

Fatores genéticos que modulam concentrações de chumbo no organismo

Genetic factors modulate lead concentrations in the organism

Vania Braghini de Rezende¹, Jefferson H. Amaral², José Eduardo Tanus-Santos^{2*}

RESUMO

O chumbo (Pb) é um metal pesado muito tóxico, mesmo em baixas concentrações. Ainda não foi possível estabelecer uma concentração considerada "segura" para exposições. A toxicidade ao metal é atribuída principalmente a alterações enzimáticas, como a inibição da enzima delta aminolevulínico desidratase (ALAD) e à habilidade de competir com o cálcio.

A absorção do chumbo se dá principalmente através das vias respiratórias e gastrointestinal. Uma vez absorvido, o metal é encontrado no sangue, tecidos moles e mineralizados. Cerca de 99% do conteúdo absorvido é encontrado nos ossos, principal reservatório de chumbo. Aproximadamente 1% encontra-se livre no plasma e disponível para atravessar membranas biológicas e promover os efeitos tóxicos.

Apesar das medidas tomadas no sentido de diminuir as concentrações do metal na natureza, alguns indivíduos podem ser mais susceptíveis aos efeitos prejudiciais causados pela exposição ao chumbo. Fatores genéticos vem sendo estudados e associados a diferentes concentrações sanguíneas e plasmáticas do metal em indivíduos expostos. Portadores de diferentes genótipos podem experimentar maiores ou menores concentrações sanguíneas e plasmáticas de Pb. Reconhecer o indivíduo, ou grupo de indivíduos mais susceptíveis às altas concentrações de chumbo pode ser uma ferramenta útil na prevenção dos efeitos tóxicos do metal. O gene que codifica a ALAD e gene do Receptor da Vitamina D (VDR), os quais estão relacionados a toxicocinética do chumbo foram focos dessa revisão.

Palavras-chave: Polimorfismo Genético. Receptores de Vitamina D. Desidratase do Ácido Aminolevulínico. Chumbo.

Introdução

A análise de polimorfismos em estudos de exposição a compostos tóxicos ambientais tem tido sua importância reconhecida recentemente. Muitas vezes, indivíduos com diferentes *backgrounds* genéticos podem apresentar variações destes compostos no orga-

nismo. Conhecer a base genética e sua relevância para a exposição a chumbo (Pb) é importante tanto para saber se aquela população tem um risco "aumentado" de exposição, quanto para ver se, pela presença de polimorfismos poderia haver modificações dos efeitos tóxicos do metal. As diferenças na expressão de vários genes entre populações e entre indivíduos de uma

1. Departamento de Farmacologia. Universidade Estadual de Campinas
2. Departamento de Farmacologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo

Correspondência:
Prof. Dr. José Eduardo Tanus-Santos
Av. Bandeirantes, 3900
14049-900 - Ribeirão Preto - SP
Fone: 016-602-3163 / Fax: 016-633-2301
* Email: tanus@fmrp.usp.br

Artigo recebido em 05/07/2009
Aprovado em 08/12/2009

população podem ser delineadas pelo estudo de polimorfismos genéticos, os quais podem afetar a cinética de toxinas ambientais no organismo humano.¹ O chumbo tem sido um dos mais estudados nesse cenário.

Dizemos que um gene é polimórfico quando variações específicas da sequência de bases do gene são encontradas com frequência mínima de 1% em uma população. Por exemplo, polimorfismos genéticos podem ocorrer pela substituição de um único nucleotídeo em regiões do gene que codificam aminoácidos (exons), causando uma correspondente substituição de um aminoácido por outro, alterando a estrutura e/ou função da proteína correspondente. Alguns polimorfismos desse tipo são chamados de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e são os mais comuns.¹

A busca por polimorfismos genéticos associados a cinética do chumbo levou à análise dos genes do Ácido α -aminolevulínico desidratase (ALAD) e do Receptor da vitamina D (VDR)² Polimorfismos nesses genes tem sido associados a diferentes concentrações de chumbo no sangue e plasma de indivíduos expostos ambientalmente ao chumbo.³⁻⁹

O Chumbo

O chumbo é um metal pesado muito tóxico, mesmo em baixas concentrações. Ainda não foi possível estabelecer uma concentração considerada "segura" para exposições ao chumbo. Em 1991, Agências de Saúde e de Controle Ambiental dos Estados Unidos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomendaram limites máximos as concentrações de chumbo no sangue em torno de 5 a 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$.¹⁰ No período de 2002 a 2004, a *Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention* (ACCLPP) revisou a literatura a respeito dos efeitos adversos associados às concentrações de chumbo no sangue (Pb-S) e, em 2005, concluíram que existiam associações inversas entre funções cognitivas e Pb-S, sem evidências de haver associações fracas quando Pb-S era menor que 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$.¹¹ Em 2006, Gilbert e Weiss sugeriram que os níveis de ação para concentrações de chumbo no sangue em crianças de 2 $\mu\text{g}/\text{dL}$,¹² pois concentrações cada vez menores vem sendo associadas a desordens neurológicas, neurodegenerativas, déficits de atenção e hiperatividade.^{13,14}

O chumbo pode atingir diversos sistemas no organismo. Os efeitos da exposição a doses elevadas são distúrbios gastrointestinais (dores abdominais, constipação e paralisias intestinais) anemia, além do comprometimento do sistema nervoso central.^{15,16} In-

divíduos expostos a concentrações baixas, em torno de 2 $\mu\text{g}/\text{dL}$, além dos distúrbios neurológicos, apresentam efeitos como hipertensão¹⁷⁻¹⁹ e danos ao aparelho cardiovascular e renal.^{18,20-25}

