UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da influência do polimorfismo Pro^{198}Leu da Glutationa Peroxidase sobre o estresse oxidativo em população exposta ao chumbo

Fabiana Veiga da Silva

Ribeirão Preto – SP

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da influência do polimorfismo Pro^{198}Leu da Glutationa Peroxidase sobre o estresse oxidativo em população exposta ao chumbo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do Título de Mestre em Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Fabiana Veiga da Silva
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Ribeirão Preto – SP

2008

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

Silva, Fabiana Veiga

Avaliação da influência do polimorfismo Pro^{198}Leu da Glutationa Peroxidase sobre o estresse oxidativo em população exposta ao chumbo. Ribeirão Preto, 2008.

40p. : il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de CiênciasFarmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Jr, Fernando

1. Glutationa Peroxidase. 2. polimorfismo. 3. chumbo. 4. estresse oxidativo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabiana Veiga da Silva

Avaliação da influência do polimorfismo Pro^{198}Leu da Glutationa Peroxidase sobre o estresse oxidativo em população exposta ao chumbo.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do Título de Mestre em Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr _____

Instituição _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Em primeiro lugar, a DEUS, por minha vida e por ter me concedido forças para que eu pudesse enfrentar todos os desafios e superar todas as dificuldades encontradas ao longo de minha caminhada.

Aos meus queridos papai e mamãe Roseli e Valdecir, que me trouxeram com todo o amor e carinho a este mundo, dedicaram, cuidaram e doaram incondicionalmente seu sangue e suor em forma de amor e trabalho por mim. À eles que mesmo com pouco estudo despertaram e alimentaram em minha personalidade, ainda na infância, a sede pelo conhecimento e a importância deste em minha vida. Vocês são os responsáveis por esta vitória e por todas as outras que estão por vir.

A minha irmã, que tanto amo e admiro.

Ao meu noivo Luis, que sempre me incentivou e apoiou em todos os momentos. Por seus conselhos e por acreditar em mim, dedico esta conquista a você também.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior, não somente pela oportunidade e pelos ensinamentos acadêmicos, mas pelos ensinamentos pessoais, tão essenciais à formação e indisponíveis em qualquer literatura;

Aos amigos de laboratório, pela amizade e paciência.

A todos os colegas de departamento, funcionários ou alunos, pela amizade e companheirismo.

Obrigada.

“O Senhor é quem te guarda; o Senhor é a tua sombra à tua direita.
O sol não te molestará de dia e nem a lua de noite.
O Senhor te guardará de todo mal; Ele guardará a tua alma".

Salmo 121

RESUMO

SILVA, F.V. **Avaliação da influência do polimorfismo Pro^{198}Leu da Glutationa Peroxidase sobre o estresse oxidativo em população exposta ao chumbo.** 2008. 40p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A enzima glutationa peroxidase (GPx-1) possui um importante papel na detoxificação de espécies reativas de oxigênio. Neste estudo foi verificada a influência do polimorfismo Pro^{198}Leu da GPx-1 nos níveis de malondialdeído (MDA) e proteínas carboniladas de 84 voluntários expostos ambientalmente ao chumbo (28 homens e 56mulheres; idade: 18 a 60 anos). Os genótipos para o polimorfismo Pro^{198}Leu da GPx-1 foram determinados por PCR seguido por digestão com enzima de restrição. Chumbo no plasma (Pb_P) e chumbo no sangue total (Pb_S) foram determinados por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, respectivamente. As freqüências alélicas para os alelos T (que codifica o aminoácido prolina) e C (que codifica o aminoácido leucina) da GPx-1 foram 0,73 e 0,27, respectivamente. Os voluntários foram separados em dois grupos, de acordo com a presença ou ausência do alelo que codifica leucina. Não foi encontrada diferença significativa para as concentrações de Pb_P e Pb_S, bem como para os marcadores de estresse oxidativo entre os grupos. Deste modo, os resultados obtidos sugerem que o polimorfismo Pro^{198}Leu da GPx-1 não torna indivíduos ambientalmente expostos ao chumbo, mais suscetíveis aos danos do estresse oxidativo induzidos pelo metal.

Palavras-chave: Glutationa peroxidase; polimorfismo; chumbo; estresse oxidativo.

ABSTRACT

SILVA, F.V. **Evaluation of the Glutathione Peroxidase Pro^{198}Leu polymorphism influence on the oxidative stress in population environmentally exposed to lead.** 2008. 40p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Glutathione peroxidase (GPx-1) plays an important role in scavenger reactive oxygen species (ROS). This study was carried out to assess the effects of GPx-1 gene polymorphism (Pro^{198}Leu) on malondialdehyde (MDA) and carbonyl protein ratio in 84 subjects environmentally exposed to lead. Genotypes for the GPx-1 Pro^{198}Leu polymorphism were determined by PCR and restriction fragment length digestion. Lead in plasma (Pb_P) and lead in total blood (Pb_B) were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry and by graphite furnace atomic absorption spectrometry, respectively. The allele frequencies for T (which express the proline aminoacid) and C (which express the leucine aminoacid) were 0.73 e 0.27, respectively. The volunteers were divided in two groups, according to the presence or absence of C allele. No significant differences were found in Pb_P and Pb_B, as well as for the other oxidative biomarkers between the groups. Therefore, the obtained results suggest that the GPx-1 Pro^{198}Leu polymorphism do not affect individuals environmentally exposed to lead greater susceptible to oxidative damage induced for this metal.

Keywords: Glutathione Peroxidase; polymorphism; lead; oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo catalítico da GPx-1 sobre a glutationa reduzida 8

Figura 2 – Interconversão da glutationa nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutationa peroxidase (GPx-1), glutationa oxidase (GO) e glutationa redutase (GR) 9

Figura 3 – Genotipagem do polimorfismo da GPx-1. Os produtos de PCR são digeridos por enzima de restrição (*ApaI*) produzindo diferentes fragmentos. A: Pro-Leu, B: Leu-Leu, C: Pro-Pro 19

Figura 4 – Relação entre Pb_S e MDA para todos voluntários deste estudo 21

LISTA DE TABELAS

Tabela1. Estatística descritiva dos voluntários em estudo de acordo com as concentrações de chumbo em sangue 22

Tabela 2. Resultados do teste de equilíbrio de Hardy – Weinberg 23

Tabela 3. Frequência genotípica e alélica (%) em dois grupos étnicos estudados e do projeto HapMap (International HapMap Project, 2007) 23

Tabela 4. Estatística descritiva dos voluntários participantes do estudo de acordo com o genótipo. Os valores são expressos em média ± desvio padrão 25

Tabela 5. Estatística descritiva dos voluntários participantes do estudo com Pb_S≤10,0 µg/dL 26

Tabela 6. Estatística descritiva dos voluntários participantes do estudo com Pb_S>10,0 µg/dL 27

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALAD	Ácido δ-Aminolevulínico desidratase
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CAT	Catalase
CDC	Centro para Controle e Prevenção de Doenças
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Ez-Se$^-$	Selenolato
Ez-SeOH	Álcool selenolato
Ez-SeSG	Selenossulfeto
GPx-1	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa-S-transferase
GO	Glutationa oxidase
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
ICP-MS	Espectometria de massas com plasma indutivamente acoplado
Leu	Leucina
MDA	Malondialdeído
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetros
NS	Não significativo
NIST	National Institute of Standards and Technology
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
O_2^{*-}	Radical superóxido
OH^{*-}	Radical hidroxil
$ONOO^-$	Peroxinitrito
pb	Pares de base

Pb_P	Chumbo no plasma
Pb_S	Chumbo no sangue total
%Pb_P/Pb_S	Fração de chumbo no plasma/chumbo no sangue total
Pro	Prolina
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SH	Sulfidrila
SNPs	Sigla para *Single-Nucleotide Polymorphisms*
SOD	Superóxido dismutase
Taq	Polimerase termo-estável, isolada da bactéria *Thermophilus aquaticus*
TBE	Tris base com EDTA
Tris.Cl	Tris(hidroximetil)metilamina
Triton X-100	p-t-octilfenil polioxietileno
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....1
1.1 Toxicogenômica: uma nova estratégia nos estudos de toxicologia de metais 1
1.2 Exposição ao chumbo e seus impactos à saúde humana.....1
1.2.1 Toxicocinética 3
1.2.2 Toxicodinâmica do chumbo 4
1.3 Estresse oxidativo 5
1.4 A GPx-1 inibe a produção de espécies reativas de oxigênio.....8
1.5 Polimorfismos genéticos da GPx-1 também afetam o estresse oxidativo 10
2 HIPÓTESE.....12
3 OBJETIVOS 13
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....14
4.1 Seleção dos voluntários e coletas sangüíneas.....14
4.2 Determinação das concentrações de chumbo no sangue total 14
4.3 Determinação das concentrações de chumbo no plasma 15
4.4 Reagentes e soluções 15
4.5 Materiais de referência para controle dos resultados de chumbo 16
4.6 Determinação das concentrações de MDA e carbonilas 16
4.6.1 MDA.....16
4.6.2 Carbonilas.....17
4.7 Determinação do polimorfismo $Pro^{198}Leu$ da GPx-1. 17
4.7.1 Extração do DNA genômico.....17
4.7.2 Reação de Polimerase em Cadeia - PCR.....18
4.7.3 Digestão do produto de PCR amplificado 18
4.7.4 Eletroforese e visualização 18
4.8 Análise dos resultados 20
4.8.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....20
4.8.2 Análise estatística 20
5 RESULTADOS 21
6 DISCUSSÃO.....28
7 CONCLUSÃO.....32
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 33

1 INTRODUÇÃO

1.1 Toxicogenômica: uma nova estratégia nos estudos de toxicologia de metais

A apresentação do primeiro “rascunho” do sequenciamento do genoma humano (LANDER e col., 2001) aumentou intensamente o interesse pelo papel da genética como um determinante da saúde humana. Com esse revolucionário progresso na ciência, acompanhando uma série de avanços em ferramentas tecnológicas e também de bioinformática, tornou-se possível aos pesquisadores o estudo de diferenças na expressão de vários genes entre populações e entre indivíduos de uma mesma população. Estas diferenças afetam as funções das proteínas e, conseqüentemente, o balanço de intermediários metabólicos associados a estas proteínas. Neste sentido, uma melhor elucidação dos impactos, provocados por xenobióticos, à saúde de indivíduos expostos a agentes químicos, poderá ser delineado pelo estudo das variações no genoma humano, polimorfismos genéticos, que determinam a maior ou menor susceptibilidade de indivíduos ou grupos populacionais quanto ao desenvolvimento de determinadas doenças após a exposição a um agente toxicológico. Como decorrência, esse novo campo de pesquisa vem crescendo de maneira pulsante nos últimos anos, principalmente nos Estados Unidos (KELADA e col., 2003; HENRY e col., 2002; IANNACCONE, 2001; AMIN e col., 2002; WARING e HALBERT, 2002). Entretanto, esta linha de pesquisas ainda é incipiente no Brasil.

1.2 Exposição ao chumbo e seus impactos à saúde humana

O chumbo é um metal não essencial relativamente abundante na crosta terrestre, tendo uma concentração média entre 10 e 20 mg/kg. As maiores fontes naturais de chumbo são as emissões vulcânicas, o intemperismo geoquímico e as névoas aquáticas (WHO, 1995). Estima-se que as taxas de emissão natural do chumbo no planeta são da ordem de 19.000 toneladas por ano (WHO, 1995).

