓGICOS

III.4.1 -Amostra populacional

Este estudo foi realizado em um grupo composto por 51 indivíduos adultos, de ambos os sexos, dos quais 3 apresentam um histórico de exposição ocupacional ao chumbo. Em 50 indivíduos desta amostra foi aplicada a metodologia para genotipagem da ALAD desenvolvida neste trabalho. Foram também determinados os níveis dos seguintes indicadores biológicos de exposição ao chumbo: ZPP, recuperação da ALAD, Pb-S e ALA-U.

Um questionário foi aplicado para cada participante do estudo a fim de avaliar os aspectos sócio-econômicos, identificar os possíveis fatores de confundimento e prováveis fontes de exposição ao chumbo.

Para todas as análises, foram coletados em tubos com heparina sódica (especiais para coleta de traços de metais) cerca de 5 mL de sangue através de punção venosa e 25 mL de urina em frascos descontaminados com ácido nítrico 10 %.

III.4.2 - Determinação do genótipo da ALAD

O genótipo da ALAD da população foi determinado de acordo com a metodologia padronizada neste estudo, que será descrita no capítulo de resultados e discussão da padronização da genotipagem.

III.4.3 – Determinação dos indicadores biológicos

As metodologias utilizadas seguiram os Procedimentos Operacionais Padrões estabelecidos no Laboratório de Toxicologia do CESTEH/FIOCRUZ. Para análise estatística foi utilizado o programa SPSS 9.0 para Windows 95.

III.4.3.1 – Determinação de chumbo em sangue (Pb-S)

As alíquotas das amostras de sangue para determinação de Pb-S foram estocadas a -20°C por, no máximo, 15 dias. Toda a vidraria utilizada nesta análise foi tratada previamente com ácido nítrico 10% a fim de evitar possíveis contaminações por metais.

Após descongelado, o sangue foi diluído em Triton X-100 0,1% na proporção 1:20 e os padrões de controle interno foram preparados na proporção de 1:10. A seguir, foram adicionados 10 μL da matriz modificada (modificador: Pd/Mg 150 μL de Pd 1%, 100 μL de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 1% e 750 μL de HNO_3 0,2%). Após este procedimento, 10 μL foram analisados em Espectrômetro de Absorção Atômica, em 283,3 nm com a fenda ajustada a 0,7 nm.

As curvas de calibração abrangeram as faixas de concentração de 0-50 $\mu\text{g}/\text{dL}$ utilizando o sangue matriz, com concentração baixa de chumbo. As curvas analíticas das amostras foram construídas a partir de diluições 1:10 de sangue em Triton X-100 e pela adição de padrões de Pb nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (ppb). Nestas condições, os parâmetros determinados foram: L.D.: 1,88 $\mu\text{g}/\text{dL}$; C.V.(13 $\mu\text{g}/\text{dL}$) 5,9%; fator de conversão de $\mu\text{g}/\text{L}$ para nmol/L : $\times 1/207,19$.

III.4.3.2 – Determinação de Zinco Protoporfirina Eritrocitária (ZPP)

As análises de ZPP foram realizadas no mesmo dia da coleta, com sangue fresco. As amostras de sangue foram agitadas durante 1 hora. Cerca de 50 μL de sangue foram colocados em lâminulas e analisados

em hematofluorômetro, após ajuste utilizando uma lâmina vazia como branco. A leitura foi feita em comprimento de excitação e emissão de 415 nm e 569nm, respectivamente.

Foram utilizados os seguintes controles de calibração: 35 µmoles/g de Hb (baixo), 60 µmoles/g de Hb (médio) e 100 µmoles/g de Hb (alto) da marca *AVIV*, sendo considerado como limite aceitável um coeficiente de variação de 10% (Louro & Tutor, 1994).

III.4.3.3 – Recuperação da ALAD (%)

A análise foi realizada no mesmo dia da coleta, com sangue fresco. Foi seguida uma adaptação dos métodos de Sakai *et al.* (1980) e de Wigfield & Farant (1981). Cada amostra foi preparada e analisada em três tubos diferentes: branco, enzima ativada e enzima inativada, onde foram colocados 100 µL de sangue, 100 µL de água deionizada e 250 µL de Triton X-100 0,1%. Em seguida, os tubos foram agitados durante 1 min e colocados a 0°C, em gelo, por 5 min, para hemólise.

Após este processo, foram adicionados 1mL de DTT 50 mM aos tubos enzima ativada, e 1 mL de água aos demais, seguido de homogeneização por agitação. Depois, foram acrescentados 500 µL de tampão fosfato de potássio 0,3 M, pH 6,4 e 500 µL de ALA 16 mM em todos os tubos. Após 1 hora de incubação a 37° C, a reação foi paralisada com 1 mL de solução de ácido tricloroacético 0,37 M e cloreto de mercúrio 0,59 M.

Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e 1 mL do sobrenadante foi incubado com 1 mL de reativo de Erlich's (2g de dimetilaminobenzaldeído, 5 mL de ácido perclórico, 5 mL de água destilada e ácido acético glacial até completar o volume final de 50 mL) à temperatura ambiente durante 45 min.

A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro, 555 nm. Foi utilizado o seguinte cálculo para determinação do percentual de recuperação da ALAD:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(A - I)}{A} \times 100$$

Sendo

A – atividade da ALAD ativada


I – atividade da ALAD inativada

III.4.3.4 – Determinação de ALA urinário (ALA-U)

As amostras de urina foram mantidas a -20°C até o momento da análise. A 1 mL de urina foram adicionados 0,2 mL de ácido acético 60% e 2 mL de n-butanol. Foram acrescentados 500 μL de tampão fosfato de potássio 1 M, pH 6,8 e 100 μL de metilacetoacetato a 500 μL da fase aquosa. A mistura foi aquecida a 100°C por 10 minutos. Após resfriamento em gelo por 3 min, 50 μL foram injetados no equipamento.

Foi utilizada uma curva padrão com cloridrato de ALA nas concentrações de 2,5, 5, 10, 20 e 40 mg/L.

A Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) foi realizada em coluna de fase reversa C18 (15 cm \times 4,6 mm) nas seguintes condições operacionais: loop: 50 μL ; fase móvel: acetonitrila/ KH_2PO_4 50 mM, pH 2,5 na proporção de 20:80; fluxo: 1,0 mL/min; temperatura de 40°C e detecção espectrofotométrica em 260 nm.



IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 - PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DA ALAD

Nesta etapa serão apresentados e discutidos os resultados encontrados nas avaliações realizadas para padronização da metodologia de genotipagem da ALAD.