A toxicidade ao metal é atribuída principalmente a alterações enzimáticas, como a inibição da ALAD e à habilidade de competir com o cálcio.^{17,18,23} São muitos os estudos sobre os mecanismos envolvidos na toxicidade do chumbo. No entanto, alguns indivíduos, mesmo quando expostos às mesmas concentrações de chumbo, podem ser mais susceptíveis aos acúmulos do metal no organismo ou aos seus efeitos tóxicos. Vários trabalhos já identificaram variações genéticas que estão associadas a diferentes concentrações do metal no organismo.^{3,4,9,26-28} Estas alterações genéticas individuais associadas a diferentes concentrações de chumbo podem determinar uma maior ou menor susceptibilidade de indivíduos frente à uma mesma exposição. Aliados aos estudos de mecanismos envolvidos na toxicidade ao metal, estudos sobre polimorfismos dos genes ALAD e VDR, que modulam as concentrações do metal no organismo poderão trazer importantes avanços para o controle da exposição ao chumbo. No futuro, informações como estas poderão auxiliar a identificação de um grupo de indivíduos mais susceptível e conseqüentemente, medidas de prevenção serão mais efetivas.

Toxicocinética do Chumbo

Para compreensão de como esses polimorfismos dos genes da ALAD e VDR alteram as concentrações do metal no organismo é necessário compreender a toxicocinética do metal.

A figura 1 mostra um modelo proposto por Rabinowitz e colaboradores.²⁹ O contato com o metal se dá principalmente através das vias respiratória e gastrointestinal. Uma vez absorvido, cerca de 99% do metal permanece ligado aos eritrócitos por aproximadamente 30-35 dias e num prazo de 4 a 6 semanas estará disperso nos tecidos moles como o fígado, rins, pulmão e sistema nervoso.^{21,29} O chumbo possui alta afinidade pela ALAD, uma enzima eritrocitária dependente de zinco (Zn), que está envolvida no processo de síntese do grupamento heme. Enquanto o chumbo está ligado a ALAD no eritrócito, uma pequena fração do metal (cerca de 1% do sangue total) fica livre no plasma e disponível para atravessar as membranas biológicas.³⁰ As concentrações plasmáticas de chumbo são muito pequenas, comparadas às concentrações de chumbo no sangue total, porém, é o melhor parâmetro para se avaliar concentrações do metal no

organismo. No entanto, as dificuldades de análises do chumbo no plasma ainda é um obstáculo que impede a utilização do plasma como parâmetro para intoxicação pelo metal.

Por ser estranho ao organismo, o chumbo não é metabolizado, mas sim complexado por macromoléculas sendo diretamente absorvido, distribuído e pouco excretado. Vários fatores podem alterar a absorção, a distribuição e o depósito do metal no organismo. A absorção pelo trato gastrointestinal pode ser alterada por baixas ingestões de cálcio ou ferro na dieta, o que leva a um aumento na absorção do chumbo. O mesmo é verdadeiro para uma alimentação deficiente em fósforo e proteínas.³¹

A excreção do chumbo é pequena pelo fato de se acumular no organismo. O pouco que é excretado se dá principalmente através da excreção renal e a gastrointestinal. A excreção gastrointestinal acontece por secreção de várias glândulas, entre elas a pancreática e por excreção biliar, possivelmente na forma de um complexo chumbo-glutationa.³¹

A maior parte do chumbo que foi absorvido acumula-se nos tecidos mineralizados, uma vez que o chumbo segue as rotas do cálcio.³² A semelhança bioquímica com o cálcio justifica a maioria dos efeitos tóxicos do chumbo. Como o cálcio é essencial para diversos mecanismos fisiológicos, a interferência do

chumbo nesses processos traz enormes prejuízos para o organismo.

O acúmulo do chumbo nos ossos não traria tantos prejuízos se esse tecido o mantivesse inerte durante a vida. No entanto, os ossos são remodelados, especialmente durante o crescimento, em mulheres grávidas e após a menopausa.^{33,34} É interessante citar que existe uma associação do chumbo que deixa os ossos com o chumbo livre no plasma.²⁹ A afinidade do metal pela ALAD acontece quando o metal é absorvido através de exposições recentes. O remodelamento ósseo é responsável pelo que chamamos de "contaminação endógena". O chumbo sendo retirado dos ossos e contaminando o plasma, estado em que o metal está livre pra atravessar membranas biológicas. No caso da gravidez, além de ocorrer a "contaminação endógena" da gestante, existe o risco da contaminação fetal, pois o chumbo atravessa a placenta. O mecanismo através do qual o chumbo é retirado dos ossos ainda não é conhecido, mas acredita-se que o metal siga os processos do cálcio. Desta forma, a vitamina D e o receptor VDR ao qual a vitamina D se liga, podem estar envolvidos na mobilização do chumbo.

Tendo em vista a toxicocinética do chumbo, é mais fácil compreender quais alterações genéticas podem alterar a susceptibilidade à intoxicação pelo metal. Tais alterações serão discutidas a seguir.