Entretanto, os processos antropogênicos são os principais responsáveis pela liberação do chumbo no ambiente (ATSDR, 1993). Antes do uso do chumbo-tetraetila ter sido banido da gasolina em muitos países, inclusive no Brasil, a maior parte do chumbo encontrado no ar provinha da sua emissão de escapamentos de

automóveis. Outras fontes de chumbo no ar incluem a queima de combustíveis tais como carvão e óleo, processos industriais e queima de lixo (MANTON e col., 2000).

Em virtude de suas características físicas de ductilidade, maleabilidade e baixo ponto de fusão, o chumbo tem sido usado por populações milenares (MIDIO e MARTINS, 2000). A exposição ao chumbo pode ocorrer na forma metálica, ligado a outros metais ou ligado a compostos químicos, principalmente na forma de óxidos (ATSDR, 1993). Atualmente, seu principal uso é na produção de baterias e em alguns tipos de soldas, uma vez que forma importantes ligas com outros metais. Além disso, os sais de chumbo podem aparecer como constituintes de vitrificados, esmaltes e vidros (ATSDR, 1993). Até recentemente seus sais eram usados na produção de pigmentos para tintas (MIDIO e MARTINS, 2000), inclusive naquelas utilizadas para colorir embalagens de alimentos (BAIRD, 2002).

Atualmente, a principal fonte de exposição ao chumbo ocorre no ambiente de trabalho. As formas orgânicas do chumbo, por serem muito lipossolúveis, são facilmente absorvidas pela pele, pelo trato gastrintestinal e pelos pulmões (KLAASSEN, 1991). Ao contrário do chumbo inorgânico, o chumbo orgânico é metabolizado pelo fígado a chumbo trialquil e chumbo inorgânico, os quais são responsáveis pelos efeitos tóxicos no organismo (KOSNETT, 2003).

Estudos realizados no Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) nos Estados Unidos mostraram que o nível de chumbo no sangue das crianças americanas tem diminuído muito nos últimos anos (BERGDAHL e col., 1997). Isto se deve, principalmente à eliminação do chumbo da gasolina, das tintas usadas nas pinturas de casas e nas soldas de alimentos enlatados. Entretanto, acredita-se que 900 mil crianças americanas, entre 1 e 5 anos de idade, ainda apresentem concentrações de chumbo no sangue iguais ou superiores a 10 µg/dL, nível considerado preocupante pelo CDC (BERGDAHL e col., 1997). Em nosso País, especificamente no Estado de São Paulo, recentes projetos financiados pela FAPESP estão sendo executados visando monitorar as concentrações de chumbo no sangue de crianças e adultos, expostos a este metal pesado, no Vale do Ribeira e na cidade de Bauru.

A determinação de chumbo em sangue total é recomendada pelo CDC como o melhor indicador biológico de exposição a este metal (BERGDAHL e col., 1997). Níveis inferiores a 10 µg/dL são considerados normais em crianças (BERGDAHL e col., 1997). Em 1994, a Organização Mundial de Saúde, definiu também níveis

superiores a 10 µg/dL no sangue como indicativo de exposição ao chumbo (GERCKEN e BARNES, 1991). Entretanto, estudos mais recentes têm observado efeitos adversos, principalmente em crianças, com concentrações de chumbo no sangue menores que 10 µg/dL (ATSDR, 1999; CANFIELD e col., 2003; JUSKO e col., 2008).

1.2.1 Toxicocinética

O chumbo pode ser encontrado nas formas inorgânica e orgânica, apresentando diferenças quanto à toxicidade. A exposição ao chumbo inorgânico ocorre predominantemente por meio da via respiratória e pelo trato gastrintestinal (SADAO, 2002). No organismo humano, o chumbo se distribui no compartimento sangüíneo de duas maneiras: uma não difusível, ligada aos eritrócitos e outra difusível, no plasma. Apesar de mais de 98% do metal circulante permanecer ligado aos eritrócitos, a forma difusível (plasmática) é a fração mais ativa do metal. Em função da sua maior disponibilidade, esta fração pode influenciar diretamente a concentração de chumbo nos outros compartimentos e, conseqüentemente, contribuir para a toxicidade do metal nos diferentes órgãos e sistemas.

A quantidade de chumbo sangüíneo, que geralmente representa uma exposição em curto prazo, eleva-se até atingir um platô, e o excesso penetra nos tecidos moles como o cérebro, o fígado e os rins (MUSHAK e CROCETTI, 1989; BAIRD, 2002). A meia-vida biológica do chumbo no sangue é de aproximadamente 36 dias e nos tecidos moles, 40 dias (KOSNETT, 2003). Posteriormente, o chumbo se deposita nos tecidos duros, onde substitui o cálcio, já que os íons Pb^{2+} e Ca^{2+} possuem raios atômicos muito próximos (BAIRD, 2002). Em adultos, quase 90% do chumbo presente no corpo encontra-se estocado nos ossos, onde a meia-vida biológica pode chegar a 20 anos (RABINOWITZ e col., 1976).

O chumbo presente no esqueleto é biologicamente inerte, porém em situações que envolvem a desmineralização óssea, como a gravidez e a osteoporose, o chumbo pode ser rapidamente mobilizado levando ao aparecimento de sintomas tóxicos, mesmo depois de cessada a exposição (SARYAN e SENZ, 1994). O chumbo é eliminado do organismo pela urina e fezes (excreção biliar), podendo também, ser excretado através do leite materno. Diferenças na absorção intestinal, metabolismo ósseo e o rápido desenvolvimento do sistema nervoso central podem levar a uma absorção cinco vezes maior do chumbo nas crianças em

relação aos adultos (LOCKITCH, 1993).

A absorção do chumbo no organismo sofre a influência de vários fatores, tais como a concentração e tempo de exposição ao metal e propriedades físico-químicas do chumbo (tamanho da partícula e a solubilidade do composto). Além disso, deve-se levar em conta fatores relacionados à dieta e ao estado nutricional do organismo exposto (MIDIO e MARTINS, 2000). Uma ingestão baixa de cálcio, fósforo, ferro e proteínas podem provocar um aumento na absorção de chumbo (WHO, 1995). Por outro lado, a vitamina C reduz a absorção de chumbo, provavelmente por facilitar a absorção do ferro (MIDIO e MARTINS, 2000). Fatores relacionados ao indivíduo como a constituição genética, o estado fisiológico e a idade, também influenciam na absorção do chumbo (KLASSEN, 1991).

1.2.2 Toxicodinâmica do chumbo

Alterações bioquímicas

O íon chumbo (Pb^{2+}), assim como o íon cádmio (Cd^{2+}) e o íon mercúrio (Hg^{2+}), possuem uma forte afinidade por sulfidrila (-SH). Esta interação resulta em depleção de glutationa (SAXENA e col., 2005), além da inibição da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo deste tripeptídio, como a glutationa redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e glutationa-S-transferase (GST) (SIVAPRASAD e col., 2004). A atividade da enzima ácido δ-aminolevulínico desidratase (ALAD), também é inibida pelo chumbo (ASTRIN e col., 1987) por meio da oxidação de grupos tiól da enzima (ASTRIN e col., 1987). A ALAD é uma metaloenzima composta de oito subunidades idênticas e oito átomos de zinco (TSUKAMOTO e col., 1979; TSUKAMOTO e col., 1980; JAFFE e col., 1984). Os átomos de zinco são essenciais à atividade enzimática. Os átomos de chumbo substituem os de zinco que são necessários à atividade da ALAD (TSUKAMOTO e col., 1979), aumentando o risco de pessoas expostas ao metal desenvolverem anemia.

Além da afinidade por sulfidrilas, o chumbo também pode interferir na ação de minerais como o cálcio, por apresentar propriedades químicas semelhantes a este metal alcalino. O chumbo pode afetar o sistema nervoso (SILBERGELD e ADLER, 1978), promovendo mudanças na liberação de neurotransmissores, ativação da proteína quinase C (proteína com domínio de ligação para o cálcio) e na inibição da

captação de glutamato nos astrócitos (GODWIN, 2001). A longa exposição ao metal pelas crianças pode causar uma série de disfunções neurológicas, incluindo a redução da capacidade intelectual (JUSKO e col., 2008). Entretanto, outras alterações também associadas à exposição ao chumbo incluem: alteração do metabolismo da vitamina D, redução do crescimento, redução da síntese de hemoglobina, encefalopatia, nefropatia e incidência aumentada de doenças cardiovasculares (MANTON e col., 2000; SCHWARTZ, 1991; DEKORT e ZWENNIS, 1988; KOPP e col., 1988).

1.3 Estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas pela ação de xenobióticos e como conseqüência de processos metabólicos (FINDLAY e col., 2005). Pelo fato da molécula de oxigênio ser um bi-radical (possuir dois elétrons livres nos orbitais p antiligantes), o oxigênio reage preferencialmente com moléculas de configuração eletrônica semelhante. Como a maioria das biomoléculas não são bi-radicais, o oxigênio fica impedido (por restrição de "spin") de reagir com as mesmas, evitando assim que alvos celulares importantes sejam lesados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1991; SIES, 1986). No entanto, o oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Na forma de oxigênio singlete a restrição de "spin" desaparece, conferindo-lhe um maior poder oxidante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1991).

Uma outra via de formação de EROs, consiste na redução unieletrônica do oxigênio à água, na qual a entrada de 4 elétrons na molécula de oxigênio promove o aparecimento do radical superóxido (O_2^{*-}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxil (OH^{*-}), intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio molecular conforme o esquema mostrado abaixo(HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1991):

$$\mathbf{O_2 \rightarrow O_2^{*-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow HO^{*-} \rightarrow H_2O}$$

O H_2O_2 atravessa facilmente as membranas celulares e ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro ou do cobre, origina o radical hidroxil (reação de Fenton). Este último é, entre as espécies radicalares conhecidas, uma das mais reativas. Estas espécies reativas de oxigênio para se estabilizarem devem

doar ou receber elétrons de uma ou outra molécula, tornando esta última uma espécie também radicalar. A conseqüência deste processo é a oxidação de fosfolipídeos de membranas celulares, do DNA e de proteínas (DURAN e CADENAS, 1987). Portanto, a toxicidade do oxigênio, em praticamente todas as células aeróbias, decorre da formação de EROs que podem interagir com diversas biomoléculas, com o objetivo de se estabilizarem lesando diferentes estruturas celulares (DURAN e CADENAS, 1987).

Espécies reativas de oxigênio estão associadas a um grande número de patologias que afetam o ser humano. Estas espécies participam tanto das reações inflamatórias como também de mecanismos de transdução de sinais, atuando como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares. Portanto, o equilíbrio entre a formação e a remoção destas espécies no organismo, deve ser rigorosamente regulado, de modo a manter a fisiologia normal das células. O desequilíbrio entre a formação e a remoção das EROs no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de EROs, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, podendo resultar inclusive na morte celular. Este desequilíbrio é definido como estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1991).

A homeostase entre a formação e a degradação de EROs no organismo é mantida por moléculas e proteínas antioxidantes que removem as EROs e restauram o balanço redox (FINDLAY e col., 2005). As principais enzimas antioxidantes na célula incluem a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão do radical superóxido a peróxido de hidrogênio, catalase (CAT) que reduz o H_2O_2 à água e oxigênio e a glutationa peroxidase (GPx-1) que catalisa a redução de H_2O_2 usando glutationa (GSH) como cofator (NORDBERG e ARNÉR, 2001; FINDLAY e col., 2005).

A produção de EROs e o estresse oxidativo têm sido apontados como causa do dano tecidual induzida pelo chumbo no fígado, cérebro, rins e em outros órgãos (PATRA e col., 2001; SIVAPRASAD e col., 2002).