IV.1.1 - Extração de DNA genômico

O kit *GFX Genomic Blood DNA Purification* mostrou-se eficiente para extração de DNA genômico a partir de sangue total, alcançando um rendimento médio de 9,2µg/150µL (volume eluído da coluna de extração). Embora este valor não seja alto, fornece quantidades de DNA suficiente para posterior utilização na etapa de amplificação por PCR. Como volume adequado para extração ficou estabelecido 1 mL de sangue total, pois a partir deste volume, são obtidos 150 µL de solução final de DNA, volume de material suficiente para quantificação, amplificação e estoque de DNA extraído. O volume inicial de 100 µL de sangue total, também testado, atinge rendimentos semelhantes, mas fornece um volume menor de material extraído (70 µL), com o DNA em menor quantidade e mais diluído.

IV.1.2 - Amplificação do DNA extraído

Toda a manipulação dos reagentes durante o preparo do meio reacional foi feita em fluxo laminar previamente descontaminado com um produto a base de glutaraldeído.

Primers

Os oligonucleotídeos 5'-AGACAGACATTAGCTCAGTA-3' (senso) e 5'-GGCAAAGACCACGTCCATTC-3' (antisenso), usados como *primers*, se mostraram apropriados para amplificação do fragmento de 916 pb do gene da ALAD, tendo hibridizado corretamente com a seqüência alvo do DNA. A concentração dos *primers*, bem como o volume utilizado, seguiram as indicações do protocolo do fabricante do kit usado, sendo desnecessárias alterações nestas variáveis.

Experimento 1

As quantidades de DNA testadas neste experimento foram baseadas no protocolo de amplificação do segmento de 916 pb do gene da ALAD realizada por Hsieh *et al.* (2000). As reações foram realizadas com duas quantidades diferentes de DNA molde, nas condições descritas para o experimento 1.

Os resultados podem ser vistos na figura 8. Embora a presença de bandas de 916 pb demonstre a amplificação do fragmento esperado, nestas condições são observadas outros produtos de amplificação, indicando a ocorrência de hibridização inespecífica dos *primers*. Este efeito foi maior na concentração de DNA de 500 ng (raia 2). Por ter apresentado maior inespecificidade e significar mais gasto do material extraído, a utilização desta quantidade de DNA molde foi descartada a partir deste experimento.

A massa de 250 ng de DNA, embora também tenha favorecido o aparecimento de bandas inespecíficas, foi usada para otimização do ensaio.



Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos de PCR do experimento 1

Quantidade de DNA para o PCR. Raias 1 e 6: padrão de tamanho de fragmentos de DNA de 100 pb; raia 2: 500 ng de DNA molde e raia 3: 250 ng de DNA molde.

Experimento 2

Com objetivo de aumentar a especificidade do PCR, nesta etapa da otimização foi variada a temperatura de anelamento, sendo mantidas constantes todas as outras condições, inclusive a massa de 250

ng de DNA.

Os resultados demonstram que a especificidade esperada foi alcançada somente quando se utilizou a temperatura de anelamento de 64°C (figura 9).

Na etapa de anelamento ocorre a hibridização entre os *primers* e a seqüência alvo do DNA. Estes resultados concordam com o fato de que elevando-se a temperatura de anelamento até um determinado limite, temperatura de dissociação (T_m), a possibilidade de ocorrência de hibridizações inespecíficas diminui.

A partir destes resultados, a temperatura de 64°C foi estabelecida como temperatura de anelamento apropriada para o PCR.



Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos de PCR do experimento 2

Teste de aumento da temperatura de anelamento. Gel A - raia 1: padrão de tamanho de fragmentos de DNA de 100 pb; raia 2: 60° C e raia 3: 62° C. Gel B – raia 1: padrão de tamanho de fragmento de DNA de 100 pb e raia 2: 64°C.

Experimento 3

A repetitividade dos parâmetros estabelecidos foi testada para a mesma amostra e para amostras diferentes de DNA genômico humano, objetivando melhor avaliar as condições estabelecidas. Para esta avaliação foram utilizadas 10 amostras diferentes.

A figura 10 mostra que das dez amostras testadas, apenas duas (raias 2 e 4) foram amplificadas de forma específica. Estes resultados demonstram que, apesar das condições estabelecidas a partir dos experimentos anteriores mostrarem-se apropriadas para o PCR de uma amostra de DNA, não são adequadas para aplicação em estudos epidemiológicos. Uma provável explicação para o fato é a variabilidade genética

individual, que não pode ser desconsiderada neste tipo de estudo.

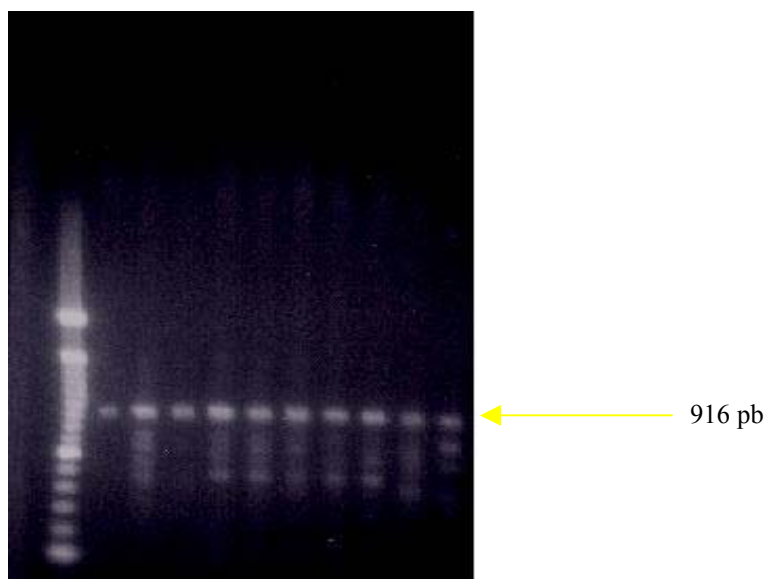


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos de PCR do experimento 3
Avaliação das condições estabelecidas. Raia 1: padrão de tamanho de fragmentos de DNA de 100 pb; raia 2-10: amostras testadas.

Experimento 4

A presença de bandas inespecíficas encontrada na maioria das amostras amplificadas por PCR, com o uso das condições descritas para o experimento 3, provavelmente se deve ao excesso de DNA molde adicionado ao meio reacional. Neste experimento foram conduzidas modificações com objetivo de aumentar a especificidade do PCR para o fragmento esperado. A especificidade pode ser aumentada diminuindo-se a quantidade de molde ou reduzindo-se o número de ciclos, se a eficiência de amplificação dos fragmentos inespecíficos é menor. Por outro lado, as bandas não esperadas, de tamanho menor que a banda específica podem ter ocorrido devido a presença de fragmentos incompletos na reação. Assim, o tempo de duração da etapa de extensão foi elevado para 2 minutos para permitir a síntese completa. O número de ciclos e a quantidade de DNA foram reduzidos para 35 e 100 ng, respectivamente.