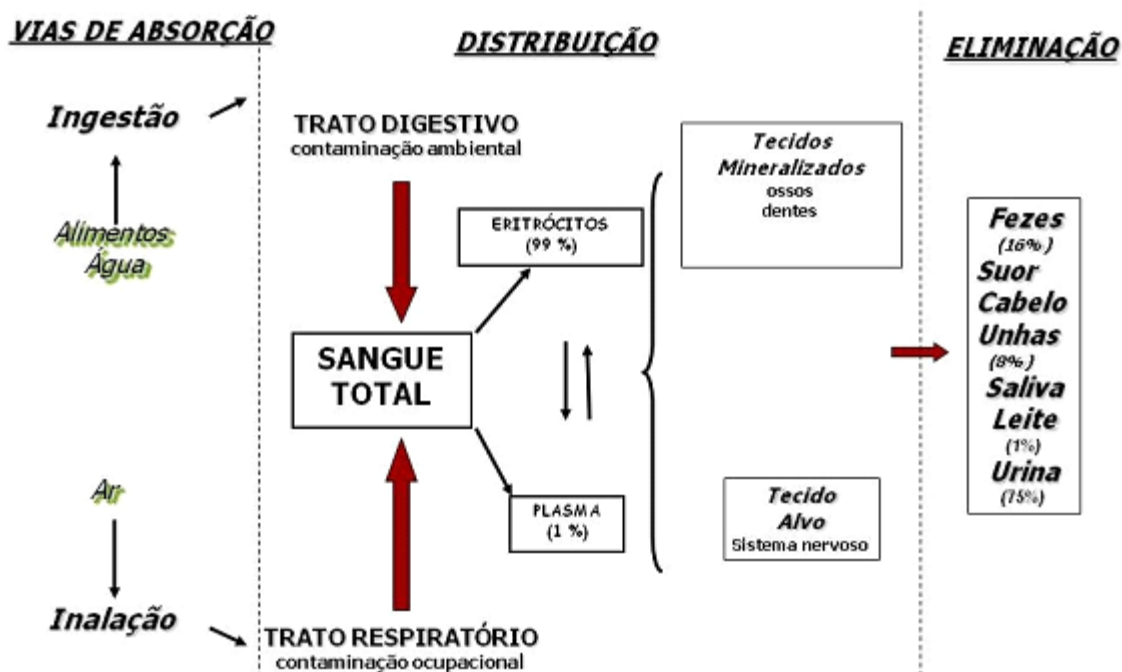


Figura 1: Modelo da toxicocinética do chumbo proposto por Rabinowitz e col.²⁹

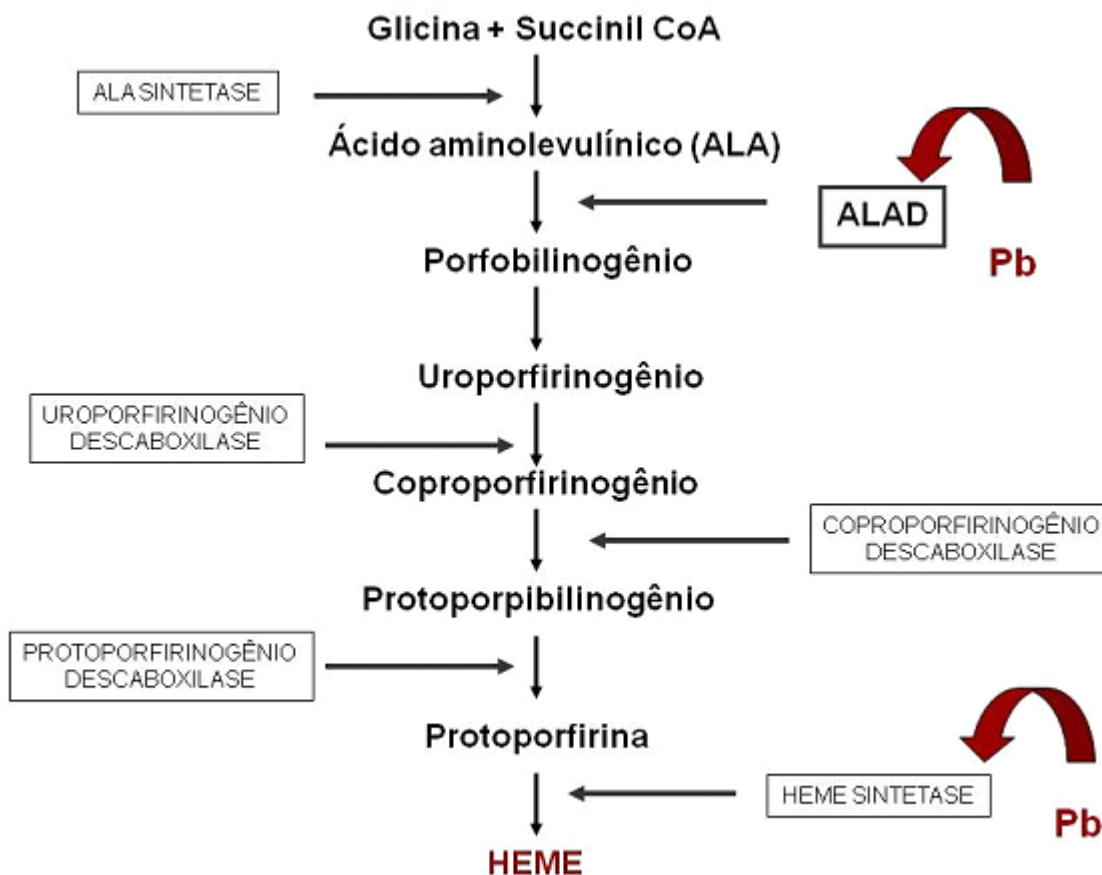


Figura 2: Desenho esquemático da biossíntese do heme, indicando as enzimas inibidas pelo chumbo

ALAD, seus polimorfismos e a contaminação por chumbo

Um dos primeiros efeitos da contaminação por chumbo é a hematotoxicidade. A afinidade do chumbo pela ALAD inibe a síntese do heme, o que compromete a síntese de hemoglobina. A série de reações que levam a síntese final do grupo heme começa com a atividade da enzima succinil coenzima-A (CoA) e glicina, terminando com a inserção de Ferro na molécula de protoporfirina. No primeiro passo da síntese, a ALAD catalisa a formação de ácido aminolevulínico (ALA) a partir de da glicina e do succinil CoA. No segundo passo, a ALAD catalisa a formação do protoporfirinogênio a partir de duas moléculas de ALA (Figura 2). A ALAD é a enzima composta de oito subunidades idênticas e oito átomos de zinco e possui uma alta afinidade pelo chumbo.³⁵ Assim, o chumbo consegue ocupar o espaço do zinco na molécula de ALAD e, como os átomos de zinco são essenciais à atividade enzimática, o chumbo consegue inativá-la. Desta forma, a exposição ao chumbo pode

levar a quadros clínicos de anemia. Com a ALAD inibida, há um aumento das concentrações do seu substrato (ALA; ácido aminolevulínico) no sangue e na urina. Conseqüentemente, os níveis de ALA urinário (ALA-U) também podem ser usados como biomarcador de exposição ao chumbo, embora este não seja o mais adequado.³⁶

O gene que codifica a ALAD existe em duas formas polimórficas que podem modificar a toxicocinética e influenciar na suscetibilidade individual à toxicidade do chumbo.³⁵ O gene possui dois alelos dominantes chamados ALAD1 e ALAD2, os quais são identificados pela técnica de PCR (Polymerase chain reaction) seguidos de digestão com enzima de restrição MspI (Figura 3).