Tandon e col. (2002) relataram que em ratos expostos a 2000 ppm de chumbo (acetato de chumbo 0,2%) na água de beber, durante nove semanas, ocorreu uma inibição da atividade da ALAD, aumento da atividade da catalase, elevação dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutationa oxidada (GSSG), e

depleção de glutationa (GSH) no sangue e no cérebro. De maneira semelhante, ratos expostos diariamente de forma subcutânea a 100 mg/kg de acetato de chumbo durante 30 dias apresentaram um aumento na peroxidação lipídica e redução na atividade da SOD e nos níveis de GSH renal e hepática (EL-SOKKARY e col., 2005). Levander e col. (1977) e Safiq-Ur-Rehman (1984), também observaram um aumento da peroxidação lipídica em tecidos do fígado, rins e cérebro de roedores expostos ao chumbo. Estudos em trabalhadores expostos ao chumbo também demonstraram aumento da concentração de MDA (O'FLAHERTY, 1995).

Um importante alvo de toxicidade do chumbo é o sistema hematológico. O chumbo induz mudanças na composição das hemácias, na membrana, proteínas e lipídios (FUKUMOTO e col., 1983) e inibe a síntese de hemoglobina (WALDRON, 1966; RATCLIFFE, 1981; MONTEIRO e col., 1989). Estudos *in vitro* (QUINLAN e col., 1988) e *in vivo* em animais (GURER e col., 1998) sugerem que o dano oxidativo induzido pelo chumbo contribui para a lesão das hemácias na intoxicação pelo chumbo. Isso pode ser explicado pelo desequilíbrio da balança prooxidante/antioxidante demonstrada em trabalhadores expostos ao chumbo (MONTEIRO e col., 1985; SUGAWARA e col., 1991). A fonte prooxidante durante o estresse oxidativo induzido pelo chumbo nas hemácias não é bem conhecida. No entanto, vários estudos sugerem ser o ALA (ácido δ-aminolevulínico) essa possível fonte (MONTEIRO e col., 1989). O chumbo é conhecido por inibir a enzima ALAD resultando em acúmulo de ALA durante a biossíntese do heme. O ALA acumulado sofre uma auto-oxidação catalisada por metal levando a um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como superóxidos, peróxidos de hidrogênio e radicais ALA^* (MONTEIRO e col., 1989; OTEIZA e col., 1995). Vaziri e colaboradores (2004) observaram que em células de endotélio coronariano, e em células do músculo vascular liso humano, incubadas com acetato de chumbo (1.0 mg/L) por 5-10 minutos, houve um aumento significativo nos níveis de superóxido e peróxido de hidrogênio. Entretanto, quando as células foram incubadas com acetato de chumbo (1.0-10 mg/L) durante 60 horas, os níveis de radical superóxido voltaram aos níveis basais, enquanto os níveis de H_2O_2 mantiveram-se elevados. Segundo os autores, isto se deve ao fato da superóxido dismutase (enzima que converte radicais superóxido em peróxido de hidrogênio), possuir um mecanismo compensatório de

regulação; a glutationa peroxidase e a catalase (enzimas que reduzem o peróxido de hidrogênio a água) não possuem este mecanismo. Somando-se a isso, há um aumento na produção de óxido nítrico (NO^*), ocasionado pela “up-regulation” da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) (VAZIRI e col., 2001), que pode contribuir para formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) devido a alta afinidade entre o ânion superóxido e o óxido nítrico.

Alguns estudos também mostraram que o peroxinitrito reage rapidamente com selenocompostos, incluindo selenoproteínas como a glutationa peroxidase (GPx-1) (MASSUMOTO e col., 1996).

1.4 A GPx-1 inibe a produção de espécies reativas de oxigênio

A GPx-1 é uma selenoproteína que contém um resíduo essencial de selenocisteína no seu sítio ativo. Descrita inicialmente por Mills (1957), localiza-se principalmente no citoplasma, sendo mais abundante no fígado, rins e eritrócitos.

Como proposto por Moscow e col. em 1994, o mecanismo catalítico da glutationa peroxidase envolve a reação desta enzima no estado reduzido [selenolato ($Ez\text{-}Se^-$)] com o hidroperóxido, resultando em um álcool (Ez-SeOH). Em seguida, em uma reação de duas etapas com glutationa (GSH) e selenossulfeto (Ez-SeSG), o selenol reduzido é regenerado. Desta maneira ocorre inibição da formação de espécies reativas de oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, conforme esquema mostrado na Figura 1.

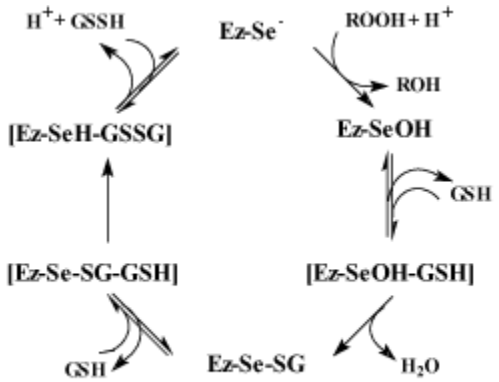

Figura 1. Mecanismo catalítico da GPx-1 sobre a glutationa reduzida.

A glutationa redutase (GR) é a responsável pela regeneração da glutationa à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutationa, como mostrado na Figura 2 (MEISTER e ANDERSON, 1983).

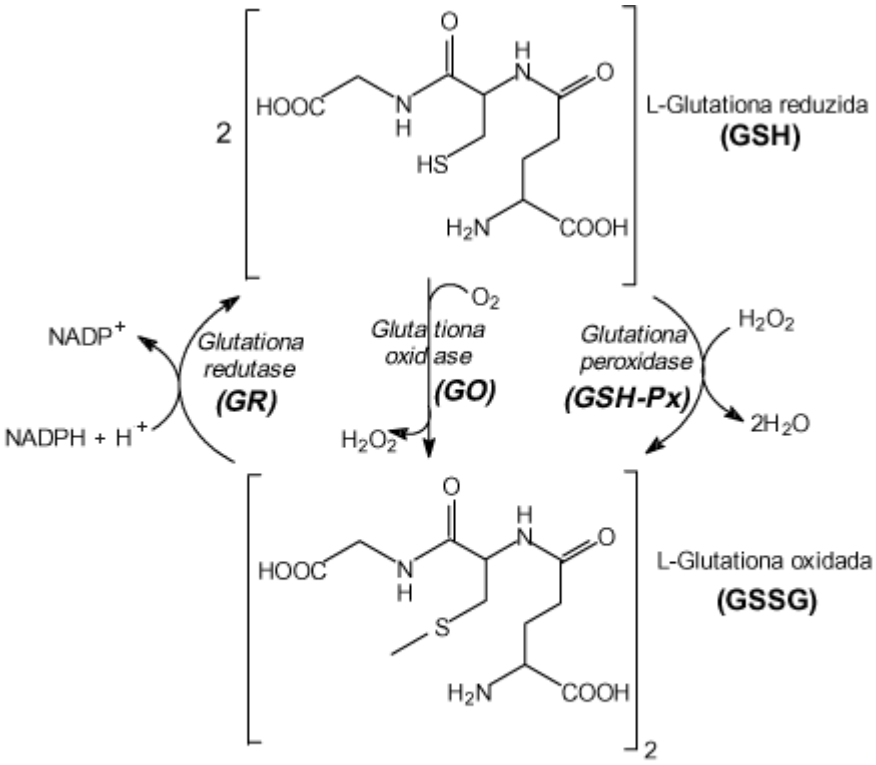

Figura 2. Interconversão da glutationa nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutationa peroxidase (GPx-1), glutationa oxidase (GO) e glutationa redutase (GR).

O núcleo do resíduo cistenilglicina da glutationa (GSH, L-g-glutamil-L-cistenilglicina), está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical GS^*, que produz, por dimerização, o GSSG (glutationa oxidada). O GSSG é, então, reduzido pela glutationa redutase, regenerando o GSH, num processo que utiliza NADPH (KRETZSCHMAR, 1996). O processo pelo qual a glutationa detoxifica hidroperóxidos é mostrado abaixo:

$$\mathbf{2\ GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O}$$

Outro mecanismo de proteção do GSH ocorre na regeneração da vitamina E oxidada, no processo de detoxificação (Estudar este mecanismo). Portanto a

glutationa (GSH) atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo e na defesa contra a ação de xenobióticos. Variações nas concentrações de glutationa afetam diretamente a síntese de proteínas e de DNA (UHLIG e WENDEL, 1992).

Na presença de espécies reativas, GSH é oxidado rapidamente pela GPx-1 a GSSG, resultando em diminuição de GSH e aumento de GSSG. A diminuição da razão GSH/GSSG é normalmente usada como indicador de estresse oxidativo (GURER, 2004).

1.5 Polimorfismos genéticos da GPx-1 também afetam o estresse oxidativo

Dizemos que um gene é polimórfico quando variações específicas da seqüência de bases do gene são encontradas com freqüência mínima de 1% em uma população. SNPs, sigla para *Single-Nucleotide Polymorphisms*, ou Polimorfismos de Base Única, são polimorfismos que ocorrem em apenas uma base e representam 90% dos polimorfismos presentes nos seres humanos (BROOKES, 1999). As variações mais freqüentes são substituições entre bases nitrogenadas de mesma característica estrutural (A/G ou G/A e C/T ou T/C), que são chamadas de transições. Um SNP pode ser ainda, sinônimo ou não. No primeiro caso (sinônimo), o aminoácido codificado pelo códon contendo o SNP é o mesmo que aquele codificado pelo códon sem SNP (mas o polimorfismo pode afetar a estabilidade do mRNA codificador); no segundo caso (não sinônimo), o códon modificado gera um aminoácido diferente, podendo modificar a estrutura e/ou a função da proteína codificada (BROOKES, 1999).

Este é o caso de um SNP que ocorre no exon2 do gene da GPx-1, localizado no cromossomo 3p21.3, descrito como $Pro^{198}Leu$, o que indica que a base de número 198 da região do exon 2 (posição 198 do gene da GPx-1) pode conter uma base T (alelo mais comum que codifica o aminoácido Prolina) ou C (alelo mais raro, que codifica o aminoácido Leucina) (KISS e col., 1997). Este polimorfismo tem sido associado com risco aumentado de câncer de pulmão (RATNASINGHE e col., 2000) e mama (HU e DIAMOND, 2003). Recentes estudos mostraram também aumento do risco de doenças cardiovasculares e vascular periférica em pacientes com diabetes tipo 2 (HAMANISHI e col., 2004). Além disso, estudos clínicos mostraram que portadores do genótipo mais raro Leu-Leu (Leucina), apresentam maior

freqüência de câncer de mama (HU e DIAMOND, 2003), e pulmão (RATNASINGHE e col., 2000). No estudo conduzido por Ratnasinghe (2000), o alelo Leu estava presente em 58% dos indivíduos do grupo controle e em 71% dos indivíduos com câncer de pulmão ($p<0,01$). Observou-se também maior prevalência de doenças cardiovasculares, vascular periférica e cerebrovasculares em indivíduos Pro-Leu (Prolina-Leucina) que em indivíduos Pro-Pro (Prolina) portadores de diabetes tipo 2 (HAMANISHI e col., 2004).

2 HIPÓTESE

Com base nas evidências anteriormente citadas, hipotetizamos que portadores do alelo C da GPx-1 poderiam estar mais suscetíveis aos danos do estresse oxidativo induzido pela exposição ambiental ao chumbo (Pb).