A figura 11 demonstra que as alterações feitas nos parâmetros citados possibilitaram uma amplificação eficiente e específica do segmento esperado, conforme é demonstrado pela presença de banda única de tamanho relativo a 916 pb, correspondente ao fragmento da ALAD contendo o sítio polimórfico (Wetmur *et al.*, 1991; Nomiya *et al.*, 1999).



Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1,3% do produto de PCR do experimento 4
Alterações nas condições: 100 ng de DNA; 35 ciclos de reações e 2 minutos de temperatura de extensão.
Raia 1: padrão de tamanho de fragmento de DNA de 100 pb.

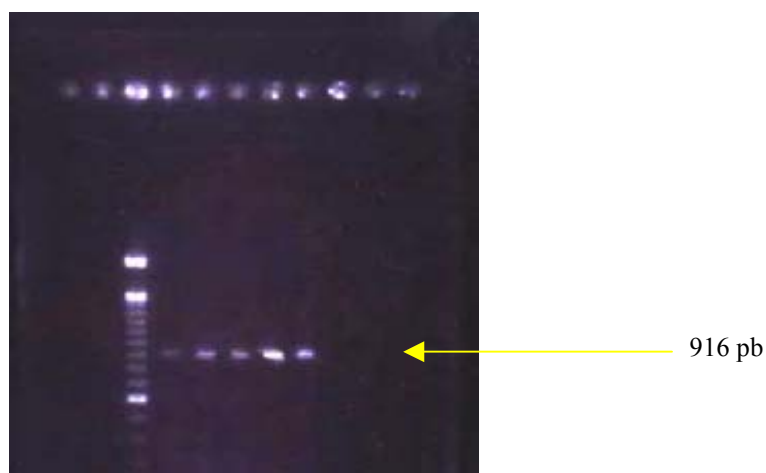
Experimento 5

As condições modificadas no experimento 4 foram avaliadas para diferentes amostras de DNA, da mesma forma que foi feito no experimento 3 para avaliar a repetitividade dos parâmetros testados.

De acordo com os resultados obtidos (figura 12), as modificações testadas nos experimento 4 mostraram-se mais apropriadas para ampliações do segmento esperado de amostras diferentes de DNA.

Pode ser observado que as cinco amostras de DNA testadas foram amplificadas da forma esperada. A ausência de bandas inespecíficas, bem como a presença de banda única de tamanho correspondente a 916 pb, demonstra a eficiência das condições testadas.

Com base nestes resultados, ficaram estabelecidas as seguintes condições para realização do PCR para amplificação do fragmento de 916 pb do gene da ALAD: 35 ciclos, constituindo-se de 94°C por 30 segundos, 64°C por 15 segundos e 72°C por 2 minutos; utilizando 100 ng de solução de DNA.



IV.1.3 - Digestão com Msp I

A digestão dos produtos de PCR purificados, obtidos a partir da amplificação e purificação de cinco amostras de DNA é mostrada na figura 13.

O aparecimento da banda em 582 pb, correspondente ao alelo 1 do gene ALAD (Wetmur *et al.*, 1991), mostra que a Msp I foi capaz de reconhecer seu sítio de restrição na seqüência alvo e clivar a molécula neste ponto específico. A ausência de banda correspondente ao tamanho do fragmento inteiro de 916 pb demonstra que a enzima foi capaz de digerir o segmento completamente, nas condições de digestão utilizadas.

Baseado nestes resultados, as condições utilizadas neste experimento foram consideradas adequadas para digestão do fragmento referido, ficando estabelecidas para esta etapa da genotipagem da ALAD.

A endonuclease Msp I possui alguns sítios de restrição no gene da ALAD. A mutação ocorrida na região do exon do gene cria um ponto de corte a mais no alelo 2, determinando o polimorfismo da enzima. A digestão do alelo 1 e do alelo 2 pela endonuclease resulta em fragmentos de 582 e 511 pb, respectivamente. Portanto, indivíduos homocigotos para o alelo 1 apresentam genótipo ALAD¹⁻¹, homocigotos para o alelo 2, ALAD²⁻² e heterocigotos possuem genótipo ALAD¹⁻² (Wetmur *et al.*, 1991).



IV.1.4 – Seqüência da metodologia padronizada

A metodologia padronizada apresentou resultados semelhantes aos encontrados por Wetmur *et al.* (1991) e Hsieh *et al.* (2000) mostrando-se específica e sensível, podendo ser empregada em estudos de base populacional. O procedimento metodológico será sucintamente descrito a seguir. As alíquotas de sangue total foram estocadas a 4° C por 24 h. O DNA das amostras foi extraído a partir de 1 mL de sangue total usando o kit proposto na padronização. O PCR foi realizado seguindo as condições estabelecidas, 35 ciclos: 94°C por 30 segundos, 64°C por 15 segundos e 72°C por 2 minutos; utilizando 100 ng de solução de DNA como molde e 1 µL de cada *primer*. O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 1,3%.

Depois de purificados, os produtos de PCR foram incubados com a enzima Msp I a 37°C, durante a noite. A reação foi paralisada com 0,4 µL de EDTA 0,5 M, pH 8,0, seguida de incubação por 5 minutos a 65°C. Os produtos desta reação foram fracionados em gel de agarose 1,3% para determinação dos alelos ALAD¹ e ALAD². As bandas foram submetidas à coloração com *SYBR GREEN* e seus tamanhos determinados por comparação com DNA de fago λ digerido com Ava II.

IV.2– APLICAÇÃO DA GENOTIPAGEM DA ALAD E DETERMINAÇÃO DOS INDICADORES BIOLÓGICOS NA POPULAÇÃO

Nesta seção serão relatados os resultados encontrados na aplicação da metodologia da genotipagem da enzima ALAD e avaliação dos indicadores biológicos na amostra populacional. Este estudo é parte de um projeto mais amplo de desenvolvimento de estratégias de intervenção ambiental e biológica na exposição ao chumbo. Neste sentido, a busca de novos indicadores e modelos de estudo, de elevada sensibilidade e especificidade, é de suma importância, pois pode determinar um novo método de avaliação. A avaliação

epidemiológica é uma etapa fundamental para um estudo de validação destes indicadores e modelos biológicos (Schulte, 1991).

Tais estudos devem seguir protocolos de validação que considerem desde a padronização da metodologia e seleção da amostra até o controle dos fatores de confundimento (Schulte, 1991). É essencial também que os resultados encontrados sejam comparados aos níveis de outros indicadores biológicos já validados, ampliando a discussão sobre limite biológico de exposição e limite de tolerância.

Determinar a diferença entre valores normais e anormais destes indicadores e modelos é fundamental para se avaliar o grau de exposição de determinada população. Além disto, é através desta relação que se estabelecem os valores de referência das substâncias químicas nas populações estudadas.