A expressão destes alelos (ALAD 1-1, 1-2, e 2-2) resulta em três formas distintas de enzimas, que se diferem pela carga.⁸ O alelo ALAD-2, que é menos frequente, ocorre com frequência de 5 a 20% em populações caucasianas e mais raramente em populações descendentes de africanos e asiáticos.³⁸ Esse

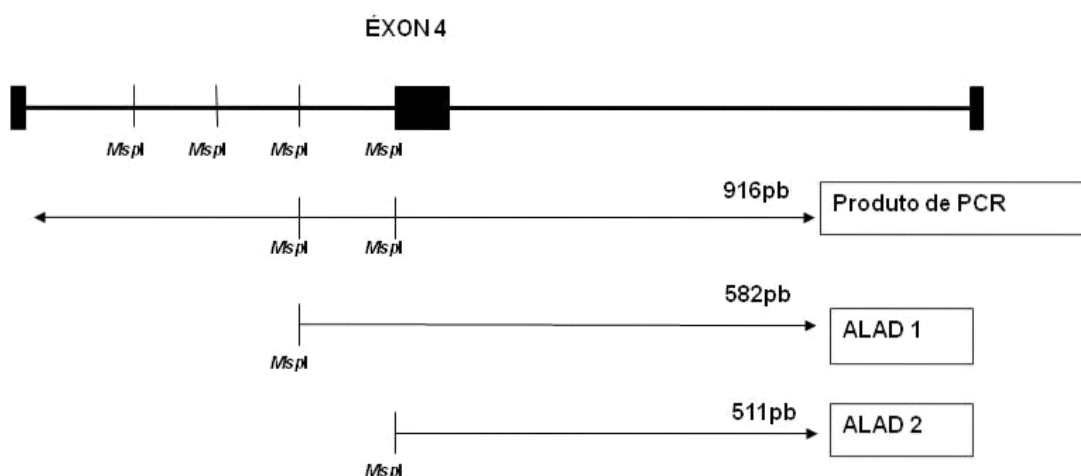


Figura 3: Análise molecular esquemática dos alelos da ALAD (*ALAD1* e *ALAD2*). Mapa de restrição *MspI* de um fragmento do gene da ALAD. Produto de PCR amplificado com 916 nucleotídeos; produto amplificado digerido com *MspI*, resultando em 582 ou 511 nucleotídeos (*ALAD1* e *ALAD2*, respectivamente).³⁷

alelo expressa uma enzima mais eletronegativa que *ALAD 1*. Como o chumbo possui carga positiva, haverá maior afinidade pela proteína mais eletronegativa. Foi a partir dessas descobertas que surgiram os primeiros estudos sobre susceptibilidade individual à intoxicação pelo chumbo.

Um pequeno estudo com trabalhadores expostos ao chumbo mostrou que os portadores de uma ou duas cópias do alelo *ALAD-2* apresentavam concentrações maiores de chumbo que os portadores do alelo *ALAD-1*.³⁹ Assim, mostrou-se que indivíduos com *ALAD-2* tinham concentrações de chumbo 4-6 vezes mais altas do que aqueles que não possuem este alelo.³⁵ Outros trabalhos confirmaram estes achados.⁴⁰⁻⁴⁴ Um estudo recente mostrou que portadores dos genótipos *ALAD 1-2/2-2* apresentaram maiores concentrações plasmáticas de chumbo e também maiores frações plasmáticas do metal (Pb-Plasma/Pb-Sangue Total), frente aos portadores do alelo *ALAD 1-1*.⁴

No entanto, há trabalhos que apóiam a idéia de que o alelo *ALAD-2* possa exercer um papel benéfico por "sequestrar" o chumbo no eritrócito, não o deixando livre para atravessar as membranas biológicas. Um outro estudo mostrou que indivíduos com genótipo *ALAD-1-2* realizaram testes neuropsicológicos de atenção de forma mais eficaz do que aqueles com genótipo *ALAD-1-1*.⁴⁵ Estes dados sugerem que o alelo *ALAD-2* tenha algum papel protetor contra a neurotoxicidade do chumbo. Não é conhecido como o polimorfismo da *ALAD* pode influenciar o transporte do chumbo aos órgãos-alvo, particularmente o cére-

bro. É possível que o papel protetor do alelo *ALAD-2* seja devido à manutenção do chumbo no compartimento sanguíneo.⁴²

Diante disso, dois cenários podem ser abertos à discussão. No primeiro, é possível que o aumento do chumbo ligado aos indivíduos *ALAD 2-2* possa ser resultado de um aumento da distribuição do metal no organismo. Quanto maior afinidade do metal pela enzima codificada pelo alelo 2, maior a distribuição do chumbo pelo organismo e, com isso, maiores concentrações são encontradas no sangue desses indivíduos. Por outro lado, é possível que a *ALAD-2* possa ser um sequestrador sanguíneo do chumbo. A *ALAD 2* pode ter alta afinidade pelo chumbo, retendo-o no sangue e protegendo outros órgãos. Essa hipótese explicaria o porquê dos efeitos menos severos do chumbo estarem associados ao alelo *ALAD-2*.