3 OBJETIVOS

Baseado nesta hipótese, este estudo teve como objetivos:

A) Avaliar os efeitos da intoxicação ambiental ao chumbo sobre o estresse oxidativo em população exposta ambientalmente;
B) Verificar a freqüência alélica do polimorfismo $Pro^{198}Leu$ nesta mesma população;
C) Avaliar os efeitos do polimorfismo $Pro^{198}Leu$ da Gpx-1 sobre o estresse oxidativo, em indivíduos ambientalmente expostos ao chumbo;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos voluntários e coletas sangüíneas

O projeto desta pesquisa foi aprovado pela comissão de ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Foram selecionados voluntários adultos residentes na cidade de Bauru, no Estado de São Paulo, que no momento da coleta moravam próximos a uma fábrica de baterias e aceitaram participar do estudo. Os participantes foram devidamente orientados a respeito dos objetivos desta pesquisa e assinaram o termo de consentimento, resultando em um total de 127 voluntários. As amostras de sangue venoso (18mL) foram coletadas pela equipe da Prof. Dra. Marília Buzalaf (Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo/FOB-USP). Todos os voluntários estavam em jejum de 12 horas. O sangue foi coletado por sistema a vácuo em três tubos (6 mL cada, Vacuntainer® BD), sendo dois tubos com heparina livre de metais (*Metal free* Vacuntainer® BD) para análises de chumbo e um tubo com EDTA para as avaliações hematológicas e genotipagens. A primeira coleta foi utilizada para determinar a quantidade de chumbo no sangue e a segunda para determinação dos níveis de chumbo no plasma. As amostras sangüíneas foram imediatamente centrifugadas (800 xg por 6 min) para separação do plasma do sangue total. Cada fração de plasma foi pipetada em dois tubos tipo eppendorf® (1,5mL) e imediatamente congelada a -80ºC até a realização das análises.

4.2 Determinação das concentrações de chumbo no sangue total

A determinação de chumbo em sangue total foi realizada conforme o método proposto por Zhou e cols (2002). Foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica marca Varian modelo SpectrAA 220 com forno de grafite. Todas as determinações foram realizadas em 283.3 nm, usando lâmpada de catodo oco como fonte de radiação e monocromador com fenda para 0,7 nm. As determinações foram realizadas sempre em área de pico. Resumidamente, 100 µL de cada amostra de sangue total foram diluídas na proporção de 1:10 em uma solução contendo 0,2 % v/v HNO_3 + 0,5% de Triton X-100. Desta mistura resultante, foram retirados 12 µL e imediatamente injetados no forno de grafite, com tubo de grafite cuja plataforma havia sido previamente revestida com tungstênio e ródio (W - Rh). A calibração foi

realizada utilizando soluções aquosas de chumbo. O limite de detecção do método foi de 0,7 µg/L Pb.

4.3 Determinação das concentrações de chumbo no plasma

A determinação de chumbo no plasma foi realizada utilizando o método proposto por Schutz e cols (1996). Foi utilizado um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), marca Perkin-Elmer modelo Elan 6100. Resumidamente, 300 µL de plasma foram diluídos 1:10 com solução contendo amônia (0,04 mol/L), Na_2EDTA (200 mg/L) e Triton X-100 (100 mg/L). O limite de detecção foi de 0,001 µg/L Pb.

Os níveis de ferro no plasma também foram determinados nas amostras dos voluntários, para verificação de hemólise.

4.4 Reagentes e soluções

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ. cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®) foi utilizada em todo o trabalho. Foi também utilizado ácido nítrico destilado em temperatura inferior a de ebulição, empregando destilador de quartzo da Kürner Analysentechnik para eliminação de impurezas de chumbo. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polietileno. Copos do autoamostrador e materiais de vidro foram todos mergulhados em solução contendo 20% v/v HNO_3 por 24 h, lavados 5 vezes com água Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar classe 100. Todas as operações para preparo das soluções de referência de chumbo foram realizadas em sala limpa classe 10000, pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura - USP (CENA- Piracicaba/SP).

Foi utilizada uma solução estoque padrão de Pb contendo 1,0 gL^{-1} Pb (Perkin-Elmer, Inc.) padronizada pelo “National Institute of Standards and Technology” (NIST).

Para a determinação de chumbo em sangue total, soluções de referência de Pb em concentrações de 0,0; 25,0; 50,0 e 100,0 μgL^{-1} Pb foram preparadas pela diluição 1+9 com solução contendo 0,2 % v/v HNO_3 + 0,5 % v/v Triton X-100 de soluções estoque intermediárias.

Para a determinação de chumbo em plasma sangüíneo, soluções de referência de Pb em concentrações de 0,0; 10,0; 25,0; 50,0 μgL^{-1} Pb foram preparadas em solução contendo amônia, EDTA e Triton X-100.

4.5 Materiais de referência para controle dos resultados de chumbo

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

Materiais de referência de soro humano, contendo chumbo, provenientes da Seronorm (Seronorm Trace Elements Serum, Oslo, Noruega), foram analisados previamente e posteriormente a análise de um grupo de 10 amostras das usadas no estudo, para controle dos resultados obtidos.

4.6 Determinação das concentrações de MDA e carbonilas

4.6.1 MDA

A quantificação do MDA foi realizada no plasma de 84 dos 127 participantes do estudo por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção visível (VIS), segundo a metodologia de Grotto et al.16. O equipamento utilizado foi o sistema cromatográfico Knauer®,
modelo WellChrom, com bomba quaternária, reservatório de solventes, misturador, degaseificador para solventes, injetor manual com amostrador de volume fixo de 20 µL e detector UV-VIS. O controle cromatográfico, a coleta e o processamento dos dados foram realizados usando o programa Eurochrom 2000 Software®, edição básica 2.05 para Windows. A separação cromatográfica foi feita utilizando coluna de fase reversa C18 Eurospher-100 150 x 4 mm com poro de 5 µm de tamanho e pré-coluna Eurospher-100 5 x 4 mm com poro de 5 µm de tamanho. A fase móvel consistiu-se de uma mistura de 2,5 mM de KH_2PO_4 – pH 7,0 e Metanol (50:50 v/v), eluição isocrática com fluxo de 0,6 mL/min. A absorbância do eluente foi monitorada a 532 nm e o tempo total de análise foi de 8 min. A coluna foi aquecida a 40 ºC pelo sistema termostatizado Chromacon®.

4.6.2 Carbonilas

A carbonilação de proteínas séricas foi quantificada pelo método de Levine modificado [Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N., et al. 1990. Methods Enzymol, 186: 464-478.]. As proteínas totais no soro foram quantificadas pelo método do biureto, e posteriormente diluídas com água destilada ou deionizada até obter uma concentração de 10 mg/ml. Em seguida, 500 μl do soro diluído foram precipitados com 250 μl de ácido tricloroacético 10% (TCA) e centrifugados a 1500 rpm por 5 min, com posterior descarte do sobrenadante. Ao precipitado de proteínas foi adicionado 250 μl de 2, 4- dinitrofenilhidrazina (DNPH) na concentração de 10 mmol/L (diluído em HCl 2 mol/L), a seguir esta solução foi homogeneizada no vórtex e em seguida deixada em repouso ao abrigo de luz por 30 minutos. Após este período, foi adicionado 0,5 ml TCA 10% a solução de proteínas e após centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado 3 vezes com 1 ml de solução de etanol/etilacetato (1:1). Após procedimento de lavagem o precipitado foi dissolvido em 1,5 ml de uma solução diluidora para proteínas (HEPES) e incubado em banho maria a 37°C por 10 min. A intensidade de cor da solução resultante foi determinada usando espectrofotômetro a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteina.

4.7 Determinação do polimorfismo Pro^{198}Leu da GPx-1.

4.7.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído do sangue utilizando-se o método da *proteinase K* de acordo com o proposto por Miller e col. (1988). Em resumo, o sangue (900 μL) foi lisado com 900μL de *Tampão Red Blood Cell Lysis* (Tris.Cl 2%, PH 7,6) e posteriormente incubado à temperatura ambiente por 10 min em tubos plásticos de 2 mL (tipo eppendorf®) invertendo-se ocasionalmente. Em seguida os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 20 seg. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 600 μL de *Tampão Cell Lysis* (Tris.Cl 1%, SDS 0,1%; EDTA 0,5M - pH 8.0) a 4°C, seguido novamente de homogeneização, invertendo os tubos de 30 a 50 vezes (precipitação SDS). Este processo lisa os eritrócitos, remove a hemoglobina e lisa os leucócitos, preservando o DNA nuclear. Em seguida, foram adicionados 3 μL de proteinase K (20 mg/mL) incubando em banho maria a 55ºC

por 16 h. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de Acetato de Potássio (5M) e incubado em gelo por 5 min. Neste momento, ocorre a formação de um precipitado de proteína. Em um novo tubo plástico de 2 mL foi adicionado o sobrenadante e 600 µL de álcool isopropílico *e c*entrifugado a 3000 rpm por 1 min. descartando o sobrenadante. Posteriormente, foram adicionados 600 µL de etanol a 70% (4°C) para precipitação do DNA. Após a evaporação do etanol à temperatura ambiente por aproximadamente 15 min, o precipitado de DNA foi redissolvido em 50 µL de *TE* (Tris.Cl 1M; EDTA 0,5M - pH 7,6). A quantificação do DNA foi realizada pela determinação espectrofotométrica da concentração do DNA nas absorbâncias de 260 e 280 nm (Rel 260/280).

4.7.2 Reação de Polimerase em Cadeia - PCR

Foram utilizados 500 ng de DNA genômico para esta reação. O PCR foi realizado em um volume final de reação de 25 µL, contendo 0,5µM de cada primer (sense: 5'- TGG AGA GTG CTG GTG TAC CCC A - 3'; antisense: 5'- GCC TCC ACC CCC ACC CTG TC –3') 200µM de cada dNTP, 1X Tampão de PCR fornecido pela Invitrogen Corp (10mM Tris-HCl, pH 8,8, 50mM KCl), 1,25mM $MgCl_2$ e 2,5Unidades de *DNA Taq polymerase* (Biosystems, Curitiba, Brasil). As condições de PCR foram as seguintes: pré-desnaturação a 94ºC por 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de primers a 69°C por 30 segundos e síntese a 72°C por 1 min.

4.7.3 Digestão do produto de PCR amplificado

O produto amplificado foi digerido durante 4 horas com a endonuclease *ApaI* a 25°C. Foram utilizadas 5U de *Apa*I, diluído 1X o tampão da enzima fornecido pelo fabricante (50mM NaCl, 10mM Tris-Cl, 10mM $MgCl_2$, 10mM ditiotriol, pH 7,9) (Biolabs Inc, New England), para digerir 5 µL de produto de PCR, em um volume final de 10 µL.

4.7.4 Eletroforese e visualização

Os fragmentos foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 12% m/v. As condições de corrida foram: 300V, 50W e 20mA, por 2 a 3 horas. Foi utilizado TBE (Tris base com EDTA) como líquido de corrida e tampão de amostra à base de azul de bromofenol, sacarose e glicerol (0,25%, 40%, 40%,

respectivamente). A visualização foi realizada com coloração pela prata. Em resumo, o gel foi submetido a uma solução de fixação de DNA (1% de ácido acético em uma solução de etanol a 10%) durante 10 min. Esta solução fixa o DNA ao gel de poliacrilamida. Em seguida o gel foi submetido a uma solução aquosa de nitrato de prata ($AgNO_3$ 0,2% m/v) durante 30 min. O nitrato de prata desta solução, fixa-se fortemente ao DNA. Após este período o gel foi lavado duas vezes com água corrente para retirada do excesso da solução de prata. Em seguida o gel foi revelado com solução aquosa de hidróxido de sódio com formaldeído como catalisador (NaOH 3% m/v, CHOH 1% m/v). Esta solução reage com o nitrato de prata precipitando a prata e formando nitrato de sódio e água. Desta forma pode-se visualizar as bandas de DNA com prata, uma vez que esta é rapidamente oxidada pelo oxigênio atmosférico formando uma coloração fortemente escura. Os indivíduos com genótipo GPx-1 Leu-Leu (Leucina) apresentam somente uma banda de 222 pb; os com genótipo GPx-1 Pro-Leu (Prolina-Leucina) apresentam fragmentos de 175 e 222 pb; indivíduos com genótipo GPx-1 Pro-Pro (Prolina) apresentam apenas uma banda com tamanho de 175bp.