IV.2.1 – Características da população

O grupo selecionado para a aplicação da metodologia foi composto de indivíduos adultos, de ambos os sexos, residindo em diferentes localidades, todas com saneamento básico e coleta de lixo. A princípio, a população em estudo não apresenta nenhuma exposição ao metal, com exceção de 3 indivíduos expostos ocupacionalmente, que fazem parte de um grupo que já vem sendo avaliado em um trabalho do CESTEHE (Mattos, 2001). As informações sobre a população obtidas a partir do questionário estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Características da população

Dados obtidos a partir do questionário aplicado, aprovado pelo CEP/ENSP.

<i>Características</i>	<i>Definição</i>
<i>Sexo</i>	
Masculino	41%
Feminino	59%
<i>Idade</i>	19 – 51 anos
<i>Exposição ao chumbo</i>	
Expostos	5,9%
Não expostos	94,1%
<i>Hábito de beber(álcool)</i>	39,2 %

<i>Hábito de fumar</i>	27,5%
<i>Nível de escolaridade</i>	
1º grau (incompleto)	9,8%
2º grau	31,4%
3º grau	58,8%

Para uma completa avaliação da exposição à substâncias químicas, levando em consideração, inclusive, os possíveis determinantes de susceptibilidade, é necessário que se tenha uma amostragem representativa da população em geral, formando assim uma população referencial, onde se utilizam indivíduos de diferentes categorias sócio-econômicas, buscando ser o mais abrangente possível (Apostoli, 1999).

IV.2.2 – Determinação do genótipo da ALAD

Pode ser observado através da figura 14, que 98% da população apresentou genótipo ALAD¹⁻¹ e 2% genótipo ALAD¹⁻², não sendo encontrados indivíduos homozigotos para o alelo 2. A tabela 3 mostra as características do indivíduo que apresentou o genótipo ALAD¹⁻². Na tabela 1 (seção I.5.5) são apresentadas as freqüências genótípicas da ALAD de várias populações. Petrucci *et al.* (1982), encontraram freqüências de 0,81, 0,17 e 0,02, respectivamente para os genótipos 1-1, 1-2 e 2-2 em população italiana. Para população chinesa, Shen *et al.* (2001) encontraram freqüências de 0,92 para ALAD¹⁻¹, 0,08 para ALAD¹⁻², não encontrando homozigotos ALAD²⁻². O estudo conduzido por Astrin *et al.* (1987), em uma população negra de 115 indivíduos, encontrou freqüências do genótipo da ALAD semelhantes as encontradas neste estudo. Da mesma forma, Souza *et al.* (1991) determinando a freqüência do genótipo ALAD em uma população de 519 indivíduos do estado da Bahia, não encontrou o alelo 2 em indivíduos negros desta população. Assim, pode ser observado que a amostra populacional estudada neste trabalho, apresenta o mesmo comportamento reportado pela literatura. A mais baixa freqüência do alelo 2 pode ser explicada, talvez, por uma possível origem européia deste alelo, estando presente em outras populações somente como resultado de cruzamentos interraciais.

A determinação da freqüência genotípica da ALAD realizada neste trabalho não é conclusiva, devido ao tamanho da amostra da população, sendo necessário, portanto, a realização de estudos com amostragem ampliada.

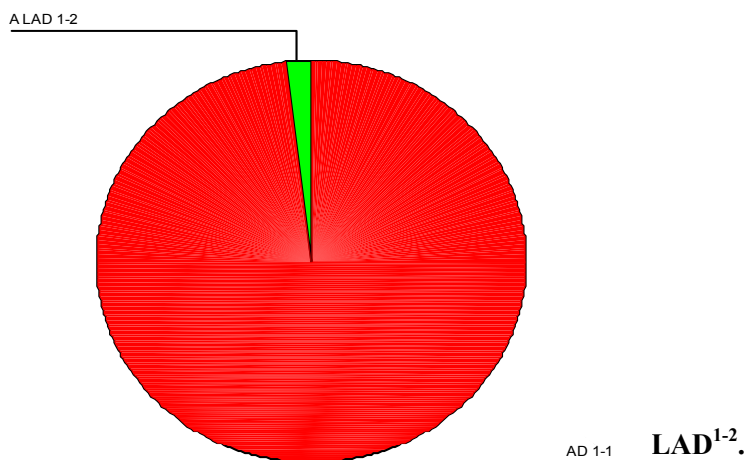


Tabela X: ca

Figura 14: Distribuição do genótipo da ALAD na população estudada

ALAD¹⁻¹ (vermelho) – 98%; ALAD¹⁻² (verde) – 2%.

Idade	42 anos
Exposição ao chumbo	Não exposto
Nível de escolaridade	1º grau
Hábito de beber (álcool)	Sim
Hábito de fumar (tabaco)	Sim
Cor	Branca

Nas figuras 15 e 16 são apresentados os resultados da genotipagem de 15 amostras. Pode ser observado na figura 15 que todos os indivíduos possuem o genótipo ALAD¹⁻¹, demonstrado pelo aparecimento da banda em 582 pb e ausência de banda em 511 pb. A figura 16 apresenta a genotipagem do indivíduo heterozigoto para o alelo 2 (ALAD¹⁻²) com a presença de bandas em 582 pb e 511 pb. O restante dos indivíduos nesta figura não apresentam bandas em 511 pb.

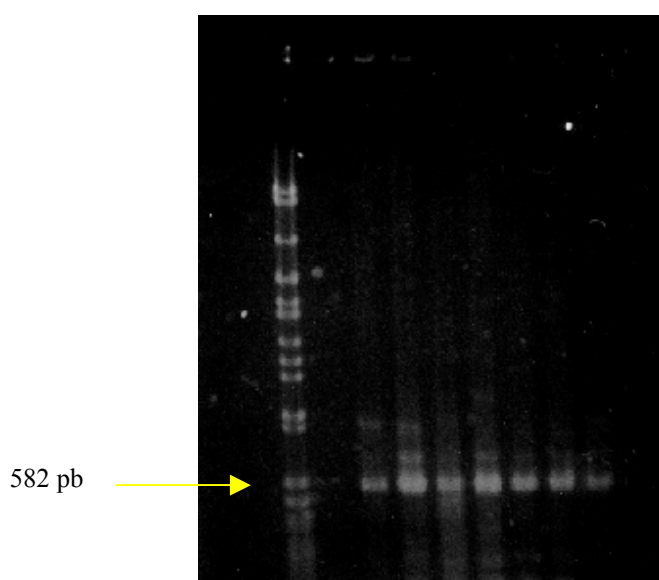


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1,3% da genotipagem da ALAD de 7 indivíduos
 Digestão com Msp I dos produtos de PCR purificados (7 amostras). Raia 1: padrão de tamanho de