Além do polimorfismo no gene da *ALAD*, existe outro gene que também está envolvido na cinética do chumbo: o gene do receptor da vitamina D (*VDR*). A relação entre o gene *VDR* e a distribuição do metal no organismo está fundamentada na semelhança bioquímica entre chumbo e cálcio.

Vitamina D, polimorfismos *VDR* e contaminação por chumbo

A vitamina D atua como potente regulador do metabolismo ósseo. As duas principais formas da Vitamina D são: Colecalciferol ou Vitamina D₃, formada na pele após exposição aos raios UV, e Ergocalciferol ou Vitamina D₂, obtida através dos alimentos.⁴⁶

Embora diferenças estruturais existam entre as duas formas de Vitamina D, estas seguem a mesma via metabólica, sendo hidroxiladas no fígado e posteriormente nos rins, onde são finalmente ativadas. A forma ativa da Vitamina D é $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que exerce seus efeitos no organismo através da ligação a um receptor nuclear específico presente em diversos tecidos, o Receptor da vitamina D (VDR)(Figura 4).⁴⁶

A vitamina D tem um papel importante na absorção do cálcio e do chumbo. A ligação desse hormônio ao receptor VDR nuclear aumenta a transcrição de proteínas carreadoras de cálcio, como a calbindina-D. Esse evento ocorre principalmente nas células do intestino, rins e ossos e culmina no aumento da absorção de cálcio por esses tecidos.⁴⁷ A deficiência de cálcio interfere na absorção e distribuição de chumbo para os tecidos ricos em cálcio.^{48,49,50} Como o chumbo possui uma similaridade bioquímica ao cálcio, o metal segue as mesmas vias do mineral, sendo carregado pelas mesmas proteínas. A deficiência de cálcio também aumenta a produção de vitamina D e a síntese de proteínas carreadoras de cálcio. Compreendendo esse mecanismo é possível entender porque a absorção de chumbo aumenta quando há uma deficiência de cálcio

na dieta. Também no processo de remodelamento ósseo, o chumbo é incorporado e retirado dos ossos através do mecanismo de transporte de cálcio.²⁹

A clonagem do receptor da vitamina D, VDR mostrou que se trata de um membro da superfamília dos receptores nucleares e que são ativados por ligantes específicos.⁵² Polimorfismos no gene VDR podem determinar diferenças na densidade óssea.⁵³ Cerca de 100 polimorfismos são esperados ao longo do gene VDR, pois trata-se de um gene com uma extensa região promotora capaz de gerar múltiplas transcrições específicas de cada tecido.^{54,55,56} Dentre eles encontram-se aqueles que são reconhecidos pelas enzimas de restrição: *BsmI*, *Apal* e *FokI*, recebendo essa denominação (Figura 5).

Em trabalhos sobre o gene VDR e o *turnover ósseo*, o polimorfismo *BsmI* desponta como o mais estudado, havendo dois alelos: *B* e *b*. O genótipo *BB* tem uma prevalência de 7 a 32% entre caucasianos.⁵⁸ Mulheres portadoras do genótipo *BB* apresentam densidade mineral óssea cerca de 10% menor que aquelas que tem o genótipo *bb*.⁵⁸ Resultados semelhantes foram encontrados também em homens, nos quais a densidade mineral óssea foi 7% menor nos indivíduos

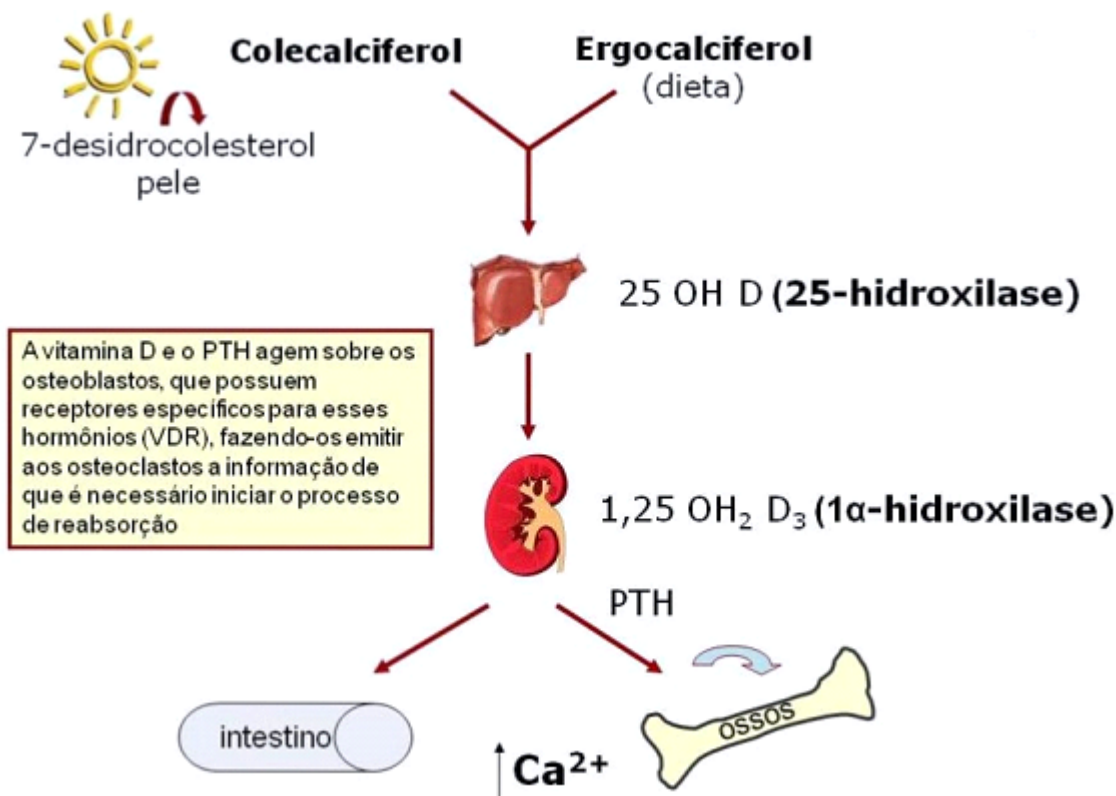


Figura 4: Ativação da Vitamina D e sua importância no processo de absorção de cálcio no intestino e reabsorção nos ossos. ⁵¹