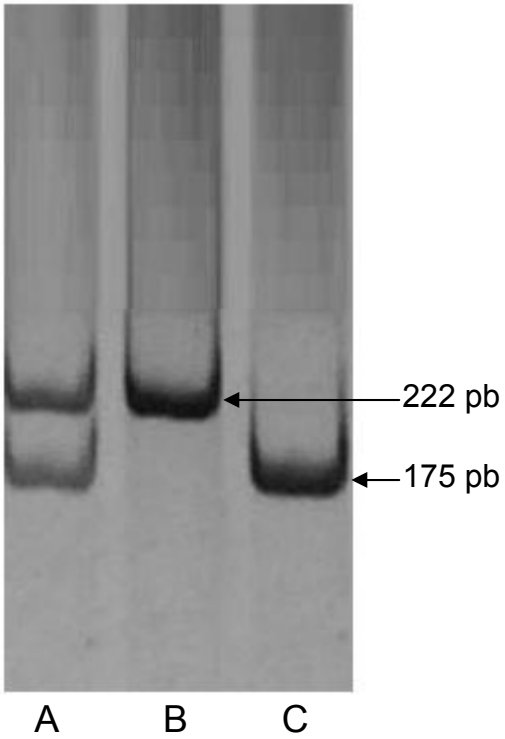

Fig. 3 Genotipagem do polimorfismo da GPx-1. Os produtos de PCR são digeridos por enzima de restrição (*ApaI*) produzindo diferentes fragmentos. A: Pro-Leu, B: Leu-Leu, C: Pro-Pro.

4.8 Análise dos resultados

4.8.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para a freqüência de genótipos com teste de qui-quadrado, utilizando o software Bioestat 3.0 (AYRES e AYRES, 2003).

4.8.2 Análise estatística

Os voluntários foram divididos em grupos de acordo com os genótipos (TT e TC + CC) e concentrações de chumbo no sangue (≤ 10 µg/dL e > 10 µg/dL) para as comparações estatísticas entre as diversas variáveis em estudo. Os genótipos TT e TC + CC da GPx-1, foram avaliados para diferenças entre as características dos indivíduos (Tabela 1), Pb_S, Pb_P, fração Pb_P/Pb_S (%), MDA e proteína carbonilada, com o teste (ANOVA, *one way*) "T" (*Student´s t test*) utilizando o software GraphPad PRISM (GraphPad Prism, Software Inc., San Diego, CA, USA). Para o estudo de freqüência genotípica e alélica (%) entre brancos e negros utilizou-se o teste de chi-quadrado. Para os estudos de associação entre variáveis foi aplicada correlação de Pearson após os dados terem sido normalizados (aplicação de log).Todos os resultados são aqui apresentados como média ± desvio padrão (média ± DP). Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

A idade dos voluntários deste estudo variou entre 16 a 80 anos (média 35 anos), sendo 28 homens e 56 mulheres. Os valores de chumbo no sangue variaram de 10,0 a 221,0 µg/L com média de 64,4 ± 36,6 µg/L e mediana de 59,0. Os valores de chumbo no plasma variaram de 0,02 a 2,05 µg/L, com média de 0,50 ± 0,46 µg/L e mediana 0,35. A razão chumbo plasma/chumbo sangue apresentou variação de 0,07 a 2,44, com média de 0,76 ± 0,60 e mediana de 0,61. Os valores de MDA variaram de 2,6 a 9,5 µM, com média de 4,73 ± 1,37 µM e mediana de 4,6. Já os valores de proteína carbonilada variaram de 0,18 a 2,58 nmol/g de proteína, com média de 1,05 ± 0,51 nmol/g de proteína e mediana de 0,90.

Parâmetros hematológicos como hemoglobina e hematócrito também foram avaliados apresentando valores de 10,3 a 17,1 g/dL, com média de 13,9 ± 1,3 g/dL e mediana de 13,8 para hemoglobina, e 31,8 a 55,3%, com média de 41,6 ± 4,3% e mediana de 41,5 para o hematócrito. Dos indivíduos estudados 72,4% eram não fumantes, enquanto 27,6% eram fumantes.

A Figura 1 mostra a relação entre o Pb_S e o MDA para todos os voluntários deste estudo. Não foi observada correlação entre estas variáveis.

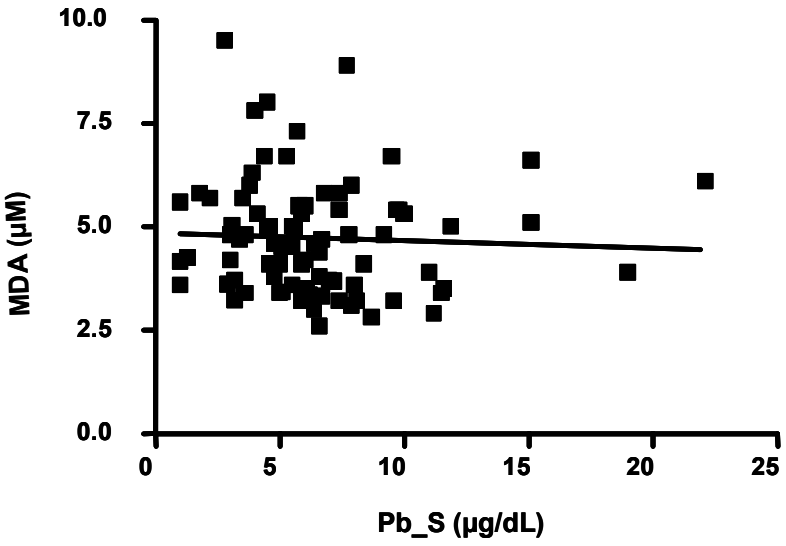

Figura 4. Relação entre Pb_S e MDA para todos voluntários deste estudo

Em um estudo subseqüente, os voluntários foram divididos em dois grupos: (i) ≤10,0 µg/dL de chumbo no sangue; (ii) > 10,0 µg/dL de chumbo no sangue. Neste caso os voluntários apresentaram para hemoglobina, média de 13,90 ± 1,34 g/dL e 14,04 ± 1,08 g/dL, respectivamente; para o hematócrito os mesmos apresentaram média de 41,62 ± 4,15% e 42,40 ± 4,13%, respectivamente. A pressão sanguínea diastólica verificada apresentou média de 74,4 ± 13,1 mm/Hg e 71,8 ± 12,5 mm/Hg, respectivamente; enquanto a pressão sanguínea sistólica apresentou média de 117,1 ± 17,6 mm/Hg e 115,1 ± 17,0 mm/Hg, respectivamente. Já a razão chumbo plasma/chumbo sangue apresentou média de 0,85 ± 0,41 e 0,94 ± 0,32, respectivamente. Os valores de MDA apresentaram média de 4,73 ± 1,40 µM e 4,74 ± 1,27 µM, respectivamente. Já os valores de proteína carbonilada apresentaram média de 1,04 ± 0,54 nmol/g de proteína e de 1,05 ± 0,32 nmol/g de proteína, respectivamente.

Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos com maior e menor quantidade de chumbo no sangue (Tabela 1).

Tabela1. Estatística descritiva dos voluntários em estudo de acordo com as concentrações de chumbo em sangue. Os valores são expressos em média ± DP.

Parâmetros	**Geral (n=84)**	**≤10 µg/dL (n=70)**	**>10 µg/dL (n=14)**	***Valor de p****
Hemoglobina (g/dL)	13,92 ± 1,33	13,90 ± 1,34	14,04 ± 1,08	*NS*
Hematócrito (%)	41,64 ± 4,33	41,62 ± 4,15	42,40 ± 4,13	*NS*
Pressão sanguínea diastólica (mm/Hg)	73,8 ± 12,9	74,4 ± 13,1	71,8 ± 12,5	*NS*
Pressão sanguínea sistólica (mm/Hg)	116,8 ± 17,5	117,1 ± 17,6	115,1 ± 17,0	*NS*
Pb-P/Pb-S (%)	0,76 ± 0,60	0,85 ± 0,41	0,94 ± 0,32	*NS*
MDA (µM)	4,73 ± 1,37	4,73 ± 1,40	4,74 ± 1,27	*NS*
Proteína Carbonila (nmol/g de proteína)	1,05 ± 0,51	1,04 ± 0,54	1,05 ± 0,32	*NS*

*teste t

Posteriormente, foi realizada a genotipagem para o polimorfismo Pro^{198}Leu da GPx-1 nos 127 voluntários e os mesmos apresentaram a seguinte distribuição: 68 indivíduos com genótipo GPx-1 TT (53,5%), 51 com genótipo GPx-1 TC (40,2%) e 8 com genótipo GPx-1 CC (6,3%). Esta distribuição de genótipos mostrou-se em acordo com a lei de Hardy - Weinberg (P=0,71) (Tabela 2). As freqüências alélicas para os alelos T e C da GPx-1 foram 0,73 e 0,27, respectivamente.

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

Genótipo GPX-1	***n* (obs.)**	***n* (exp.)**	**Teste qui quadrado**
TT	68	68.83	*P*=0,71
TC	51	49,32	
CC	08	8,83	
	127		

A Tabela 3 mostra a freqüência dos genótipos e dos alelos em negros (n=48) e brancos (n=79) para o polimorfismo Pro^{198}Leu da GPx-1 na população estudada neste projeto e do projeto Hapmap. A distribuição dos genótipos mostrou-se em acordo com a lei de Hardy - Weinberg (P>0,05).

Tabela 3. Frequência genotípica e alélica (%) em dois grupos étnicos estudados e do projeto HapMap (International HapMap Project, 2007).

	ESTE ESTUDO		**PROJETO HAPMAP #**	
Genótipo	Negros	Brancos	Negros	Brancos
TT	44,3	58,0*	54,2	67,7
TC	52,9	31,3*	41,7	25,8
CC	2,8	10,7*	4,1	6,5
T	70,7	73,7	75,1	80,6
C	29,3	26,3	25,0	19,4

Os negros são de Yoruba em Ibadan, Nigéria e os brancos são residentes em Utah com ancestrais do norte e oeste da Europa. N = número de indivíduos. p<0.05 comparados aos negros.

Em seguida, os voluntários foram novamente divididos em dois outros grupos separados pelos genótipos T (TT) e C (TC+CC): (i) grupo não portador do alelo C e (ii) grupo portador do alelo C. Os voluntários dos grupos i e ii apresentaram níveis de hemoglobina de 13,91 ± 1,47 g/dL e 13,90 ± 1,16 g/dL, respectivamente. Já para o hematócrito os valores observados foram de 41,82 ± 4,82% e 41,43 ± 3,78%, respectivamente. A pressão sanguínea diastólica foi de 75,8 ± 13,0 mm/Hg e 71,8 ± 12,7 mm/Hg, respectivamente e a pressão sanguínea sistólica de 116,9 ± 17,2 mm/Hg e 116,5 ± 17,9 mm/Hg, respectivamente.