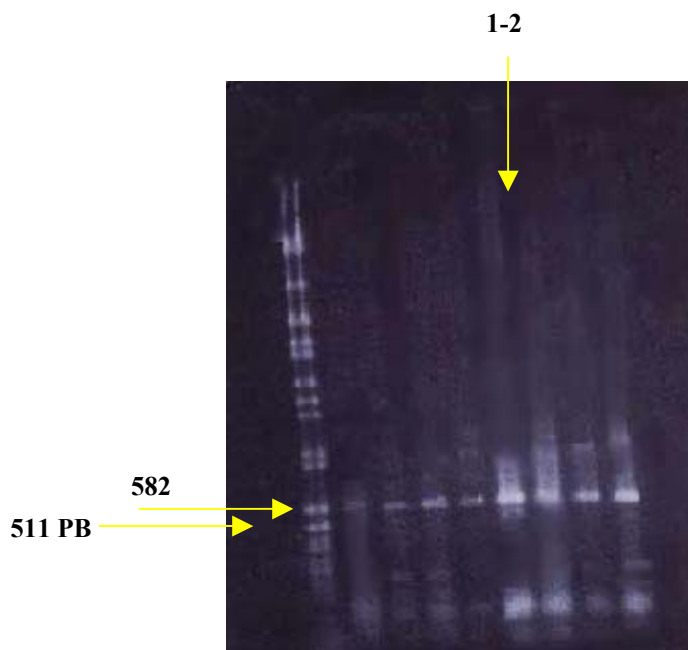


FIGURA 16: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,3% DA GENOTIPAGEM DA ALAD DE 8 INDIVÍDUOS

Digestão com Msp I dos produtos de PCR purificados (8 amostras). Raia 1: padrão de tamanho de fragmento de DNA (DNA de fago λ digerido com Ava II); raias 2-9: amostras. Raia 5: genótipo ALAD¹⁻

17.2.3 – Determinação dos indicadores biológicos

Os indicadores biológicos têm uma importante aplicação na avaliação de risco à substâncias químicas. As etapas associadas a este processo podem ser descritas como: identificação do perigo, análise da relação dose-resposta, determinação da exposição e a caracterização do risco. A utilização destes, acontece principalmente nas etapas de determinação da exposição, onde ocorrem a quantificação e a identificação da contaminação, e na caracterização do risco, onde se avalia o risco à saúde para determinado grupo. Portanto, é interessante que se determine os níveis de um conjunto de indicadores biológicos para que a real situação de exposição possa ser avaliada.

Um estudo desenvolvido no CESTEH por Mattos (2001) com população exposta ao chumbo, encontrou correlações bastante significativas entre os indicadores de dose interna e de efeito para o total de trabalhadores avaliados e também para os indivíduos apresentando acima de 27,6 $\mu\text{g/dL}$ de Pb-S ($p < 0,01$). Em níveis mais baixos, também foram encontradas correlações

significativas entre os indicadores ($p < 0.05$). Estes resultados demonstram a alta sensibilidade destes indicadores de efeito (ALA-U, ZPP e % de recuperação de ALAD) para avaliar a exposição ao chumbo.

Os gráficos da figura 17 mostram a distribuição dos níveis dos indicadores biológicos de exposição ao chumbo avaliados na amostra populacional. Os gráficos mostram a mediana, o intervalo interamostral e os valores discrepantes. Os resultados são apresentados para não expostos ($n=48$) e expostos ($n=3$). Foram determinados os níveis de um indicador de dose interna (Pb-S) e de três indicadores de efeito (ALA-U, % de recuperação de ALAD e ZPP). O grupo não exposto apresentou níveis médios dos indicadores semelhantes aos valores encontrados em outros estudos (Caldeira *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 1999; Mattos, 2001). Os valores médios para este grupo são: Pb-S - $4,2 \mu\text{g/dL}$ ($\pm 2,3$); ZPP- $2,4 \mu\text{moles/g Hb}$ ($\pm 2,0$); % de recuperação de ALAD- $38,1 \%$ ($\pm 12,3$); ALA-U- $0,75 \text{ mg/g Cr}$ ($\pm 0,47$). Os três indivíduos expostos foram avaliados separadamente por possuírem histórico de exposição ocupacional e alterações nos níveis dos indicadores biológicos. Os níveis de Pb-S ($70,7 \mu\text{g/dL} \pm 14,8$) e de ALA-U ($13,66 \text{ mg/g Cr} \pm 10,9$) estão acima dos Índices Biológicos Máximos Permitidos (IBMP) pela legislação brasileira (Pb-S= $60 \mu\text{g}/100\text{mL}$; ALA-U= 10 mg/g Cr - NR-7 aprovada pela portaria 3214 de 1978 do Ministério do Trabalho e reeditada como portaria da SSST em 1994). Os valores médios para ZPP ($30,3 \mu\text{moles/g Hb} \pm 13,9$) e % de recuperação de ALAD ($67,2 \% \pm 9,88$) também demonstram uma alta exposição.

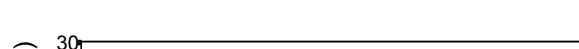
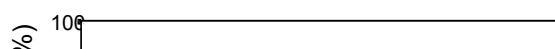
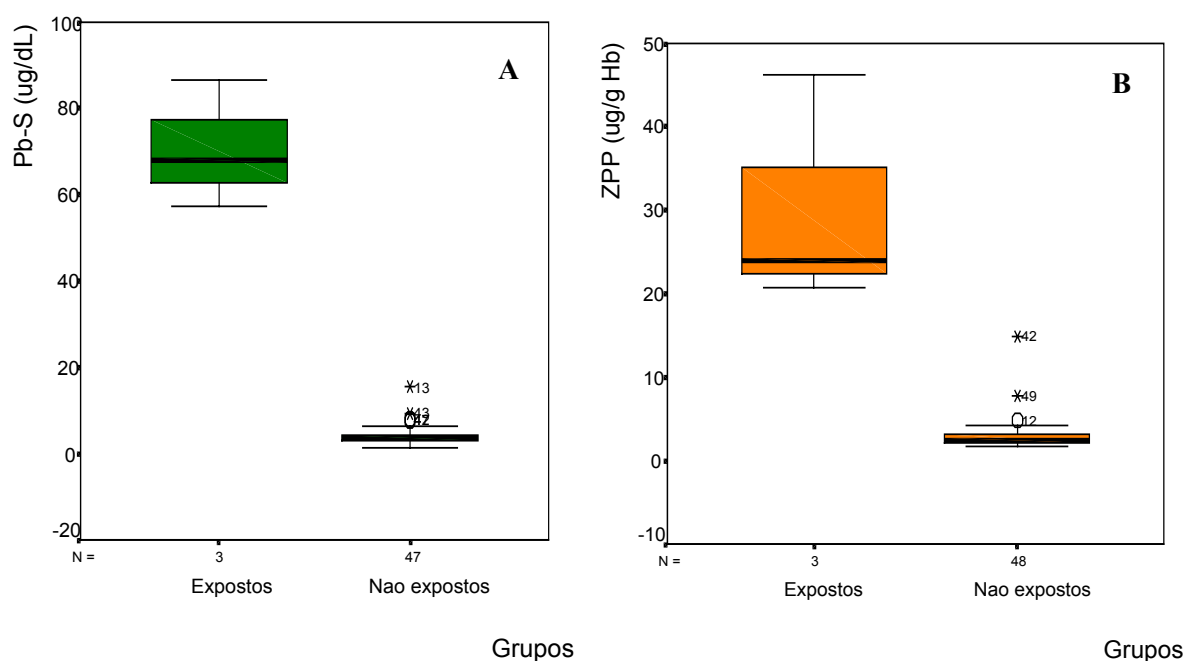