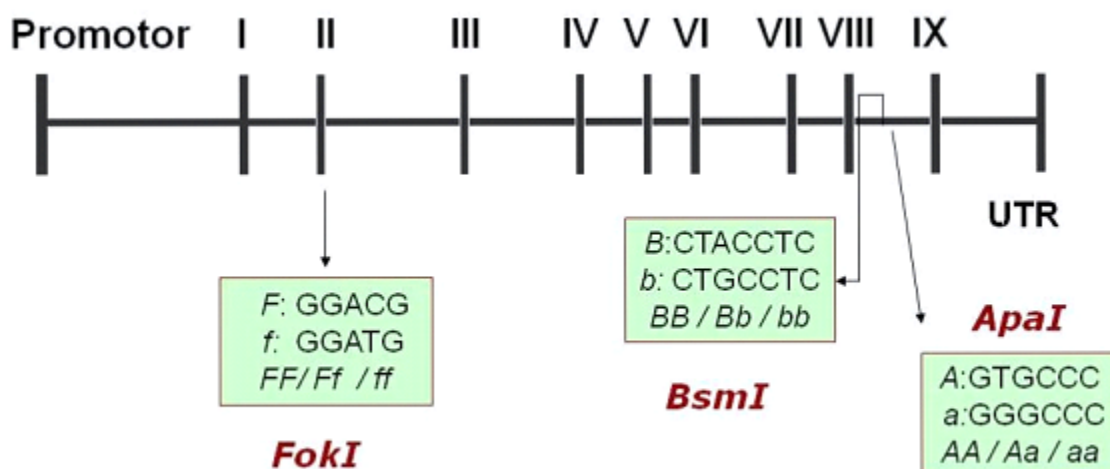


Figura 5: Estrutura genômica do VDR e posição de alguns polimorfismos conhecidos (modificado de Uitterlinden A. e colaboradores.⁵⁷

BB.⁵⁹ Estes resultados motivaram outros pesquisadores a avaliar os efeitos de genótipos VDR sobre as concentrações de chumbo nos ossos, mostrando que indivíduos portadores do alelo B apresentavam grandes concentrações de chumbo nesse compartimento.⁹ No entanto, para o gene VDR, maiores concentrações do metal estavam presentes nos portadores do alelo B.²⁸ Já, com relação ao polimorfismo *FokI*, um estudo em crianças⁶⁰ mostrou que aquelas portadoras do alelo *F* tinham maiores concentrações de chumbo no sangue do que crianças sem este alelo. Entretanto, os resultados obtidos nos vários estudos de associações para um mesmo polimorfismo não são conclusivos. Uma possível causa destas inconsistências poderia ser o fato de que a maioria destes estudos não leva em consideração que os SNPs não são independentes um dos outros. Na verdade, SNPs que estão fisicamente próximos no DNA são geralmente herdados conjuntamente. Este fenômeno é chamado de desequilíbrio de ligação, sendo que quanto menor a distância entre os variantes, menor a probabilidade de sofrerem recombinação, sendo portanto maior a ocorrência de desequilíbrio de ligação.^{61,62} O bloco de alelos co-herdados é chamado de haplótipo. Atualmente, acredita-se que a análise de haplótipos seja mais informativa do que a análise individual de cada polimorfismo.⁶²

Um estudo recente enfocando os três polimorfismos do gene VDR (*BsmI*, *ApaI* e *FokI*) mostrou que indivíduos portadores dos alelos *b* (*BsmI*), *a* (*ApaI*) e *f* (*FokI*) apresentavam concentrações menores de chumbo no sangue e no plasma do que os não portadores destes alelos. Ainda, a análise dos haplótipos do

gene VDR mostrou haver menores concentrações de chumbo nos indivíduos portadores do hapótipo *b-a-f* para os três polimorfismos (*BsmI*, *ApaI* e *FokI*),³ sugerindo que indivíduos portadores deste haplótipo estariam sujeitos a menores graus de exposição ao chumbo.

Conclusão

Essa revisão discutiu os fatores genéticos que vem sendo estudados e que parecem ser relevantes para a avaliação das consequências da exposição ao chumbo. Tais estudos indicam haver diferenças na susceptibilidade individual frente a um mesmo grau de exposição ao chumbo. Estas diferenças podem predispor um determinando indivíduo, ou grupo de indivíduos geneticamente semelhantes, aos efeitos tóxicos deste metal. Particularmente importantes, as variações no gene da ALAD tem sido as mais amplamente estudadas até o momento. Porém, a determinação da influência dos polimorfismos do gene VDR e outros genes envolvidos na toxicocinética do chumbo ainda requer estudos mais detalhados. Seria interessante que estes estudos enfocassem os distúrbios clínicos causados pelo chumbo. Também seria de enorme importância estudar as influências destes polimorfismos em populações altamente susceptíveis às consequências deletérias da exposição ao chumbo. Por exemplo, seria relevante determinar se mulheres grávidas ou crianças portadoras de determinados marcadores genéticos sofrem prejuízos maiores ao serem expostas a este metal.

ABSTRACT

Lead (Pb) is a highly toxic heavy metal, even at low concentrations. There is no threshold considering "safe" for lead exposure. The toxic effects are due mainly to the enzymatic changes, such as inhibition of the enzyme delta aminolevulinic dehydratase (ALAD) and the ability to compete with calcium.