Os valores de chumbo no sangue foram de 66,40 ± 4,10 μg/L; 62,10 ± 3,09 μg/L, para os grupos I e ii, respectivamente. Os valores correspondentes de chumbo no plasma foram de 0,53 ± 0,50 μg/L; 0,47 ± 0,40 μg/L, respectivamente. Já a razão de chumbo plasmática apresentou os valores de 0,80 ± 0,68 para o grupo i e 0,72 ± 0,49 para o grupo ii. A Tabela 4 sumariza os valores encontrados para os parâmetros avaliados neste estudo. Os valores são apresentados na forma de média ± desvio padrão.

Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada na idade, parâmetros hematológicos, pressão arterial, hábito de fumar, concentrações de Pb nos diversos marcadores de exposição e estresse oxidativo entre os voluntários dos grupos i e ii.

Tabela 4. Estatística descritiva dos voluntários participantes do estudo de acordo com o genótipo. Os valores são expressos em média ± desvio padrão.

Parâmetros	**Geral (*n*=84)**	**GPx-1 T (*n*=45)**	**GPx-1 C (*n*=39)**	***Valor de p****
Idade	35,06 ± 12,17	36,70 ± 10,22	33,10 ± 13,97	*NS*
Hemoglobina (g/dL)	13,92 ± 1,33	13,91 ± 1,47	13,90 ± 1,16	*NS*
Hematócrito (%)	41,64 ± 4,33	41,82 ± 4,82	41,43 ± 3,78	*NS*
Pressão sanguínea diastólica (mm/Hg)	73,8 ± 12,9	75,8 ± 13,0	71,8 ± 12,7	*NS*
Pressão sanguínea sistólica (mm/Hg)	116,8 ± 17,5	116,9 ± 17,2	116,5 ± 17,9	*NS*
Pb-S (µg/L)	64,40 ± 36,6	66,40 ± 4,10	62,10 ± 3,09	NS
Pb-P (µg/L)	0,50 ± 0,46	0,53 ± 0,50	0,47 ± 0,40	NS
Pb-P/Pb-S (%)	0,76 ± 0,60	0,80 ± 0,68	0,72 ± 0,49	*NS*
MDA (µM)	4,73 ± 1,37	4,86 ± 1,39	4,58 ± 1,36	*NS*
Proteína Carbonilada (nmol/g de ptn)	1,05 ± 0,51	1,00 ± 0,50	1,09 ± 0,54	*NS*
Fumantes (%)	27,6	15,8	11,8	*NS*
Não-fumantes (%)	72,4	37,8	28,3	*NS*

*NS= não significante. *teste t.*

Em um estudo posterior, os voluntários foram subdivididos em quatro grupos de acordo com as concentrações de chumbo no sangue e a presença do alelo C: (i) grupo não portador do alelo C e com concentrações de Pb_S ≤ 10,0 µg/dL; (ii) grupo portador do alelo C e com concentrações de Pb_S ≤ 10,0 µg/dL; (iii) grupo não portador do alelo C e com concentrações de Pb_S > 10,0 µg/dL e (iv) grupo portador do alelo C e com concentrações de Pb_S > 10,0 µg/dL. Foram também avaliadas para estes grupos, possíveis diferenças estatísticas (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Estatística descritiva dos voluntários participantes do estudo com Pb_S ≤ 10,0 µg/dL.

Parâmetros	**Grupo T (n=35)**	**Grupo C (n=34)**	***p****
Pb_S (µg/dL)	5,01 ± 2,04	5,28 ± 1,83	*NS*
Pb_P (µg/dL)	0,32 ± 0,26	0,37 ± 0,29	*NS*
Pb_P/Pb_S (%)	0,72 ± 0,73	0,69 ± 0,51	*NS*
MDA (µM)	4,88 ± 1,46	4,56 ± 1,36	*NS*
Proteína carbonilada (nmol/g de proteína)	1,07 ± 0,58	1,00 ± 0,52	*NS*
Pressão Sistólica	118,6 ± 18,4	114,0 ± 16,1	*NS*
Pressão Diastólica	76,9 ± 13,6	69,9 ± 12,1	*NS*

NS= não significante. **Mann-Whitney test.* Dados apresentados como média ± DP.

Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada nas concentrações de Pb, MDA e proteína entre os voluntários dos grupos i, ii, iii e iv com concentrações de Pb_S ≤ 10,0 µg/dL.

Tabela 6. Estatística descritiva dos voluntários participantes do estudo com Pb_S > 10,0 µg/dL.

Parâmetros	**Grupo T (n=10)**	**Grupo C (n= 5)**	***p****
Pb_S (µg/dL)	12,36 ± 4,47	12,54 ± 2,42	*NS*
Pb_P (µg/dL)	1,29 ± 0,40	1,11 ± 0,43	*NS*
Pb_P/Pb_S (%)	1,08 ± 0,30	0,91 ± 0,32	*NS*
MDA (µM)	4,78 ± 1,15	4,68 ± 1,51	*NS*
Proteína carbonilada (nmol/g de proteína)	1,13 ± 0,34	0,93 ± 0,23	*NS*
Pressão Sistólica	116,1 ± 16,9	118,1 ± 19,2	*NS*
Pressão Diastólica	75,2 ± 12,9	73,0 ± 13,3	*NS*

NS= não significante. **Mann-Whitney test.* Dados apresentados como média ± DP.

Novamente, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada nas concentrações de Pb, MDA e proteína carbonilada entre os voluntários dos grupos i, ii, iii e iv com concentrações de Pb_S > 10,0 µg/dL. Quando comparamos os valores de MDA e proteína carbonilada, entre os portadores do alelo C com Pb_S ≤ 10,0 µg/dL e Pb_S > 10,0 µg/dL também não foi observada diferença estatística (p=0,86 e p=0,77, respectivamente).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi observada uma concentração média de chumbo no sangue igual a 6,44 ± 3,66 µg/dL. Apesar das concentrações de chumbo encontradas nesta população terem sido baixas, estudos experimentais e clínicos mais recentes mostram uma relação entre concentrações baixas de chumbo no sangue (inferiores a 10,0 µg/dL) e aumento do estresse oxidativo (GONICK e col., 1997; VAZIRI e col., 1999), levando alguns pesquisadores a questionarem se existe um limite de segurança para exposição ao chumbo e se o mesmo não deve ser revisto. Entretanto, nosso estudo não observou diferença estatística em relação aos parâmetros de estresse oxidativo avaliados (MDA e proteínas carboniladas) entre indivíduos com concentração de chumbo no sangue inferior a 10,0 µg/dL e aqueles com Pb >10 µg/dL. Nenhuma correlação entre Pb_S e MDA para os voluntários deste estudo foi também observada. Isto pode ter ocorrido devido ao pequeno número de voluntários com concentrações maiores que 10 µg/dL de chumbo no sangue ou graças a um fator genético que poderia estar modulando esta relação.

Nosso grupo de estudo tem observado a influência de polimorfismos genéticos sobre os níveis de chumbo no sangue, chumbo no plasma e da fração %Pb_P/Pb_S de indivíduos expostos ambientalmente a este metal na cidade de Bauru-SP. Recentemente, foi observado que o polimorfismo $G^{177}C$ da ALAD (segunda enzima da via biossintética do heme, catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido δ-aminolevulínico (ALA) para formar porfobilinogênio, um precursor do heme) influencia os níveis destes indicadores biológicos de exposição. Portadores do genótipo ALAD1-2/ALAD2-2 apresentaram níveis Pb_P e a fração %Pb_P/Pb_S aumentados, quando comparados com voluntários de genótipo ALAD1-1 (MONTENEGRO e col., 2006). A fonte prooxidante durante o estresse oxidativo induzido pelo chumbo nas hemácias não é bem conhecida. No entanto, vários estudos sugerem ser o ALA essa possível fonte (MONTEIRO e col., 1989). O chumbo é conhecido por inibir a enzima ALAD (ácido δ-aminolevulínico desidratase) resultando em acúmulo de ALA durante a biossíntese do heme. Este ALA acumulado sofre uma autooxidação catalizada por metal levando a um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como

superóxidos, peróxidos de hidrogênio e radicais ALA* (MONTEIRO e col., 1989; OTEIZA e col., 1995).

Neste estudo hipotetizamos que portadores do alelo C da GPx-1 poderiam estar mais susceptíveis aos danos no estresse oxidativo induzido pelo chumbo que portadores do alelo menos raro T.

A GPx-1 é uma enzima antioxidante dependente de selênio, cujo gene está localizado no cromossomo 3p21, estudos têm mostrado que a suplementação de selênio aumenta a expressão da GPx-1, aumenta a capacidade antioxidante da célula, diminuindo então o estresse oxidativo intracelular (SAEDI e col., 1988; CHADA e col., 1989).

O presente estudo mostrou que a freqüência do alelo T (que codifica o aminoácido Prolina na GPx-1) nos voluntários, foi de 73% enquanto a freqüência do alelo C (que codifica o aminoácido Leucina) foi de 27%. Estudos recentes têm mostrado que a presença de Leucina na enzima GPx-1 à torna menos responsiva, quando comparada à GPx-1 contendo Prolina, em relação ao aumento da atividade induzida pela suplementação de selênio (HU e col., 2003).

Os mecanismos de diferenças biológicas entre os alelos T e C da GPx-1, não estão ainda bem esclarecidos. Os resultados de diversos estudos sugerem que a presença do alelo C ofereça um maior risco ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como por exemplo, os de mama (HU e col., 2003), de pulmão (RATNASINGLE e col., 2000) e de bexiga (ICHIMURA e col., 2004). Também foi observada a prevalência de doenças cardiovasculares, vascular periférica e cerebrovasculares significativamente maior em indivíduos Pro-Leu que em indivíduos Pro-Pro portadores de diabetes tipo 2. A presença do alelo Leu contribuiria para o aumento do estresse oxidativo, por diminuir a atividade da enzima GPx-1 (HAMANISHI e col., 2004). No entanto, nosso estudo não apresentou nenhuma diferença estatística significativa na pressão arterial, concentrações de Pb nos diversos marcadores de exposição e estresse oxidativo (MDA e proteínas carboniladas) entre os voluntários do grupo não portador do alelo C e do grupo portador do alelo C. Além disso, quando comparamos os valores de MDA e proteína carbonilada, entre os portadores do alelo C com Pb_S ≤ 10,0 µg/dL e Pb_S > 10,0 µg/dL também não foi observada diferença estatística ($p=0,86$ e $p=0,77$, respectivamente).

Um estudo conduzido por Ichimura e col. (2004), com voluntários japoneses, mostrou que a freqüência para o alelo T neste grupo foi de 95% enquanto para o alelo C foi de 5%. Este resultado foi estatisticamente diferente do observado para um grupo de caucasianos onde a freqüência do alelo T foi de 64% e do alelo C de 36% (ICHIMURA e col., 2004). Já Ratnasinghe e col. (2000) não observaram a presença do alelo C em uma população chinesa, mostrando que este alelo é mais raro para este grupo (RATNASINGHE e col., 2000). Estas diferenças indicam a existência de uma significante variação étnica no polimorfismo da GPx-1, o que explicaria, em parte, as variações na incidência de determinados tipos de câncer, como por exemplo o de bexiga, entre os diferentes grupos étnicos (ICHIMURA e col., 2004).