Figura 17: Gráficos de distribuição dos níveis dos indicadores determinados na população

A: Pb-S; B: ZPP; C: % recuperação da ALAD; D: ALA-U. São apresentadas a mediana, o intervalo interamostral e os valores discrepantes, sendo separados em não expostos (n=48) e expostos (n=3). Valores médios para o grupo não exposto: Pb-S = 4,2 µg/dL, ZPP = 2,4 µnoles/g Hb, ALAD (%) = 38,1% e ALA-U = 0,75 mg/g Cr; para o grupo exposto: Pb-S = 70 µg/dL, ZPP = 30,3 µnoles/g Hb, ALAD (%) = 67,2% e ALA-U = 13,66 mg/g Cr.

IV.2.4 - Discussão geral

A padronização de metodologias para a determinação de modelos biológicos e indicadores de exposição é fundamental para a confiabilidade dos resultados dos processos de avaliação de risco. Este estudo avaliou parâmetros metodológicos para estabelecer uma técnica de genotipagem da enzima ALAD. A metodologia foi aplicada em uma população, mostrando ser específica, sensível e adequada para estudos epidemiológicos.

A avaliação de risco deve ser conduzida de maneira ampla, conjugando os diversos aspectos envolvidos na determinação da exposição. Os fatores genéticos que conferem susceptibilidade diferenciada a indivíduos expostos a níveis semelhantes de determinada substância química devem ser considerados e avaliados em conjunto com os indicadores biológicos, bem como com as observações clínicas. Este estudo é uma etapa inicial que objetiva fornecer ferramentas para o estabelecimento do polimorfismo da ALAD como um modelo biológico de exposição, através do qual se possa investigar a susceptibilidade genética ao chumbo.

V - CONCLUSÕES

- ❖ Os principais parâmetros testados para a padronização da metodologia para determinação do genótipo da ALAD foram estabelecidos da seguinte forma: um mililitro como volume de sangue total para extração de DNA genômico humano; 100 ng de DNA como molde para o PCR realizado com 35 ciclos, 94°C por 30 segundos (desnaturação do DNA), 64°C por 15 segundos (hibridização) e 72°C por 2 minutos (extensão); e digestão de 1,5 µg do produto de PCR purificado com 7,5 U de enzima Msp I;
- ❖ A metodologia padronizada para genotipagem da enzima ALAD demonstrou ser específica, sensível e adequada para estudos de base populacional, podendo ser aplicada para determinação do polimorfismo da enzima;
- ❖ O polimorfismo da enzima ALAD pode ser utilizado como um modelo biológico nas avaliações da exposição ao chumbo, pois fornece dados concernentes à susceptibilidade interindividual que podem ser usados para elaboração de medidas de prevenção. Esta avaliação deve ser conduzida em conjunto com a determinação dos níveis de indicadores biológicos de exposição;
- ❖ A frequência genotípica da enzima ALAD encontrada na amostra populacional utilizada mostrou comportamento similar aos estudos reportados pela literatura. Entretanto, para ser conclusiva deve ser desenvolvida em uma população maior.

VI-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AITIO, A. & KALLIO, A., 1999. Exposure and Effect Monitoring: A Critical Appraisal of their Practical Application. *Toxicol. Lett.* **108**: 137-147.

ALEXANDER, B. H. et al., 1998. Interaction of Blood Lead and δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype on Markers of Heme Sintesis and Sperm Production in Lead Smelter Workers. *Environ. Health. Perspect.* **106**: 213-216.

- AL-MODHEFER, A. J. A., BRADBURY, M. W. B. & SIMMONS, T. J. B., 1991.** Observations on the Chemical Nature of Lead in Human Blood Serum. *Clin. Sci.* **81**:823-829.
- APOSTOLI, P., LEONE, R., PORRU, S., et al., 1989.** Urinary Mutagenicity Tests in Lead-exposed Workers. *Mutat. Res.* **222**: 245-251.
- APOSTOLI, P., 1999.** Application of Reference Values in Occupational Health. *Int. Occup. Environ. Health.* **72**: 191-194.
- ARAKI, S., SATA, F., KATSUYUKI, M., 1990.** Adjustment for Urinary Flow Rate and Improvement Approach for Biological Monitoring. *Int. Arch. Environ. Health.* **62**: 471-477.
- ARAÚJO, U., PIVETTA, F. R., MOREIRA, J. C., 1999.** Avaliação da Exposição Ocupacional ao Chumbo: Proposta de uma Estratégia de monitorização para a Prevenção de efeitos Clínicos e Sub-clínicos. *Caderno de Saúde Pública.* **15**(1): 123-131.
- ASTRIN, K. H., BISHOP, D. F., WETMUR, J. G., KAUL, B. C. et al., 1987.** Aminolevulinic Acid Dehydratase Isozymes and Lead Toxicity. *Ann NY Acad Sci.* **514**: 23-29.
- ATSDR. Toxicological Profile for Lead, 1999.** Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- BAGHURST, P. A., Mc MICHAEL, A. J. & WIGG, N. R., 1992.** Environmental Exposure to Lead and Children's Intelligence at the Age of Seven Years: The Port Pirie Cohort Study. *N. Engl. J. Med.* **327**: 1279-1280.
- BARRY, P. S. I., 1975.** Comparison of Concentration of Lead in Human Tissues. *Br. J. Ind. Med.* **32**: 119-139.
- BATTISTUZZI, G., PETRUCCI, R., SILVAGNI, L., URBANI, F. R., et al. 1981.** δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase: A New Genetic Polymorphism in Man. *Ann. Hum. Genet.* **45**: 223-229.
- BELLINGER, D. C., LEVITON, A., WATUNAUX, C. et al., 1987.** Longitudinal Analyses of Prenatal Lead Exposure and Early Cognitive Development. *N. Engl. J. Med.* **316**: 1037-1043.