The primary sites for lead absorption are gastrointestinal and respiratory tract. Once absorbed, lead is found in blood, soft tissues and mineralizing systems. Approximately 99% of the total body burden of lead is found in bones, body's major storage site. Around 1% of lead in blood is in plasma, representing the labile and biologically active lead fraction, able to pass the cells membranes and cause toxic effects.

Despite the measures taken to reduce the concentrations of metal in nature, some individuals may be more susceptible to adverse effects caused by exposure to lead. Genetic factors has been studied and associated to differences among blood and plasma lead concentrations in subjects exposure. Subjects with different genotypes has proved lower or higher blood concentrations and plasma Pb. Recognize the individual or group of individuals more susceptible to high concentrations of lead can be a useful tool in preventing the toxic effects of metal. The gene coding for ALAD gene and of the Vitamin D Receptor (VDR), which are related to the toxicokinetics of lead have been outbreaks of this review.

Keywords: Polymorphism, Genetic. Vitamin D Receptors. Aminolevulinic Acid Dehydratase. Lead.

Referências bibliográficas

1. Crawford DC, Akey DT, Nickerson DA. The patterns of natural variation in human genes. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005;6:287-312.
2. Onalaja AO, Claudio L. Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ Health Perspect.* 2000;108(Suppl 1):23-8.
3. Rezende VB, Barbosa F Jr., Montenegro MF, Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Haplotypes of vitamin D receptor modulate the circulating levels of lead in exposed subjects. *Arch Toxicol.* 2008;82:29-36.
4. Montenegro MF, Barbosa F Jr., Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies plasma/whole blood lead ratio. *Arch Toxicol.* 2006;80:394-8.
5. Weaver VM, Lee BK, Todd AC, Ahn KD, Shi W, Jaar BG, et al. Effect modification by delta-aminolevulinic acid dehydratase, vitamin D receptor, and nitric oxide synthase gene polymorphisms on associations between patella lead and renal function in lead workers. *Environ Res.* 2006;102:61-9.
6. Weaver VM, Schwartz BS, Ahn KD, Stewart WF, Kelsey KT, Todd AC, et al. Associations of renal function with polymorphisms in the delta-aminolevulinic acid dehydratase, vitamin D receptor, and nitric oxide synthase genes in Korean lead workers. *Environ Health Perspect.* 2003;111:1613-9.
7. Wetmur JG. Influence of the common human delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on lead body burden. *Environ Health Perspect.* 1994;102 (Suppl 3):215-9.
8. Wetmur JG, Lehnert G, Desnick RJ. The delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: higher blood lead levels in lead workers and environmentally exposed children with the 1-2 and 2-2 isozymes. *Environ Res.* 1991;56:109-19.
9. Schwartz BS, Stewart WF, Kelsey KT, Simon D, Park S, Links JM, et al. Associations of tibial lead levels with Bsm1 polymorphisms in the vitamin D receptor in former organolead manufacturing workers. *Environ Health Perspect.* 2000; 108:199-203.
10. Goyer RA. Lead toxicity: current concerns. *Environ Health Perspect.* 1993;100:177-87.
11. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 1999; 68-196.
12. Gilbert SG, Weiss B. A rationale for lowering the blood lead action level from 10 to 2 microg/dL. *Neurotoxicology.* 2006; 27:693-701.
13. Braun JM, Kahn RS, Froehlich T, Auinger P, Lanphear BP. Exposures to environmental toxicants and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children. *Environ Health Perspect.* 2006;114:1904-9.
14. Bellinger D Fau - Leviton A, Leviton A Fau - Waternaux C, Waternaux C Fau - Needleman H, Needleman H Fau - Rabinowitz M, Rabinowitz M. Low-level lead exposure, social class, and infant development. *Neurotoxicol Teratol.* 1988; 10:497-503.
15. Mudipalli A. Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian J Med Res.* 2007;126:518-27.
16. Gidlow DA. Lead toxicity. *Occup Med (Lond).* 2004;54:76-81.
17. Selevan SG, Landrigan PJ, Stern FB, Jones JH. Mortality of lead smelter workers. *Am J Epidemiol.* 1985;122:673-83.
18. Selevan SG, Landrigan PJ, Stern FB, Jones JH. Lead and hypertension in a mortality study of lead smelter workers. *Environ Health Perspect.* 1988;78:65-6.
19. Rothenberg SJ, Kondrashov V, Manalo M, Jiang J, Cuellar R, Garcia M, et al. Increases in hypertension and blood pressure during pregnancy with increased bone lead levels. *Am J Epidemiol.* 2002;156:1079-87.
20. Cooper WC, Wong O, Kheifets L. Mortality among employees of lead battery plants and lead-producing plants, 1947-1980. *Scand J Work Environ Health.* 1985;11:331-45.
21. Patrick L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev.* 2006; 11: 2-22.
22. Kopp SJ, Barron JT, Tow JP. Cardiovascular actions of lead and relationship to hypertension: a review. *Environ Health Perspect.* 1988;78:91-9.
23. Loghman-Adham M. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Environ Health Perspect.* 1997;105:928-39.
24. Aviv A, John E, Bernstein J, Goldsmith DI, Spitzer A. Lead intoxication during development: its late effects on kidney function and blood pressure. *Kidney Int.* 1980;17:430-7.
25. Fleischer N, Mouw R, Vander AJ. Chronic effects of lead on renin and renal sodium excretion. *J Lab Clin Med.* 1980; 95: 759-70.

26. Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Ahn KD, Kelsey K, Bressler J. Associations of subtypes of hemoglobin with delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and dimercaptosuccinic acid-chelatable lead levels. *Arch Environ Health*. 1997; 52:97-103.
27. Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Sithisarankul P, Strickland PT, Ahn KD, et al. delta-Aminolevulinic acid dehydratase genotype modifies four hour urinary lead excretion after oral administration of dimercaptosuccinic acid. *Occup Environ Med*. 1997;54:241-6.
28. Schwartz BS, Lee BK, Lee GS, Stewart WF, Simon D, Kelsey K, et al. Associations of blood lead, dimercaptosuccinic acid-chelatable lead, and tibia lead with polymorphisms in the vitamin D receptor and [delta-aminolevulinic acid dehydratase genes. *Environ Health Perspect*. 2000;108:949-54.
29. Rabinowitz MB. Toxicokinetics of bone lead. *Environ Health Perspect*. 1991;91:33-7.
30. Bergdahl IA, Gerhardsson L, Liljelind IE, Nilsson L, Skerfving S. Plasma-lead concentration: investigations into its usefulness for biological monitoring of occupational lead exposure. *Am J Ind Med*. 2006;49:93-101.
31. Moreira FR, Moreira JC. [Effects of lead exposure on the human body and health implications. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;15:119-29.
32. Berglund M, Akesson A, Bjellerup P, Vahter M. Metal-bone interactions. *Toxicol Lett*. 2000;112-113:219-25.
33. Silbergeld EK, Schwartz J, Mahaffey K. Lead and osteoporosis: mobilization of lead from bone in postmenopausal women. *Environ Res*. 1988;47:79-94.
34. Silbergeld EK, Patrick TE. Environmental exposures, toxicologic mechanisms, and adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192(Suppl 5):S11-21.
35. Astrin KH, Bishop DF, Wetmur JG, Kaul B, Davidow B, Desnick RJ. delta-Aminolevulinic acid dehydratase isozymes and lead toxicity. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;514:23-9.
36. Barbosa F, Jr., Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect*. 2005;113:1669-74.
37. Wetmur JG, Kaya AH, Plewinska M, Desnick RJ. Molecular characterization of the human delta-aminolevulinic acid dehydratase 2 (ALAD2) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. *Am J Hum Genet*. 1991;49:757-63.
38. Montenegro MF, Barbosa F, Jr., Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Ethnicity affects the distribution of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) genetic variants. *Clin Chim Acta*. 2006;367:192-5.
39. Ziemsen B, Angerer J, Lehnert G, Benkmann HG, Goedde HW. Polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in lead-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 1986;58:245-7.
40. Lee SS, Lee BK, Lee GS, Stewart WF, Simon D, Kelsey K, et al. Associations of lead biomarkers and delta-aminolevulinic acid dehydratase and vitamin D receptor genotypes with hematopoietic outcomes in Korean lead workers. *Scand J Work Environ Health*. 2001;27:402-11.
41. Bergdahl Ia Fau - Grubb A, Grubb A Fau - Schutz A, Schutz A Fau - Desnick RJ, Desnick Rj Fau - Wetmur JG, Wetmur Jg Fau - Sassa S, Sassa S Fau - Skerfving S, et al. Lead binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human. *Pharmacol Toxicol*. 1997;81:153-8.
42. Fleming DE, Chettle DR, Wetmur JG, Desnick RJ, Robin JP, Boulay D, et al. Effect of the delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on the accumulation of lead in bone and blood in lead smelter workers. *Environ Res*. 1998;77:49-61.
43. Montenegro MF, Barbosa F, Jr., Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies plasma/whole blood lead ratio. *Arch Toxicol*. 2006;80:394-8. Epub 2005 Dec 9.
44. Schwartz BS, Lee BK, Lee GS, Stewart WF, Simon D, Kelsey K, et al. Associations of blood lead, dimercaptosuccinic acid-chelatable lead, and tibia lead with polymorphisms in the vitamin D receptor and [delta-aminolevulinic acid dehydratase genes. *Environ Health Perspect*. 2000;108:949-54.
45. Bellinger D, Hu H, Titlebaum L, Needleman HL. Attentional correlates of dentin and bone lead levels in adolescents. *Arch Environ Health*. 1994;49:98-105.
46. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;92:4-8. Epub 2006 Feb 28.
47. Wasserman RH, Fullmer CS. Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypotheses. *J Nutr*. 1995;125(Suppl 7):1971S-9S.
48. Six KM, Goyer RA. Experimental enhancement of lead toxicity by low dietary calcium. *J Lab Clin Med*. 1970;76:933-42.
49. Mykkanen HM, Wasserman RH. Gastrointestinal absorption of lead (203Pb) in chicks: influence of lead, calcium, and age. *J Nutr*. 1981;111:1757-65.
50. Fullmer CS. Dietary calcium levels and treatment interval determine the effects of lead ingestion on plasma 1,25-dihydroxyvitamin D concentration in chicks. *J Nutr*. 1995; 125: 1328-33.
51. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007; 357: 266-81.
52. McDonnell DP, Mangelsdorf DJ, Pike JW, Haussler MR, O'Malley BW. Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science*. 1987;235:1214-7.
53. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994;367:284-7.
54. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004;338:143-56.
55. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol*. 1997;11:1165-79.
56. Crofts LA, Hancock MS, Morrison NA, Eisman JA. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:10529-34.
57. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004;338:143-56.
58. Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res*. 1996;11:1841-9.
59. Need AG, Horowitz M, Stiliano A, Scopacasa F, Morris HA, Chatterton BE. Vitamin D receptor genotypes are related to bone size and bone density in men. *Eur J Clin Invest*. 1996;26:793-6.
60. Haynes EN, Kalkwarf HJ, Hornung R, Wenstrup R, Dietrich K, Lanphear BP. Vitamin D receptor Fok1 polymorphism and blood lead concentration in children. *Environ Health Perspect*. 2003;111:1665-9.
61. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*. 2005;56:303-20.
62. Montpetit A, Chagnon F. [The Haplotype Map of the human genome: a revolution in the genetics of complex diseases. *Med Sci (Paris)*. 2006;22:1061-7.