A Tabela 3 mostra a freqüência dos genótipos e dos alelos em negros (n=48) e brancos (n=79) para o polimorfismo $Pro^{198}Leu$ da GPx-1 na população estudada neste projeto e do projeto Hapmap. Os dados mostram que 29,3% dos negros apresentaram o alelo C enquanto para brancos este número foi de 26,3%. Os valores encontrados estão em acordo com os dados do projeto Hapmap. Os dados deste estudo mostram-se menos discrepantes em relação às diferenças interétnicas quando comparados aos dados do projeto Hapmap. É provável que esta diferença tenha ocorrido pelo fato do nosso estudo ter considerado também mulatos como negros, diferentemente do projeto Hapmap, onde os negros são de Yoruba em Ibadan na Nigéria. Já os brancos do projeto Hapmap são formados por voluntários residentes em Utah (EUA), com ancestrais do norte e oeste da Europa. Não foi observada diferença estatística na freqüência alélica entre brancos e negros neste estudo, mostrando que não há diferenças estatísticas significativas para este polimorfismo da GPx-1 entre negros e brancos, no Brasil.

Vários estudos têm mostrado que baixas concentrações de Pb_S seriam também responsáveis por danos à saúde, entre eles hipertensão arterial (HARLAN e col., 1988; SHARP e col., 1988; APOSTOLI e col., 1992; MENDITTO e col., 1994; STAESSEN e col., 1995; HU e col., 1996; FLEET e col., 1996; HOUSTON e col., 1999; CHENG e col., 2001; HU e col., 2001;.DEN HOND e col., 2002; ROTHENBERG e col., 2002; GLENN e col., 2003; NASH e col., 2003).

Os dados sobre a relação entre o Pb_S e a pressão sangüínea em estudos epidemiológicos da população em geral permanecem controversos. Dolenc e col. (1993) pesquisaram a possível influência de baixos níveis de exposição ao chumbo

sobre a pressão sangüínea em 827 homens e 821 mulheres e concluíram que a exposição ao chumbo não está associada com o aumento da pressão sangüínea na população em geral. Nordberg e col. (2000) chegaram a uma conclusão idêntica ao estudarem uma população de 804 idosos (média de idade = 88,4 anos). No entanto, uma pesquisa realizada na Inglaterra com 4.326 homens e mulheres acima de 16 anos encontrou uma correlação positiva entre o chumbo no sangue e a pressão diastólica em homens (BOST e col., 1999). Para Vaziri e Khan (2007) a exposição crônica a baixos níveis de Pb pode desencadear uma cascata de eventos, relacionados principalmente ao aumento do estresse oxidativo, que culmina no desenvolvimento da hipertensão e doenças cardiovasculares. Em nosso estudo, no entanto, não foi observado aumento da pressão arterial dos voluntários, talvez pelo fato de não ter havido um aumento nos níveis de estresse oxidativo. A pressão sanguínea diastólica e sistólica, verificadas para os grupos com Pb_S ≤ 10 µg/dL e Pb_S > 10 µg/dL não apresentaram diferenças estatísticas significantes.

Uma pesquisa com 798 trabalhadores ocupacionalmente expostos ao chumbo e 135 controles concluiu que o genótipo do receptor da vitamina D, assim como o chumbo no sangue, na tíbia e no chumbo quelado ao DMSA, estava associado com a pressão sistólica, sendo que o chumbo na tíbia era o único biomarcador significativo do estado de hipertensão. Ao contrário do receptor da vitamina D, o genótipo do ácido delta-aminolevulínico desidratase não estava associado à pressão e não modificou quaisquer das medidas de pressão do sangue (LEE e col., 2001). Em nosso estudo não foi observada nenhuma correlação entre o polimorfismo $Pro^{198}Leu$ da GPx-1 e o aumento da pressão arterial.

7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados nesta dissertação nos permitem concluir que:

O polimorfismo $Pro^{198}Leu$ da GPx-1 não torna indivíduos ambientalmente expostos ao chumbo mais suscetíveis aos danos do estresse oxidativo induzidos pelo metal, uma vez que os voluntários portadores do polimorfismo não apresentaram níveis de MDA e proteína carbonilada aumentados, quando comparados com os voluntários sem o polimorfismo. Entretanto, nosso estudo apresenta algumas limitações que devem ser avaliadas em estudos futuros em populações expostas ao chumbo. Não foi avaliada neste estudo a atividade da enzima glutationa peroxidase que como demonstrado em vários estudos é afetada pelo polimorfismo $Pro^{198}Leu$ e poderia estar diminuída em indivíduos expostos ao chumbo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN, R. P.; HAMADEH, H. K.; BUSHEL, P. R.; BENNETT, L.; AFSHARI, C. A.; PAULES, R. S. Genomic interrogation of mechanism(s) underlying cellular responses to toxicants. **Toxicology**, v. 181-182, p. 555-563, 2002.

APOSTOLI, P.; MARANELLI, G.; MICCIOLO, R. Is hypertension a confounding factor in the assessment of blood lead reference values? **Science of Total Environmental**, v. 120, p. 127-134, 1992.

ATSDR. Toxicological profile for lead. U.S. Department of health and human services. Public health services. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**. 1993.

ATSDR. Toxicological Profile for Lead. Atlanta. US Department of Health and Human Services, Public Health Services. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, 1999.

AYRES, M.; AYRES JR, M. **BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2003.

BAIRD, C. Metais Pesados Tóxicos. In: **Química Ambiental**. 2. ed., São Paulo: Bookman, p. 403-439, 2002.

BERGADAHL, I. A.; GRUBB, A.; SCHÜTZ, A.; DESNICK, R. J.; WETMUR, J. G.; SASSA, S.; SKERFVING, S. Lead binding to δ-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in erythrocytes. **Pharmacology and Toxicology**, v. 81, p. 53-158, 1997.

BOST, L.; PRIMATESTA, P.; DONG, W.; POULTER, N. Blood lead and blood pressure: evidence from the Health Survey for England 1995. **Journal of Human Hypertension**, v, 19, p. 123-128, 1999.

BRAY, T. M.; TAYLOR, C. G. Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress. **Cancer Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 71, p. 746-751, 1993.

CANFIELD, R. L.; HENDERSON JR, C. R.; CORY-SLECHTA, D. A.; COX, C.; JUSKO, T. A.; LANPHEAR B. P. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1517-1526, 2003.

CHADA, S.; WHITNEY, C.; NEWBURGER, P. E. Post-transcriptional regulation of gluthatione peroxidase gene expression by selenium in the HL-60 human myeloid cell line. **Blood**, v. 74, p. 2535, 1989.

CHENG, Y.; SCHWARTZ, J.; SPARROW, D.; ARO, A.; WEISS, S. T.; HU, H. Bone lead and blood lead levels in relation to baseline blood pressure and the prospective development of hypertension: The normotensive aging study. **American Journal of Epidemiology**, v. 153, p. 164-171, 2001.

DEKORT, L. A. M.; ZWENNIS, W. C. M. Blood lead and blood-pressure-some implications for the situation in the Netherlands. **Environmental Health Perspectives**, v. 78, p.67-70, 1988.

DEN HOND, E.; NAWROT, T.; STAESSEN, J. A. The relationship between blood pressure and blood lead in NHANES III. National Health and Nutritional Examination Survey. **Journal of Human Hypertension**, v. 16, p. 563-568, 2002.

DOLENC, P.; STAESSEN, J. A.; LAUWERYS, R.R.; AMERY, A. Short report: low-level lead exposure does not increase the blood pressure in the general population. Cadmibel Study Group. **Journal of Hypertension**, v. 11, p. 589-593, 1993.

DURAN, N.; CADENAS, E. Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation. Rev. **Reviews of Chemical Intermediates**, v. 8, p. 147. 1987.

EL-SOKKARY, G. H.; ABDEL-RAHMAN, G. H.; KAMEL, E. S. Melatonin protects against lead-induced hepatic and renal toxicity in males rats. **Toxicology**, v. 213, p. 25-33, 2005.

FINDLAY, V. J.; TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M. Sulfiredoxin: A potential therapeutic agent ? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. 374-379, 2005.

FLEET, J. C. Bone lead as a risk factor for hypertension in men. **Nutrition Reviews**, v. 54, p. 180-182, 1996.

FLORA, J. S.; PANDE, M.; MEHTA, A. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of cronic lead intoxication. **Chemico-Biological Interactions**, v. 145, p. 267-280, 2003.

FUKUMOTO, K.; KARAI, I.;HORIGUCHI, S. Effect of lead on erythrocyte menbranes. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 40, p. 220-223, 1983.

GERCKEN, B.; BARNES, R. M. Determination of lead and other trace-element species in blood by size exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass-spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 283-287, 1991.

GLENN, B. S.; STEWART, W. F.; LINKS, J. M.; TODD, A. C.; SCHWARTZ, B. S. The longitudinal association of lead with blood pressure. **Epidemiology**, v. 14, p. 30-36, 2003.

GODWIN, H. A. The biological chemistry of lead. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 223-227, 2001.

GONICK, H. C.; DING, Y.; BONDY, S. C.; NI, Z.; VAZIRI, N. D. Lead-induced hypertension: Interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. **Hypertension**, v. 30, p. 1487-1492, 1997.

GROTTO, D.; SANTA MARIA, L. D.; BOEIRA, S.; VALENTINI, J.; CHARÃO, M. F.; MORO, A. M.; NASCIMENTO, P. C.; POMBLUM, V. J.; GARCIA, S. C. J. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid

chromatography-visible detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 619-624, 2007.

GURER, H.; ÖZGÜNES, H.; NEAL, R.; SPITZ, D. R.; ERCAL, N. Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats. **Toxicology**, v. 128, p. 181-189, 1998.

GURER, H.; SABIR, H. U.; ÖZGÜNES, H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. **Toxicology**, v. 195, p. 147-154, 2004.

GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. **Free Radical Research Communications**, v. 19, p. 141-158, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M .C.; **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford: Claredon Press, p. 543, 1991.

HAMANISHI, T.; FURUTA, H.; KATO, H. Functional variants in the GPx-1 gene are associated with increased Intima-Media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 Diabetic patients. **American Diabetes Association**, v. 53, p. 2455-2460, 2004.

HARLAN, W. R. The relationship of blood lead levels to blood pressure in the US population. **Environmental Health Perspectives**, v. 78, p. 9-13, 1988.

HENRY, C. J.; PHILLIPS, R.; CARPANINI, F.; CORTON, J. C.; CRAIG, K.; IGARASHI, K.; LEBOEUF, R.; MARCHANT, G.; OSBORN, K.; PENNIE, W. D.; SMITH, L. L.; TETA, M. J.; VU, V. Use of Genomics in Toxicology and Epidemiology: Findings and Recommendations of a workshop, **Environmental Health Perpectives**, v. 110, p. 1047-1050, 2002.

HOUSTON, D.K.; JOHNSON, M.A.; Lead as a risk factor for hypertension in women. **Nutrition Reviews**, v. 57, p. 227-229, 1999.

HU, H.; ARO, A.; PAYTON, M.; KORRICK, S.; SPARROW, D.; WEISS, S. T.; ROTNITZKY, A. The relationship of bone and blood lead to hypertension. The normative aging study. **The Journal of American Medical Association**, v. 275, p. 1171-1176, 1996.

HU, H. Poorly controlled hypertension in a painter with chronic lead toxicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 95-99, 2001.

HU, Y. J.; DIAMOND, A. M. Role of Glutathione Peroxidase 1 in Breast Cancer: Loss of Heterozygosity and Allelic Differences in the Response to Selenium. **Cancer Research**, v. 63, p. 3347-3351, 2003.

IANNACCONE, P. M. Toxicogenomics: "The call of the wild chip**", Environmental Health Perpectives**, v. 109, p. A8-A11, 2001.

ICHIMURA, Y.; HABUCHI, T.; TSUCHIYA, N.; WANG, L.; OYAMA, C.; SATO, K.; NISHIYAMA, H.; OGAWA, O. Increased risk of bladder câncer associated with a

glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. **The Journal of Urology**, v. 172, p. 728-732, 2004.