- BERGDAHL, I. A., GERHARDSSON, L., ANDREJS, S., 1997.** δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Polymorphism: Influence on Lead Levels and Kidney Function in Human. *Archives of Environmental Health*. **52**(2).
- BERGDAHL, I. A., GRUBB, A., SHUTZ, A., DESNICK, R. J., et al., 1997.** Lead Binding to δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase (ALAD) in Human Erythrocytes. *Pharmacol. Toxicol.* **81**: 153-158.
- BERGDAHL, I. A., SHEVELEVA, M., SHUTZ, A., ARTAMONOVA, V. G. & SKERFVING, S., 1998.** Plasma and Blood Lead in Humans: capacity-limited Binding to δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase and Other Lead-binding Components. *Toxicol.Sci.* **46**: 247-253.
- BERTAZZI, P. A., TOFFOLETTO, F., PESATORI, A. C.** Problemi Etici Del Monitoraggio Biológico in Advances in Occupational Medicine (Aggiornamenti in medicina Occupazionale. 1. Pavia, Maugeri Foundation Books. 2000.
- BISHOP, T. R., MILLER, M. W. BEALL, J., ZON L. et al., 1986.** Genetic Regulation of δ -aminolevulinate Dehydratase During Erythropoiesis. *Nucleic Acids Research*. **24** (13): 2511-2518.
- BONASSI, S. 2002.** Biomarkers in Molecular Epidemiology Studies for Health Risk Prediction. *Mutat. Res.* **511**(1):73-86.
- CALDEIRA, C., MATTOS, R. C. O. C., MEYER, A., et al., 2000.** Applicability Limits of Urinary δ -Aminolevulinic Acid as a Screening Test to Evaluate Professional Intoxication by Lead. *Caderno de Saúde Pública*. **16**(1): 225-230.
- CAMPBELL, B. C., MEREDITH, P. A., SCOTT, J. J., 1985.** Lead Exposure and Changes in the Renin-angiotensin-aldosterone System in Man. *Toxicol. Lett.* **25**: 25-32.
- CANDELA, S., FERRI, F., OLMÍ, M., 1998.** Lead Exposure in the Ceramic Tile Industry: Time Trends and Current Exposure Level. *Ann. Inst. Super Sanita.* **34**(1):137-43.
- CORDEIRO, R., 1995.** Quando Começa o Saturnismo?. Tese Doutorado, São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

- DE CORT, W., VERSHOOR, M. A., WILBOWO, A., VAN HEMMEN, J. J., 1987.** Occupational Exposure to Lead and Blood Pressure: a Study of 105 Workers. *Am. J. Ind. Med.* **11**: 145-156.
- DENT, A. J., BEYERSMANN, C. B., HASNAIN, S. S., 1990.** Two Different Zinc Sites in Bovine 5-Aminolevulinate Dehydratase Distinguished by Extended X-ray Absorption Fine Structure. *Biochemistry.* **29**: 7822-7828.
- ERSKINE, P. T., NORTON, E., COOPER, J. B., LAMBERT, R. et al. 1999.** X-ray Structure of 5-Aminolevulinic Acid Dehydratase from *Escherichia Coli* Complexed with the Inhibitor Levulinic Acid at 2,0 Å Resolution. *Biochemistry.* **38**: 4266-4276.
- ERSKINE, P. T., NEWBOLD, R., BRINDLEY, A. A., WOOD, S. P., et al. 2001.** The X-ray Structure of Yeast 5-Aminolevulinic Acid Dehydratase Complexed with Substrate and Three Inhibitors. *J. Mol. Biol.* **312**: 133-141.
- FLEMING, D. E. B., CHETLE, D. R., WETMUR, J. G., DESNICK, J. P. R., BOULAY, D., RICHARD, N. S., GORDON, C. L., WEBBER, C.E., 1998.** Effect of the δ -Aminolevulinate Dehydratase Polymorphism on the Accumulation of Lead in Bone and Blood in Lead Smelter Workers. *Environmental Research. A* **77**: 49-61.
- FOWLER, B. A., 1989.** Biological Roles of High Affinity Metal-binding Proteins in Mediating Cells Injury. *Comments Toxicol.* **3**:27-46.
- GOERING & FOWLER, 1984.** Regulation of Lead Inhibition of Ala-D by a Lower Molecular Weight, High Affinity Renal Lead-binding Protein. *J. Pharm. Exp. Ther.* **231 (1)**: 66-71.
- GOERING, P. L., 1993.** Lead-Protein Interaction as a Base for Lead Toxicity. *Neurotoxicology.* **14**:45-60.
- GOLDSBERG, M., LEVIN, S. M., DOUCETTE, J. T., GRIFFIN, G., 1997.** A Task-based Approach to Assessing Lead Exposure Among Iron Workers Engaged in Bridge Rehabilitation. *Am. J. Ind. Med.* **31(3)**:310-318.

- GOYER, R. A.** Toxic Effects of Metals. In: Klassen CD, ed. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 5ª edição. New York, NY: McGraw-Hill Book Company, 1996. 691-736.
- HIPKINS, K. L., MATERNA, B., KOSNETT, M. J., ROGGE, J. W., CONE, J. E., 1998.** Medical Surveillance of the Lead Exposed Worker. Current Guidelines. *AAOHN. J.* **46(7)**: 330-339.
- HSIEH, L. L., LIOU, S. H., CHEN, Y. H., TSAI, L. C., TSANN, Y., WU, T. N., 2000.** Association Between Aminolevulinate Dehydratase Genotype and Blood Lead Levels in Taiwan. *J.O. E. M.* **42(2)**: 151-155.
- IZMEROV, NF., 1998.** Assessment of Effects of Lead on Humans. *Med. Tr. Prom. Ekol.* **12**: 1-4.
- KANG, D. H., 2001.** Molecular and Genetic Epidemiology. *Exp. Mol. Med.* **21(33)(Suppl. 1)**:73-82.
- KELADA, S. N. SHELTON, E., KAUFMANN & KHOURY, M. J., 2001.** Human Genome Epidemiology (HuGE) Reviews. δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype and Lead Toxicity: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology.* **154(1)**: 1-13.
- LIPPMANN, M., 1990.** Lead and Human Health: Background and Recent Findings. *Environ. Res.* **51**: 1-24.
- MAHAFFEY, K., MCKINNEY, J. & REIGART, J. R.** Lead and Compounds. In: Lippmann M, Ed. Environmental Toxicants, Human Exposures and Their Health Effects. 2ª ed. New York, NY: John Wiley and Sons, Inc, 2000. 481-521.
- MARINAKI et al., 2001.** Genetic Basis of Hemolytic Anemia Caused by Pyrimidine 5' Nucleotidase Deficiency. *Blood.* **97 (11)**: 3327-3332.
- MARQUÉS, F. M., 1993.** Plomo: Criterios toxicologicos Actuales para la Vigilancia Medica de Trabajadores Expuestos. Madrid: Instituto Nacional de Seguridade Higiene en el Trabajo.