JUSKO T. A.; HENDERSON C. R.; LANPHEAR B. P.; CORY-SLECHTA D. A.; DEBORAH A.; PARSONS P. J.; CANFIELD R. L. Blood lead concentrations < 10 µg/dL and child intelligence at 6 years of age. **Environmental Health Perpectives**, v. 116, p. 243-248, 2008.

KELADA, S. M.; EATON, D. L.; WANG, S. S.; ROTHMAN, N. R.; KHOURY, M. J. The role of genetic polymorphisms in environmental health. Environmental Health Perpectives, v. 111, p.1055-1064, 2003.

KISS, C.; LI, J.; SZELES, A.; GIZATULLIN, R. Z.; KASHUBA, V. I.; LUSNIKOVA, T.; PROTOPOPOV, A. I.; KELVE, M.; KISS, H.; KHOLODNYUK, I. D.; IMREH, S.; KLEIN, G.; ZABAROROVSKY, E. R. Assignment of the ARHA and GPx-1 genes to human chromosome bands 3p32.3 by in situ hybridization and with somatic cell hybrids. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 79, p. 228-230, 1997.

KLAASSEN, C. D. Metais pesados e seus antagonistas. In: **As bases farmacológicas da terapêutica**, 8. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 1061-1065, 1991.

KOPP, S. J.; BARRON, J. T.; TOW, J. P. Cardiovascular actions of lead and relationship to hypertension - a review. **Environmental Health Perspectives**, v. 78, p. 91-99, 1988.

KOSNETT, M. J. Intoxicação por metais pesados e quelantes. In: **Farmacologia Básica e Clínica**, 8. ed., Rio de Janueiro: Guanabara Koogan. P. 867-870, 2003.

KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 48, p. 439-446, 1996.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C. Inicial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, p. 860-921, 2001.

LEE, B. K.; LEE, G. S.; STEWART, W. F.; AHN, K. D.; SIMON, D.; KELSEY, K. T.; TODD, A. C.; SCHWARTZ, B. S. Associations of blood pressure and hypertension with lead dose measures and polymorphisms in the vitamin D receptor and delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 383-389, 2001.

LEVANDER, O. A.; MORRIS, V. C.; FERRATI, R. J. Filterability of erythrocytes from vitamin E-deficient, lead-poisined rats. **Journal of Nutrition**, v. 107, p. 363-72, 1977.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LOCKITCH, G. Perspectives on lead toxicity. **Clinical Biochemistry**. v. 26, p. 371-381, 1993.

MANTON, W. I.; ANGLE, C. R.; STANEK, K. L.; REESE, Y. R.; KUEHNEMANN; T. J. Acquisition and retention of lead by young children**, Environmental Research**, v. 82, p.60-80, 2000.

MASSUMOTO, H.; KISSNER, R.; KOPPENOL, W. H.; SIES, H. Arch. Biochem. Biophys. v. 330, p. 216-218, 1996.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711- 760, 1983.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Methods in Enzymology**, v. 251, p. 3-7, 1995.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Agentes Tóxicos Contaminantes de Alimentos. In: **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, p. 61-130, 2000.

MENDITTO, A.; MORISI, G.; SPAGNOLO, A.; MENCOTTI, A. Association of blood lead to blood pressure in men aged 55–75 years: Effects of selected social and biochemical cofounders. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 107-111, 1994.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 1215, 1988.

MILLS, G. C. Hemoglobin catabolism. i. glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 229, p. 189, 1957.

MONTEIRO, H. P.; ABDALLA, D. S. P.; ARCURE, A. S.; BECHARA, E. J. H. Oxygen toxicity related to exposure to lead. **Clinical Chemistry**, v. 31, p. 1673-1676, 1985.

MONTEIRO, H. P.; ABDALLA, D. S. P.; AUGUSTO, O., BECHARA, E. J. H. Free radical generation during D-aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyrinpathies. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 271, p. 206-216, 1989.

MONTENEGRO, M. F.; BARBOSA JR., F.; SANDRIM, V. C.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehidratase gene modifies plasma/wole blood lead ratio. **Archives of Toxicology**, v. 80, p. 394-398, 2006.

MOSCOW, J. A.; SCHIMIDT, L.; INGRAM, D.T.; GNARRA, J.; JOHNSON, B.; COWAN, K.H. Loss of heterozygosity of the human cytosolic glutathione peroxidase I gene in lung cancer. Carcinogenisie (Lond.). v. 15, p. 2769-2773, 1994.

MUSHAK, P.; CROCETTI, A. F. Determination of numbers of lead-exposed american children as a function of lead source: Integrated summary of a report to the U. S. Congress on childhood lead poisoning. **Environmental Research**, v. 50, p. 211-229, 1989.

NASH, D.; MAGDER, L.; LUSTBERG, M.; SHERWIN, R. W.; RUBIN, R.J.; KAUFMANN, R. B.; SILBERGELD, E. K. Blood lead, blood pressure, and hypertension in perimenopausal and postmenopausal women. **The Journal of American Medical Association**, v. 289, p. 1523-1532, 2003.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxigen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NORDBERG, M.; WINBLAD, B.; FRATIGLIONI, L.; BASUN, H. Lead concentrations in elderly urban people related to blood pressure and mental performance: results from a population-based study. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 38, p. 290-294, 2000.

O'FLAHERTY, E. J. Physiologically based models for bone-seeking elements. V. Lead absorption and disposition in childhood. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 131, p. 297-308, 1995.

OTEIZA, P. I.; KLEINMAN, C. G.; DEMASI, M.; BECHARA, E. J. H. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, p. 607-611, 1995.

PATRA, R. C.; SWARUP, D.; DWIVEDI, S. K. Antioxidant effects of α tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the live, kidney and brain in rats. **Toxicology**, v. 162, p. 81-88, 2001.

PIRKLE, J. L.; SCHWARTZ, J.; LANDIS, J. R.; HARLAN, W. R. The relationship between blood lead levels and blood pressure and its cardiovascular risk implications. **American Journal of Epidemiology**, v. 121, p. 246-258, 1985.

QUINLAN, G. J.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C. P.; GUTTERIDGE, J. M. C. Action of lead (II) and aluminium ions on iron-stimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 962, p. 196-200, 1988.

RABINOWITZ, M. B.; WETHERILL, G. W.; KOPPLE, J. D. Kinetic analisys of lead metabolism in health humans. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 58, p. 260-270, 1976.

RATCLIFFE, J. M. **Health effects of lead II. In: Lean in Man and the Environment**, Chiuchester: UK, p. 34-47, 1981.

RATNASINGLE, D.; TANGREA, J. A.; ANDERSEN, M. R. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. **Cancer Research**, v. 60, p. 6381-6383, 2000.

ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R. S.; SOUZA, D. O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the secund stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of sucling rats. **Toxicology**, v. 100, p. 27-37, 1995.

ROTHENBERG, S. J.; KONDRASHOV, V.; MANALO, M.; JIANG, J.; CUELLAR, R.; GARCIA, M.; REYNOSO, B.; REYES, S.; DIAZ, M.; TODD, A. C. Increases in hypertension and blood pressure during pregnancy with increased bone lead levels. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, p. 1079-1087, 2002.

SADAO, M. Intoxicação por Chumbo. **Revista de Oxidologia**, jan/fev/mar, p. 37-42, 2002.

SAEDI, M. S.; SMITH, C.G.; FRAMPTON, J.; CHAMBERS, I.; HARRISON, P. R. SUNDE, R. A. Effect of selenium status on mRNA levels for glutathione peroxidase in rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 153, p. 855, 1988.

SAFIC-UR-REHMAN. Lead induced regional lipid peroxidation in brain. **Toxicology Letters**, v. 21, p. 333-37, 1984.

SARYAN, L. A.; SENZ, C. Lead and its compounds. In: **Occupational Medicine**, Senz, C.; Dickerson, O. B.; Horvath, E. P. (ed.), Mosby, p. 506-541, 1994.

SAXENA, G.; PATHAK, U.; FLORA, S. J. S. Beneficial role of monoesters of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid in the mobilization of lead and recovery of tissue oxidative injury in rats. **Toxicology**, v. 214, p. 39-56, 2005.

SCHUTZ, A.; BERGDAHL, I. A.; EKHOLM, A.; SKERFVING, S. Measurement by ICP-MS of lead in plasma and whole blood of lead workers and controls. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 53, p. 736-40, 1996.

SCHWARTZ, J. Lead, blood-pressure, and cardiovascular-disease in men and women. **Environmental Health Perspectives**, v. 91, p. 71-75, 1991.

SHARP, D. S.; OSTERLOH, J.; BECKER, C. E.; BERNARD, B.; SMITH, A. H.; FISHER, J. M.; SYME, S. L.; HOLMAN, B. L.; JOHNSTON, T. Blood pressure and blood lead concentration in bus drivers. **Environmental Health Perspectives**, v. 78, p. 131-137, 1988.

SIES, H. Biochemistry of Oxidative Stress. **Angewantde Chemie (International ed. In English)**, v. 25, p. 1058-1071, 1986.

SILBERGELD, E. K.; ADLER, H. S. Subcellular mechanisms of lead neurotoxicity. **Brain Research**, v. 148, p. 451-467, 1978.

SIVAPRASAD, R.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Lipoic acid in combination with a chelator ameliorates lead-induced peroxidative damages in rat kidney. **Archives of Toxicology**, v. 76, p. 437-441, 2002.

SIVAPRASAD, R.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead induced lipid peroxidation in rat liver. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15. p. 18-23, 2004.

STAESSEN, J. A.; ROELS, H.; LAUWERYS, R.R.; AMERY, A. Low-level lead exposure and blood pressure. **Journal of Human Hypertension**, v. 9, p. 303-328, 1995.

SUGAWARA, E.; NAKAMURA, K.; MIYAKE, T.; FUKUMURA, A.; SEKI, Y. Lipid peroxidation and concetration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 48, p. 239-242, 1991.

TANDON, S. K.; SINGH, S.; PRASAD, S.; SRIVASTAVA, S.; SIDDIQUI, M. K. J. Reversal of lead-induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant, or their combination in the rat. **Environmental Research**, v. 90, p. 61-66, 2002.

UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. **Life Science**, v. 51, p. 1083-1094, 1992.

VAZIRI, N. D.; DING, Y. Effect of lead on NO synthase expression in coronary endothelial cells: Role of superoxide. **Hypertension**, v. 37, p. 223-226, 2001.

VAZIRI, N.D.; DING, Y.; NI, Z. Nitric oxide synthase expression in the course of lead induced hypertension. **Hypertension**, v. 34, p. 558–562, 1999.

VAZIRI, N. D. E.; KHAN, M. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 920–925, 2007.

VAZIRI, N.D.; LIANG, K.; DING, Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. **Kidney International**, v. 56, p. 1492–1498, 1999.

VAZIRI, N. D.; ZHENMIN, N.; STEPHEN, H.; CYRIL H. B. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. **Kidney International**, v. 66, p. 2329-2336, 2004.

ZHOU Y.; ZANAO, R. A.; BARBOSA, F.; PARSONS, P. J.; KRUG, F. J. Investigations on a W-Rh permanent modifier for the detection of Pb in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta**, v. 57, p. 1291-1300, 2002.

WALDRON, H.A. The anemia of lead poisoning: a review. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 23, p. 83-100, 1966.

WARING, J. F.; HALBERT, D. N. The promise of toxicogenomics. **Current Opinion in molecular therapeutics**, v. 4, p.229-235, 2002.

WHO. World Health Organization. **Environmental Health Criteria 165–Inorganic Lead**. Geneva: WHO. 1995.