- MATTOS, R. C. O. C., 2001.** Estratégias para a Avaliação da Exposição ao Chumbo: Estudos Comparativos dos Indicadores Biológicos e Efeitos Relacionados. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro. Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz.
- MUSHAK, P., DAVIS, M., CROCETTI, A. F., et al., 1989.** Review: Prenatal and Postnatal Effect of Low Level Lead Exposure: Integrated Summary of a Report to the U. S. Congress on Childhood Lead Poisoning. *Environ. Res.* 50: 11-36.
- MUTTI, A., 1999.** Biological Monitoring in Occupational and Environmental Toxicology. *Toxicol. Lett.* 108(2-3): 77-89.
- ONALAJA, A. O. & CLAUDIO, L., 2000.** Genetic Susceptibility to Lead Poisoning. *Environ. Health Perspect.* 108 (1): 23-28.
- ONG, C.N., CHIA, S. E., FOO, S. C. et al., 1993.** Concentrations of Heavy Metals in Maternal and Umbilical Cord. *Blood. Bio. Metals.* 6:61-6.
- PETRUCCI, R., LEONARDI, A., BATISTUZZI, G. 1982.** The Genetic Polymorphism of δ -aminolevulinate Dehydratase in Italy. *Hum. Genet.* 60: 289-290.
- PLEWINSKA, M., THUNELL, S., HOLMBERG, L., WETMUR, J. G., DESNICK, R. J., 1991.** δ -Aminolevulinate Dehydratase Deficient Porphyria: Identification of the Molecular Lesion in a Severely Affected Homozygote. *Am. J. Genet.* 49: 167- 174.
- RABINOWITZ, M. B., 1976.** Toxicokinetics of Bone Lead. *Environ. Health.* 91: 33-37.
- SAKAI, T., YANAGIHARA, S., USHIO, K., 1980.** Restoration of Lead Inhibited 5-Aminolevulinate Dehydratase Activity in Whole Blood by Heat, Zinc Ion, and (or) Dithiothreitol. *Clin. Chem.* 26(5):625-628.
- SAKAI, T., MORITA, Y., ARAKI, T. et al., 2000.** Relation Between δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotypes and Heme Precursors in Lead Workers. *Am. J. Ind. Med.* 38:355-360.
- SCHULTE, P. A., 1991.** Contribution of Biological Markers to Occupational Health. *Am. J. Ind. Med.* 20: 435-446.

- SCHWARTZ, B. S., LEE, B. K., STEWART, W., AHN, K. D., SPRINGER, K., KELSEY, K., 1995.** Associations of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype With Plant, Exposure Duration, and Blood Lead and Zinc Protoporphyrin Level in Korean Lead Workers. *Am. J. Epidemiol.* **142**:738-745.
- SCHWARTZ, B. S., et al., 1997.** δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype modifies Four Hour urinary Lead Excretion After Oral Administration of Dimercaptosuccinic Acid. *Occup Environ Med.* **54**:241-246.
- SHEETS, R. W., 1998.** Release of Heavy Metals from European and Asian Porcelain Dinnerware. *Sci. Total Environ.* **212** (2-3): 107-113.
- SHEN, XIAO-MING, WU, SHENG-HU, YAN, CHONG-HUAI, ZHAO, W. et al., 2001.** δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Polymorphism and Blood Lead Levels in Chinese Children. *Environmental Research. A*, **85**: 185-190.
- SIMONS, T. J. B., 1993.** Lead Transport and Binding by Human Erythrocytes in Vitro. *Pfugers Arch.* **423**: 307-313.
- SKERFVING, S., NILSSON, U., SCHUTZ, A., GERHARDSSON, L., 1993.** Biological Monitoring of Inorganic Lead. *Scand. J. Work Environ. Health.* **19** (suppl 1): 59-64.
- SMITH, C. M., WANG, X., HU, H., KELSEY, K. T., 1995.** A Polymorphism in the δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Gene May Modify the Pharmacokinetics and Toxicity of Lead. *Environ. Health Perspect.* **103**:248-253.
- SOLLYWAY, B. M., SCHAFFER, A., PRATT, H. & YANNAI, S., 1994.** A Multidisciplinary Study of Lead Exposed Subject. I. Delayed Target Detection P-300 Latency, Na Elettrophysiological Parameter, Correlates with Urinary δ -ALA. *Environ. Res.* **67**: 168-182.
- SOUZA M. G., SILVA, M. C., DUARTE, A. F., AZEVEDO, E. S., 1991.** Delta-aminolevulinic Acid Dehydratase (ALAD) Polymorphism in Mixed Brazilians from the State of Bahia. *Gene. Geogr.* **5(1-2)**: 33-37.
- TAIOLLI, E., 2002.** Structure of Epidemiological Studies on Genetic Susceptibility to

- Environmental Toxicants. *Toxicol Lett.* **127(1-3)**: 315-319.
- TONG, S., SCHIRNDING, Y. E., PRAPAMONTOL, T., 2000.** *Bulletin of the World Health Organization.* **78 (9)**: 1068-1077.
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. 1942.** Isolierung Und Kristallisation Bes Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.* **310**: 384-421.
- WETMUR, J. G., BISHOP, D., CANTELMO, C., DESNICK, R. J., 1986.** Human δ -Aminolevulinate Dehydratase: Nucleotide Sequence of a Full-length cDNA Clone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**:7703-7701.
- WETMUR, J. G., KAYA, A. H., PLEWISKA, M., DESNICK, R. J., 1991.** Molecular characterization of the human delta-aminolevulinate dehydratase 2 (ALAD²) allele: implication for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead. *Am. J. Hum. Genetics.* **49 (4)**: 757-763.
- WETMUR, J. G., LEHNERT, G. & DESNICK, R. J., 1991.** The δ -aminolevulinate Dehydratas Polymorphism: Higher Blood Levels in Lead Workers and Environmental Children with the 1-2 and 2-2 Isozymes. *Environmental Research.* **56**: 109-119.
- WIGFIELD, D. C. & FARANT, J. P., 1981.** Assay of δ -Aminolevulinate Dehydratase in 10 μ L of Blood. *Clinical Chemistry.* **27(1)**.
- ZIEMSEN, B., ANGERER J., LEHNERT G., BENKMAN HG., GOEDDE HW., 1986.** Polymorphism of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase in Lead Exposed Workers. *Int.Arch. Occup. Environ. Health.* **58**: 245-247.